

**Molekulare Steuerung des Mamma-Karzinom-Verhaltens
durch das inflammatorische Zytokin MIF**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Eva Maria Verjans
aus
Mönchengladbach

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat. Jürgen Bernhagen

Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat. Edgar Dahl

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	EINLEITUNG	7
1.1	MIF als Zytokin und Hormon	7
1.1.1	Historisches	7
1.1.2	Struktur und enzymatische Aktivität	7
1.1.3	MIF als Zytokin und neuroendokriner Mediator	9
1.1.4	Makrophagen als Produzenten und Zielzellen	10
1.2	Molekulare Mechanismen der MIF-Produktion und -Wirkung	11
1.2.1	MIF-Rezeptormechanismen und -komplexe	11
1.2.2	MIF-Signaltransduktion über ERK-MAPK	12
1.2.3	MIF-Signaltransduktion über Akt	13
1.2.4	MIF-Sekretion	14
1.3	Rolle von MIF bei Krankheitsprozessen	15
1.3.1	Bakterielle Sepsis und septischer Schock	15
1.3.2	Akute und chronische Entzündungsprozesse	16
1.3.3	Tumorgenese	17
1.4	Mammakarzinome	17
1.4.1	Epidemiologie der Mamma-Karzinome	17
1.4.2	Allgemeine und histopathologische Prognosefaktoren	18
1.4.3	Diagnostik und Therapie	20
1.4.4	Zytokine und Entzündungsmechanismen	21
1.4.5	Wechselwirkung von Makrophagen und Tumorzellen beim Mamma-Karzinom	23
1.5	Verhalten von Tumorzellen	23
1.5.1	Adhäsion	23
1.5.2	Proliferation	25
1.5.3	Migration und Invasion	25
1.6	Zielsetzung der Arbeit	26
2	MATERIAL	27
2.1	Chemikalien und Reagenzien	27
2.2	Geräte	28
2.3	Verbrauchsmaterialien	29
2.4	Kits	30
2.5	Antikörper	30
2.6	Verwendete Primer	32
2.7	Stimulantien und Zellmodulatoren	32
2.8	Allgemeine Lösungen und Puffer	32
3	METHODEN	34
3.1	Proteinbiochemische Methoden	34
3.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.1.2	SDS-Page-Gelelektrophorese	34
3.1.3	Western-Blotting	37
3.1.4	Immunodetektion	38

3.1.5	huMIF-Sandwich-ELISA	39
3.1.6	Zelllyse durch <i>freeze-thaw</i> -Zyklen	42
3.2	Fluoreszenzbasierte Methoden	42
3.2.1	Durchflusszytometrie	42
3.2.2	Fluoreszenzfärbung von nativen Zellen	44
3.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	44
3.3	Funktionelle Assays	45
3.3.1	Adhäsions-Assay	45
3.3.2	Matrigel-Invasion	47
3.3.3	Proliferationsassay	48
3.4	Molekularbiologische Methoden	49
3.4.1	RNA-Isolation	49
3.4.2	cDNA-Synthese	49
3.4.3	Semiquantitative <i>real-time</i> -PCR	50
3.5	Isolierung und Kultivierung von Maus-Makrophagen	51
3.5.1	Isolierung von Peritonealmakrophagen	51
3.5.2	Kultivierung von Peritonealmakrophagen	52
3.5.3	Stimulation der Makrophagen	53
3.6	Zellkultur	53
3.6.1	Zelllinien	53
3.6.2	Auftauen von Zellen	55
3.6.3	Zellzahlbestimmungen	56
3.6.4	Einfrieren von Zellen	56
3.6.5	MIF-Stimulation und Zelllyse mit Abnahme der Überstände	56
3.7	Statistische Auswertung	57
4	ERGEBNISSE	58
4.1	Unterschiede in der Konzentration von MIF-, PTEN- und p-Akt/ Akt in Mamma-Epithel- und in Mamma-Karzinom-Zelllinien	58
4.1.1	Tumoren unterscheiden sich in MIF-Konzentration und MIF-Genexpression von gesundem Gewebe	58
4.1.2	PTEN korreliert mit der Akt-Aktivierung in Mamma-Zelllinien	59
4.2	CD74 und CXCR4 werden auf Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien exprimiert	61
4.3	Stimulation mit rMIF bewirkt eine gesteigerte, endogene MIF-Sekretion der Mamma-Zellen	64
4.4	MIF fördert das Adhäsionsverhalten von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien	68
4.4.1	Unterschiedliche Adhäsion von Mamma-Zellen ohne Stimulus	68
4.4.2	rMIF fördert die Adhäsion	69
4.4.3	Anti-MIF und Anti-CD74 wirken hemmend auf das Adhäsionsverhalten	71
4.4.4	PI3K-Weg-Inhibitoren beeinflussen die Adhäsion und gleichzeitig auch den Einfluß von rMIF	72
4.5	MIF führt zu einer vermehrten Zellproliferation	75
4.5.1	Unterschiedliche Proliferation von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen ohne Stimulus	75
4.5.2	Stimulation mit rMIF erhöht die Proliferation besonders in Mamma-Karzinom-Zellen	76
4.5.3	Anti-MIF und Anti-CD74 hemmen die Proliferation der Tumorzellen	77
4.5.4	CD74 ist für die stimulierende MIF-Wirkung verantwortlich	78
4.6	Erhöhte Invasion von Mamma-Karzinom-Zellen bei Verwendung von rMIF als Chemoattraktant	80

4.7	MIF in Maus-Makrophagen-Überständen beeinflusst die Aktivität von Mamma-Karzinom-Zellen	81
4.7.1	Charakterisierung der Maus-Makrophagen-Überstände in Bezug auf ihre MIF-Konzentration	82
4.7.2	MIF in Maus-Makrophagen-Überständen fördert die Adhäsion von Mamma-Karzinom-Zellen	83
4.8	Die Konzentration von MIF in Karzinom-Biopsien korreliert mit klinisch-pathologischen Daten	84
4.8.1	Korrelation von MIF mit dem HER2-Rezeptor-Level	85
4.8.2	Korrelation von MIF mit den Proteinen PA und PAI-1	86
4.8.3	Korrelation von MIF mit dem Lymphknotenstatus	87
5	DISKUSSION	89
5.1	Die MIF-Konzentration im Karzinomgewebe korreliert mit dem Tumorgrad	89
5.2	CD74 und CXCR4 als Signal-übermittelnde Oberflächenmoleküle	90
5.3	rMIF stimuliert die autokrine MIF-Sekretion	91
5.4	MIF fördert die Zelladhäsion	92
5.5	MIF stimuliert die Proliferation	94
5.6	Aktivierung der Invasion durch MIF	95
5.7	Maus-Makrophagen-Überstände stimulieren die Tumorzelladhäsion über MIF	96
5.8	Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit dem MIF-Gehalt in Mamma-Biopsaten	97
5.9	Gesamtmodell der MIF-Wirkung in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen	98
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	LITERATUR	101
8	ANHANG	

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Proteinkinase B
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfofluorid
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BAD	<i>Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter</i>
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRH	<i>Corticotropic releasing-hormone</i>
CT	Computertomographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHICA	<i>5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid</i>
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribunucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FCS	<i>Forward-scatter</i>
FITC	Fluorescein
g	Erdbeschleunigung

GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
h	Stunde
HCl	Salzsäure
huMIF	Humanes MIF
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion-molecule</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NF-κB
IL	Interleukin
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LY294002	PI3-Kinase Inhibitor
Nck2	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophagen-Migrations-inhibierender Faktor
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
n	Anzahl
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NO	Stickstoffoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PA	<i>Plasminogen activator</i>
p-Akt	Phosphoryliertes Akt

PaCO ₂	Kohlestoffdioxid-Partialdruck
PAGE	Polyacrylamidgel
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PINCH	<i>Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein</i>
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PMA	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
POD	Peroxidase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
rMIF	Rekombinantes MIF
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
SSC	Side-scatter
Tab.	Tabelle
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 MIF als Zytokin und Hormon

1.1.1 Historisches

Die erste Erwähnung eines löslichen Faktors, der die Migration von neutrophilen Leukozyten und Makrophagen inhibiert, geht auf das Jahr 1932 zurück [1]. Doch bis zur eigentlichen Entdeckung des MIF-Proteins vergingen weitere 30 Jahre. 1966 isolierten unabhängig voneinander David *et al.* und Bloom und Bennett den Makrophagen-migrationsinhibierenden-Faktor (MIF) als eines der ersten Zytokine [2, 3]. In diesen und weiteren darauf folgenden Arbeiten wurde die inhibierende Wirkung des Proteins auf die ungerichtete Makrophagen-Migration beim Spättyp der Hypersensitivitätsreaktion beschrieben [4, 5]. Viele Jahre vergingen ohne ein geeignetes Verfahren für die Aufreinigung des MIF-Proteins zu finden. Die Reinheit des Produktes war gestört durch Verunreinigungen mit LPS, IFN- γ und IL-4, die in ähnlicher Art und Weise migrationsinhibierende Eigenschaften aufweisen, und somit die vermeintlich durch MIF hervorgerufenen Effekte beeinflussten [6, 7]. Auch 1989 nach der ersten Klonierung von humanem MIF in T-Zellen blieb weiterhin das Problem der Aufreinigung und der damit verbundenen fehlenden Charakterisierung von MIF bestehen [8]. Erst 1993 nach der Entdeckung von MIF in corticotropen Hypophysenzellen und der gelungenen Expression von biologisch aktivem MIF in *E. coli* konnten umfassende Untersuchungen zur Struktur- und Funktionsaufklärung durchgeführt werden [9-11].

1.1.2 Struktur und enzymatische Aktivität

Humanes MIF ist ein Protein, welches sich aus 114 Aminosäuren zusammensetzt und ein berechnetes Molekulargewicht von 12476,3 Da aufweist. Homologe sind sowohl in Pflanzen, Nematoden als auch Vertebraten bekannt, wobei die Homologie von murinem und humanem MIF auf der Aminosäureebene bei 88,7 % liegt [12].

Der Oligomerisierungsstatus des MIF-Proteins ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Während Röntgenstrukturanalysen eine Trimerbildung zeigen, wurde mittels NMR das Vorliegen eines Dimers bestimmt [13-16]. *Cross-linking*-Studien dagegen ergaben eine Mischung aus monomerem, dimerem und trimerem MIF, wenn dieses in physiologischen Konzentrationen vorliegt [17]. Abb. 1 zeigt die Struktur des Proteins sowohl in seiner Form als Monomer als auch als Trimer.

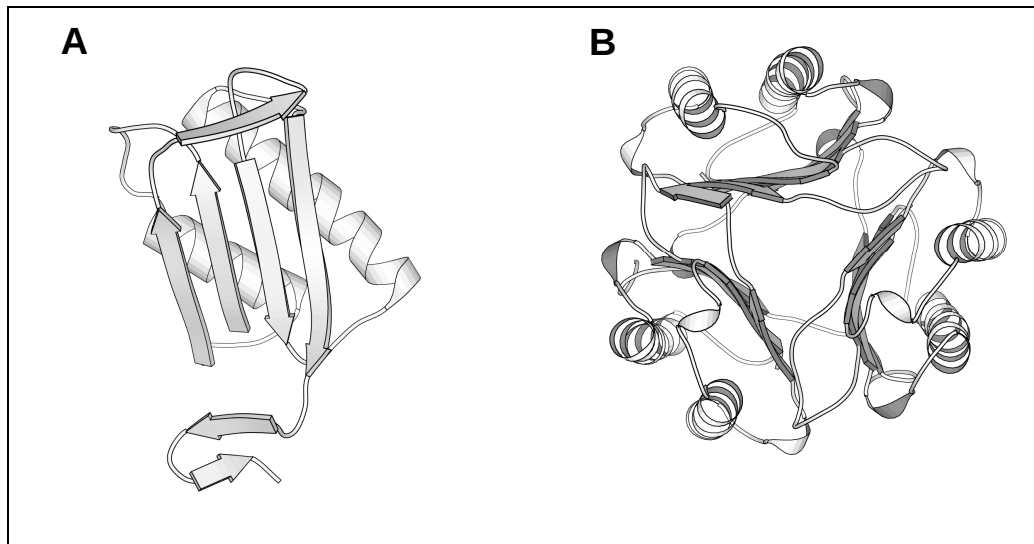


Abb. 1: Dreidimensionale Struktur von humanem MIF (a) MIF-Monomer mit zwei antiparallelen α -Helices, die durch ein β -Faltblatt verbunden sind. (b) MIF-Trimer: Es besteht aus drei identischen MIF-Monomeren. Die drei zentralen β -Faltblätter formen einen Kanal, der durch das Zentrum des Proteins verläuft[15]. Die Pfeile stehen für β -Stränge, Zylinder für α -helicale Bereiche.

Neben den bereits erwähnten, charakteristischen Eigenschaften eines Zytokins sind im Laufe der Jahre zwei katalytische Aktivitäten für MIF beschrieben worden. So wurde 1996 bei der Beobachtung von Melanomzellen die D-Dopachrom-Tautomeraseaktivität von MIF entdeckt [18]. Dabei kommt es zu einer Umwandlung des physiologisch nicht vorliegenden D-Dopachroms zu DHICA. Diese gehören zur Familie der Katecholamine bzw. zu Abbauprodukten von Neurotransmittern, sodass durch die MIF-Wirkung verschiedene Entgiftungsprozesse, vor allem im Gehirn, diskutiert wurden [19].

In weiteren Studien wurde das Vorhandensein einer konservierten CXXC-Sequenz entdeckt, die als Motiv des aktiven Zentrums von Thiol-Protein-Oxidoreduktasen bekannt ist [20, 21]. MIF katalysiert somit die Reduktion von Disulfidgruppen in Polypeptiden wie beispielsweise Insulin.

Zuletzt soll auch die *Glucocorticoid-overriding*-Aktivität an dieser Stelle genannt werden. Diese Funktion von MIF wurde zunächst in T-Zellen beobachtet und beschreibt die Aufhebung der Proliferationsinhibition und Hemmung der Zytokin-Synthese, die durch hohe Glucocorticoidgaben hervorgerufen werden [22]. In ähnlicher Weise wurden periphere Blutmonozyten (PBMC) mit Dexamethason behandelt, was zu einer Unterdrückung der LPS-induzierten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-8 führte. Die Gabe von MIF konnte diese Hemmung aufheben [23].

Obwohl die katalytischen Zentren der Enzymaktivität intensiv untersucht worden sind, konnte eine mögliche biologische Funktion der katalytischen Eigenschaften von MIF bis heute nicht zufrieden stellend geklärt werden [24].

1.1.3 MIF als Zytokin und neuroendokriner Mediator

Zur Familie der Zytokine werden Mediatoren, Proteine und Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 30 kDa gezählt. Sie regulieren die Aktivierung des Immunsystems, die Kommunikation zwischen verschiedenen, meist benachbarten Zellen und das Wachstum und Differenzierungsprozesse verschiedener Zelltypen. Im Gegensatz zu Hormonen, die meist von spezifischen Organen in die Blutbahn abgegeben werden und Neurotransmittern, die aus den Nervenendigungen ausgeschüttet werden, können Zytokine aus vielen verschiedenen Gewebearten sezerniert werden und wirken daraufhin meist parakrin auf umliegende Zellen. Sowohl hämatopoetische als auch nicht-hämatopoetische Zellen sind in der Lage, Zytokine zu synthetisieren und sezernieren.

Mit einem Molekulargewicht von 12,5 kDa wird das MIF-Protein zu den Zytokinen gezählt. Es war zunächst als reines T-Zell-Zytokin bekannt, welches von primären T-Zellen und T-Zelllinien durch mitogene oder antigenspezifische Reize gebildet und ausgeschüttet wird [25, 26]. MIF selber stimuliert wiederum die Proliferation von T-Zellen und hat gleichzeitig proinflammatorische Wirkung auf Makrophagen und Monozyten. Es induziert die Bildung von $\text{TNF-}\alpha$, sowie von O_2^- -Superoxidanionradikalen und des Stickstoffoxids NO [27, 28].

Im Laufe der Zeit wurden weitere Gewebearten als Bildungsort und Zielzellen von MIF gefunden. So sind eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Gewebsmakrophagen und B-Lymphozyten als Bildungsorte bekannt, wobei jedoch auch Tumorzellen vor allem im Gastrointestinaltrakt, in der Prostata und im Bereich der Ovarien immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung rücken [29-33].

Erst im Jahre 1994 wurde MIF als Hormon identifiziert, welches von der Hypophyse als Stresshormon in die Blutbahn sezerniert wird [10]. Die Expression in corticotropen und thyreotropen Zellen und die Kolo-kalisation in sekretorischen Vesikeln mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) ermöglichten es, MIF eindeutig in die Hypothalamus-Hypophysen-Achse einordnen zu können [34]. Wie andere Modulatoren des Immunsystems wird MIF in Stresssituationen aus der Hypophyse freigesetzt und kurze Zeit später in hohen Konzentrationen im Serum vorgefunden. Versuche mit intraperitonealen LPS- und CRH-Stimulationen in Mäusen führten zu einem MIF-Anstieg im Serum über 8 bis 20 h, während die Konzentration in der Hypophyse stark abfiel und zeitversetzt die MIF-mRNA-Konzentration wieder langsam anstieg [31]. Die physiologische MIF-Konzentration im Serum liegt bei 1 bis 15 ng/ml, während unter Stimulation Werte bis 350 ng/ml und in der Meningokokken-Sepsis bis 1000 ng/ml erreicht werden konnten [11, 22].

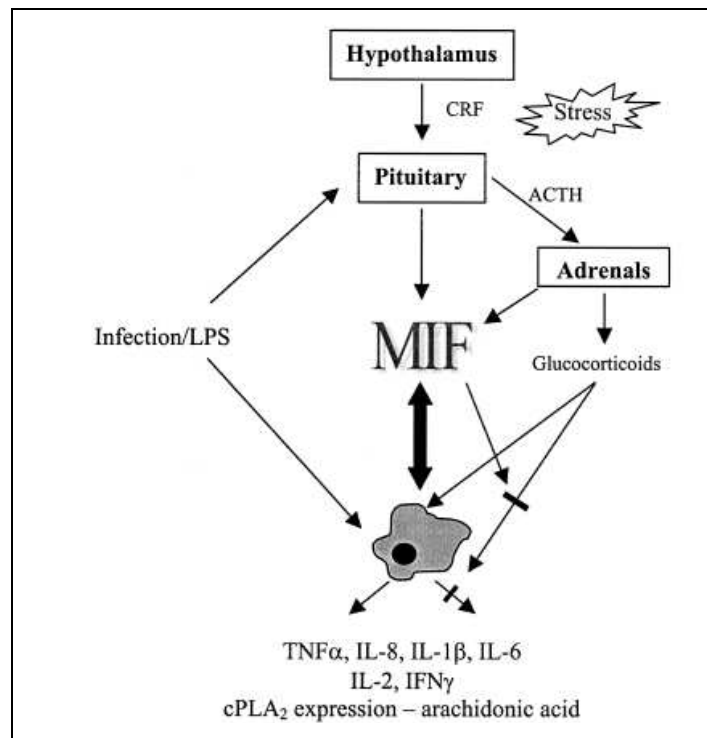


Abb. 2: Die Rolle von MIF als Hormon; MIF wird nach Stimulation durch Stress oder entzündliche Prozesse von der Hypophyse sezerniert und in die Blutzirkulation abgegeben. Dort kann es sowohl die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden aufheben, als auch die Produktion von weiteren Zytokinen, die wichtige pro-inflammatorische Prozesse steuern, anregen (Abbildung aus Baugh *et al.*, 2003).

MIF scheint jedoch auch in weiteren Organen als Hormon wirksam zu sein. So wird es aus β -Zellen des endokrinen Pankreas glukoseabhängig sezerniert und wirkt als Co-Hormon zu Insulin [35, 36]. Es wurde postuliert, dass MIF eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion in Stresssituationen und Entzündungsprozessen einnimmt [37]. Zusätzlich besitzt es eine Glucocorticoid-antagonistische Wirkung, die zuvor schon beschrieben wurde. Dieser Mechanismus ist ebenfalls vor allem bei der Bewältigung von schweren Infektionen und Traumata notwendig, bei denen die Immunantwort aufrechterhalten werden muss. Allein durch Glucocorticoide würde die Immunantwort nur weiter gehemmt werden [38].

1.1.4 Makrophagen als Produzenten und Zielzellen

Während der Makrophage ursprünglich nur als MIF-Zielzelle angesehen wurde, konnten Calandra *et al.* 1994 zeigen, dass MIF sowohl in ruhenden Makrophagen also auch in primären Monozyten synthetisiert und in größeren Mengen gespeichert wird [39]. Stimulationen mit $\text{TNF-}\alpha$, dem *toxic-shock-syndrome toxin-1* (TSST-1) und Lipopolysacchariden (LPS) führten zu einer erhöhten MIF-Synthese und Sekretion [40].

Makrophagen dienen jedoch nicht nur als MIF-Produzenten, sondern konnten auch als Zielzellen nach proinflammatorischen Stimuli identifiziert werden [41]. In genau umgekehrter Art und Weise wird dabei die Bildung von TNF- α , Interleukin-1, -6 und -8 induziert. Die Zellen werden zu Abtötung des intrazellulären Parasiten *Leishmania major* angeregt [42]. Zusätzlich reguliert MIF die Phagozytose und die Adhäsionsfähigkeit von Makrophagen und wirkt dabei meist in autokriner und parakriner Weise [43]. Jedoch wurden auch anti-inflammatorische Effekte von MIF beschrieben.

1.2 Molekulare Mechanismen der MIF-Produktion und -Wirkung

1.2.1 MIF-Rezeptormechanismen und -komplexe

Obwohl MIF schon im Jahre 1989 kloniert wurde, konnte lange Zeit kein passender Rezeptor identifiziert werden. Die verschiedenen Wirkungsmodelle beruhten stets auf rezeptorvermittelten Signalprozessen, die jedoch durch Versuche der Rezeptorisolierung nicht bestätigt werden konnten [44, 45].

Erst 2007 wurden die Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR2 als funktionelle MIF-Rezeptoren identifiziert. Dabei kommt es zu einem kompetitiven Mechanismus der MIF-Bindung neben den bekannten Liganden von CXCR2 und CXCR4. Zusätzlich wurde von Bernhagen *et al.* mit Hilfe der Konfokalmikroskopie beobachtet, dass CXCR2 und das MHC-II-Chaperon CD74 kolokalisieren. Weitere Koimmunopräzipitationen belegten, dass die beiden Komponenten einen Komplex bilden, über den eine Signaltransduktion von MIF intrazellulär ablaufen kann [46].

Schon 2003 war von Leng *et al.* CD74 als MIF-Bindungsstelle angenommen worden, über welche MIF die MAP-Kinase-Signal-Kaskade aktivieren und somit die Zellproliferation beeinflussen kann [47].

Der CD-74-Rezeptor scheint auch im Tumorgewebe eine wichtige Stellung einzunehmen. So wurde unter Gabe von Anti-CD74-Antikörpern eine erniedrigte Zellproliferation, Tumordinvasion und MIF-Sekretion von androgen-unabhängigen Prostata-Karzinom-Zellen (DU-145) beobachtet [48]. Interessanterweise kann MIF in Abwesenheit von CXCR2 an CD74 binden, wie z.B. in T-Zellen gezeigt wurde, sodass davon ausgegangen werden muss, dass CXCR2/4 und CD74 einen funktionellen Rezeptorkomplex bilden können. In diesem verstärken sich die beiden beschriebenen Signalwege gegenseitig. Funktionelle Studien in vivo in atherosklerotischen Mausmodellen zeigten, dass die stärksten proatherogenen Effekte von MIF bei der Expression beider Rezeptoren zu erkennen sind [46].

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass CD74 nicht alleine, sondern im Komplex mit CD44 fungiert. Bindung von MIF an diesen Komplex führt zu einer Serin-Phosphorylierung von CD74 und CD44. Die durch MIF hervorgerufene ERK1/2-Aktivierung läuft ebenfalls über

nach der MAP-Kinase-Aktivierung bis zur Proliferationsförderung ist jedoch noch weitgehend ungeklärt, wobei die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Histonkomplexen diskutiert wird [52]. Ebenso sind auch die genauen Effekte von MIF, die das Protein über diesen Weg auslösen, noch nicht ausreichend bestimmt worden.

Zusammenfassend ruft die MIF-Stimulation über den ERK-MAPK-Weg somit zum einen Ausschüttung von Arachidonsäuren durch die Phospholipase A2 hervor, womit sich der Glucocorticoid-Overriding-Effekt erstmals erklären ließ. Jedoch wird heute eher ein Ablauf dieses Weges über MKP1 angenommen. Als Begeleiteffekt überschreibt die Arachidonsäureausschüttung die suppressiven Effekte von Glucocorticoiden, was nach TNF- α -Stimulation gezeigt werden konnte. Zum anderen muss jedoch auch klar die Funktion von MIF als möglicher Ersatz von Wachstumsfaktoren beachtet werden, mit deren Hilfe Proliferationsprozesse reguliert werden können.

1.2.3 MIF-Signaltransduktion über Akt

Bindung von MIF an den CD74-Rezeptor führt zu einer weiteren intrazellulären Signaltransduktion über die SRC-Kinase und den PI3K-Akt-Weg. Die dadurch hervorgerufene Akt-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung der proapoptotischen Proteine BAD und Foxo3a [53]. Diese Aktivierung kann sowohl über exogenes MIF als auch über Stimulation der autokrinen MIF-Schleife hervorgerufen werden [51]. Durch die Phosphorylierung von BAD kann das Molekül die antiapoptotische Funktion von Bcl2 nicht mehr hemmen und der mitochondriale Apoptose-Weg wird unterbrochen. Somit schützt MIF die Zelle vor dem programmierten Zelltod [54].

Zusätzlich scheint Akt die I κ B-Kinase zu phosphorylieren, was zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, der die Apoptose ebenfalls verhindert (Abb. 4).

Der MIF-Signalweg über Akt kann durch JAB1 reguliert werden, welches mit intrazellulär gespeichertem MIF interagiert und somit, wie schon zuvor beschrieben, die Sekretion beeinflusst [24]. Die Interaktion der beiden Komponenten führt zu einer reduzierten Akt-Aktivierung über autokrin sezerniertes MIF.

Außerdem wird vermutet, dass die MIF-regulierte Akt-Stimulation einen wichtigen Prozess in der Tumorentstehung darstellt. Interessanterweise gehen viele Therapieansätze in die Richtung, die Akt-Aktivierung durch MIF zu unterbinden [55-57]. Würde sich diese Vermutung bestätigen, so könnten Inhibitoren des PI3K-Akt-Weges als medikamentöse Ansätze zur Hemmung der Tumorneubildung und eventuell zur Hemmung der weiteren Proliferation von Karzinomgewebe eingesetzt werden.

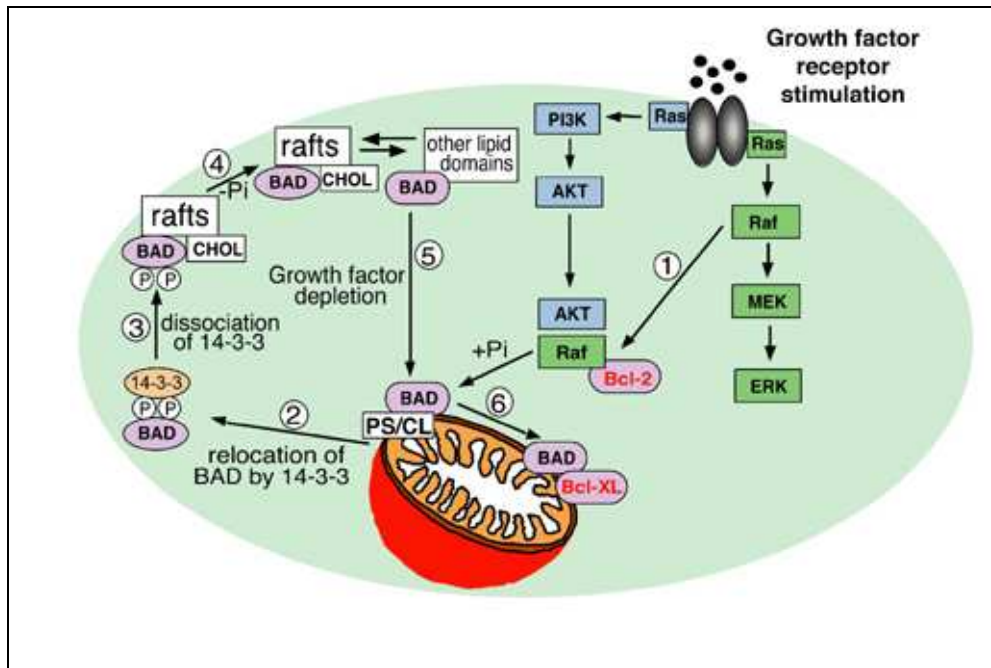


Abb. 4: Der PI3K-Akt-Weg beeinflusst die Apoptose von Zellen. Die Funktion des pro-apoptotischen Proteins Bad wird durch Phosphorylierung gesteuert, wobei Bad durch Aktivierung des Akt-Weges phosphoryliert wird. Die Bindung von 14-3-3 Proteinen an phosphoryliertes Bad resultiert in der Verlagerung des Bad/14-3-3 Komplexes aus der Mitochondrienmembran ins Zytosol (2). Aufgrund seiner hohen Affinität zu cholesterinhaltigen Membranen interagiert Bad mit diesen (3), wodurch der Bad/14-3-3 Komplex dissoziiert und die Dephosphorylierung ermöglicht wird (4). Somit kann die Apoptose unterbunden werden. (Abbildung verändert nach einem Bild der Universität Würzburg).

1.2.4 MIF-Sekretion

Von Bernhagen *et al.* wurde im Rahmen der Identifikation von MIF als Hormon auch seine Lokalisation in sekretorischen Vesikeln in der Hypophyse beschrieben. Nach LPS-Stimulation wird das Protein sowohl aus den vorgeformten *pools* als auch nach *de-novo*-Synthese ausgeschüttet [10]. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass MIF in sekretorischen Vesikeln verpackt nach der Verschmelzung mit der Plasmamembran auf dem klassischen Weg aus der Zelle entlassen wird. Jedoch besitzen sekretorische Proteine gewöhnlich eine hydrophobe Signalsequenz am N-terminalen Ende des Vorläufer-Peptides, die nach dem Transfer über die ER-Membran abgespalten wird [58]. MIF besitzt jedoch weder eine solche Signalsequenz noch eine interne Signalsequenz, die Proteine in verschiedene Kompartimente dirigiert.

Im Jahre 2003 wurde von Flieger *et al.* der Sekretionsweg von MIF zumindest teilweise aufgeklärt [59]. So wird MIF nicht über den klassischen Weg sezerniert, sondern mit Hilfe von ABC-Transporterproteinen, die unabhängig von einer konstanten Energieversorgung niedermolekulare Stoffe, Peptide und Proteine über die Membran transportieren können. Während in der Literatur relativ gute Übereinstimmungen über die Zellarten besteht, die MIF enthalten und sezernieren, ist der MIF-Gehalt pro Zelle umstritten. So variieren beispielsweise in Makrophagen die gemessenen Werte zwischen 9,6-16 fg und 0,1-1 pg pro

Zelle [39, 60]. Die Sekretion in Überstände kann nicht nur durch LPS, sondern auch durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , TSST-1 und PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*) hervorgerufen werden [26, 39, 60].

1.3 Rolle von MIF bei Krankheitsprozessen

1.3.1 Bakterielle Sepsis und septischer Schock

Die bakterielle Sepsis gehört zu den häufigsten Todesursachen, die besonders bei älteren, immunsupprimierten und kranken Patienten schnell lebensbedrohlich werden kann. Eine Sepsis wird nach der WHO definiert als eine vermutete oder bestätigte Infektion, bei der zusätzlich mindestens zwei Kriterien des so genannten systemischen inflammatorischen *response*-Syndroms erfüllt sind (Tab. 1) [61]. Tritt zusätzlich eine systemische Hypoperfusion auf, so spricht man vom septischen Schock, der eine akute Lebensgefahr darstellt.

Systemisches inflammatorisches <i>Response</i> -Syndrom (SIRS)
• Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
• Tachykardie: Herzfrequenz > 90/min
• Tachypnoe: Atemfrequenz > 20 oder Hyperventilation (PaCO₂ < 33mmHg)
• Leukozytose > 12000 Leukozyten/mm³ oder Leukopenie < 4000/mm³ oder > 10 % unreife Granulozyten im Differentialblutbild

Tab. 1: Kriterien des systemischen inflammatorischen *response*-Syndroms (SIRS). Betrachtet werden verschiedene klinische Parameter, wobei zur Diagnosestellung mindestens zwei Kriterien erfüllt sein müssen. Liegen ein SIRS und eine Infektion vor, so spricht man von einer Sepsis (nach den Leitlinien der deutschen Sepsis-Gesellschaft).

Im Rahmen dieses Erkrankungskomplexes scheint MIF von entscheidender Bedeutung zu sein. So wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass intraperitoneale LPS-Injektionen in hohen Konzentrationen zum septischen Schock mit einer Letalitätsrate von annähernd 100% führen. Die Gabe von rMIF beschleunigt dabei deutlich die Zeitspanne bis zum Exitus, während MIF-*knockout*-Mäuse resistent sind [62]. Ebenso wirken MIF-Antikörper, die mit LPS zusammen injiziert wurden, den Symptomen des septischen Schocks entgegen und schützen somit vor der Endotoxämie [10].

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei einer bakteriellen Sepsis beobachtet werden, die durch intraperitoneale *E.coli*-Injektion hervorgerufen wurde. Anti-MIF-Antikörper zeigten auch noch 8 h nach Sepsisbeginn einen deutlichen Schutz vor den letalen Folgen der bakteriellen Peritonitis in Kombination mit einem septischen Schock [63, 64].

Neue klinische Studien haben gezeigt, dass MIF vor allem in späten Phasen der Sepsis in großen Mengen in die Blutzirkulation sezerniert wird. Somit wäre eine Therapie mit Anti-MIF-

Antikörpern ein guter Therapieansatz zur Vermeidung der kardiovaskulären Dysfunktionen im späten Stadium der Sepsis und des septischen Schocks [65, 66]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass ein Anstieg der MIF-Konzentration im Serum vom ersten auf den zweiten Tag der Sepsis ein deutlich erhöhtes Risiko darstellt, sodass aggressivere Therapieformen angewandt werden müssen [64, 67].

1.3.2 Akute und chronische Entzündungsprozesse

MIF ist ein Schlüsselmolekül in den verschiedensten Entzündungsprozessen, wobei ständig neue Erkrankungen mit MIF-Beteiligung entdeckt werden.

So wurde von Donnelly *et al.* und von Martin *et al.* beobachtet, dass die MIF-Konzentration im Blut und in den Alveolen beim *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) deutlich erhöht ist gegenüber gesunden Patienten [68, 69]. Vor allem die infiltrierenden Makrophagen in der Lavage-Flüssigkeit wiesen hohe MIF-Konzentrationen auf. Doch nicht nur bei akut-entzündlichen Prozessen der Lunge wurde MIF als wichtiger Faktor beobachtet, sondern auch bei Asthmapatienten zeigte sich eine deutlich erhöhte MIF-Konzentration schon in unstimulierten, zirkulierenden Eosinophilen, die damit auch in der Lage sind nach Stimulation erhöhte Mengen des Makrophagen-migrationsinhibierenden-Faktors zu sezernieren [29, 70]. Im Bereich der entzündlichen Darmerkrankungen wurde ebenfalls eine MIF-Beteiligung entdeckt, wobei de Jong *et al.* die Wirkung des Anti-MIF-Antikörpers hervorhoben, der sowohl präventiv als auch therapeutisch vor allem bei M. Crohn eingesetzt werden könnte [71].

Hohe MIF-Konzentrationen zeigten sich ebenso sowohl in Entzündungsherden als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis, wobei T-Zellen, Makrophagen und Synovialzellen als MIF-Sekretionsort identifiziert werden konnten [72-76]. Anti-MIF-Antikörper reduzieren wiederum die Immunantwort und zählen somit zu den Therapieoptionen.

Im Bereich der Atherosklerose wurde eine verstärkte MIF-Expression in den Läsionen der Gefäßwand gefunden, wobei nur die vaskulären Endothelzellen als Syntheseort identifiziert werden konnten, nicht aber die glatten Muskelzellen [77, 78]. Zusätzlich scheint MIF die Synthese des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 zu verstärken und die Entzündungsreaktion der Intima durch Zelleinwanderung zu fördern [79]. Eine Therapie mit Blockade der MIF-Wirkung führte im Maus-Modell zu einer deutlichen Reduktion der inflammatorischen Parameter [80]. Seit einigen Jahren wird nun auch ein Link zwischen rheumatoider Arthritis und der Atherosklerose vermutet, der auf einer MIF-Wirkung beruht [50].

Weitere Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Glomerulonephritis und die disseminierte intravasale Koagulopathie scheinen ebenfalls durch MIF reguliert und beeinflusst zu werden [81, 82].

1.3.3 Tumorgenese

Im Laufe der Zeit hat eine Reihe von Arbeiten gezeigt, dass MIF eine bedeutende Rolle in Angiogenese und Tumorgenese einnehmen könnte. So wurde zunächst beobachtet, dass MIF die Aktivität des Tumorsuppressorgens p53 hemmt und in diesem Zusammenhang sogar eine chronische Inaktivierung möglich ist, die zur Förderung des Tumorwachstums beiträgt [83].

In etwa zeitgleich beobachteten Takahashi *et al.*, dass Wachstumsfaktoren in Colon-Karzinomzellen der Maus eine erhöhte MIF-Expression hervorrufen können [84].

Ebenso wurden in Prostatakarzinomen, Tumorgewebe der Blase und in Endometriums- und Ovarialtumoren erhöhte MIF-Konzentrationen gefunden und ihre positive Wirkung auf die Zellproliferation bestätigt [48, 85-88]. Die Anti-MIF-Antikörperbehandlung führte in verschiedenen Mausmodellen zu einer reduzierten Tumorangiogenese und Zellproliferation, wobei der Signalweg noch nicht vollständig geklärt werden konnte [89-91].

Zusätzliche Untersuchungen konnten zeigen, dass die MIF-Konzentration auch im Serum von Tumorpatienten signifikant erhöht vorliegt, sodass sich daraus in Zukunft eine diagnostische Möglichkeit ergeben könnte [88].

1.4 Mammakarzinome

1.4.1 Epidemiologie der Mamma-Karzinome

Das Mamma-Karzinom stellt weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Nach Angaben der IARC (*International association on research of cancer*) erkrankten jährlich 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs, wobei 410.000 daran versterben [92].

Nach den neusten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts liegt in Deutschland die Zahl der Neuerkrankungen bei 55.000 Fällen pro Jahr, während die Anzahl der Sterbefälle bei 18.000 liegt. Das Risiko einer Frau in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken, liegt zwischen 9% und 10 %, sodass jede 10. bis 11. Frau betroffen ist [93]. Jede 40. bis 50. Frau in Deutschland wird an einem Mamma-Karzinom versterben. Besonders auffällig ist, dass das mittlere Erkrankungsalter bei 62 Jahren liegt und somit 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für bösartige Tumoren insgesamt. Im Vergleich zu anderen Ländern liegt die Brustkrebsinzidenz in Deutschland im oberen Mittelfeld. So liegt sie in den USA in etwa 20% höher, während Japaner deutlich seltener erkranken und eine um 50% reduzierte Inzidenz im Vergleich zu Deutschland aufweisen können [94].

Betrachtet man die verschiedenen Statistiken und Hochrechnungen, so zeigt sich deutlich die Wichtigkeit der Forschung in diesem Bereich, sodass in Zukunft neue, effektivere Therapieoptionen und Früherkennungsverfahren zur Verfügung stehen.

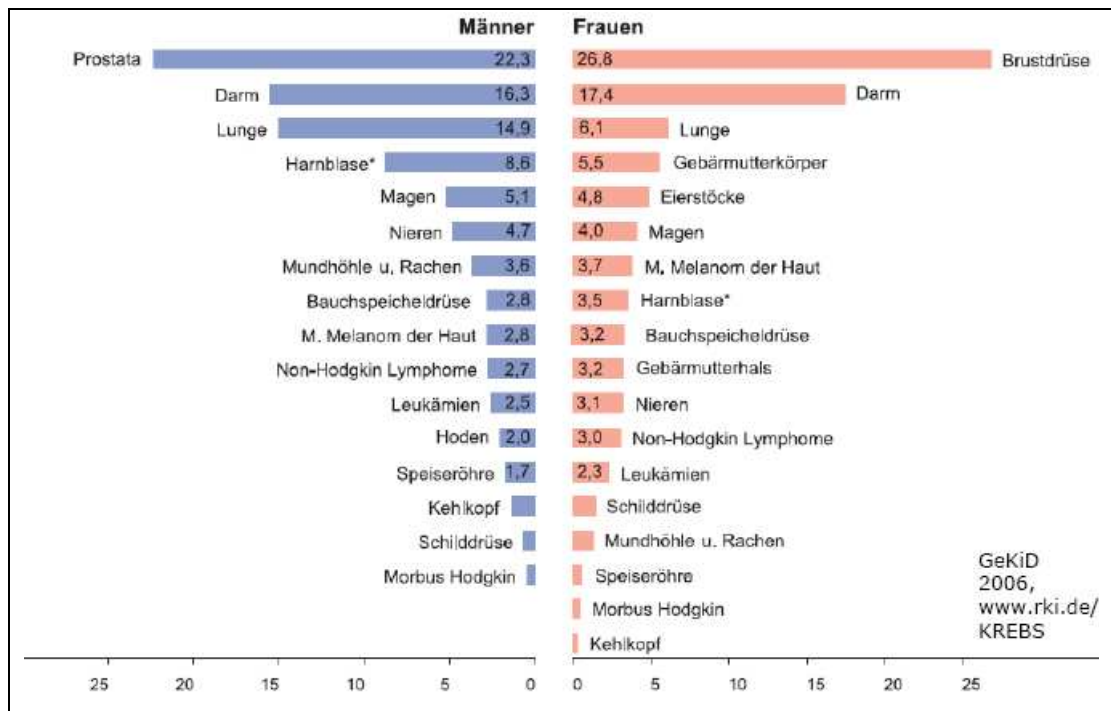


Abb. 5: Häufigste Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahre 2002 (GEKID 2006). Mamma-Karzinome liegen bei Frauen mit 26,8 % Neuerkrankungen pro Jahr deutlich vor der Erkrankungsrate an weiteren Tumoren der Lunge oder des Darms. Die Neuerkrankungsrate übersteigt sogar die häufigste Tumorart beim Mann, den Prostatakrebs.

1.4.2 Allgemeine und histopathologische Prognosefaktoren

Die häufigsten Tumoren der Brust sind benigne und fallen in die Kategorie der fibrozystischen Mastopathien oder der Fibroadenome. Diese Gewebeveränderungen wachsen langsam und nicht-infiltrativ, sodass viele Therapieoptionen, wenn überhaupt notwendig, zur Verfügung stehen. Im Rahmen der Forschung wird das Augenmerk eher auf die bösartigen Neoplasien gelenkt, die in verschiedenen Formen auftreten können.

Maligne Mamma-Karzinome können histopathologisch zunächst nach ihrem jeweiligen Ausgangsgewebe in epitheliale (Karzinome) und vom Stroma ausgehende (Sarkome) Tumoren unterteilt werden. Die meisten Brusttumoren sind vom epithelialen Typ und können weiter subklassifiziert werden. So unterscheidet man die *Carcinoma in situ* von den invasiven Karzinomen, wobei in jeder Unterklasse noch einmal nach der Lage des Tumors in lobulär und duktal differenziert wird.

Die häufigsten bösartigen Tumoren sind vom dukalen Typ und liegen im oberen, äußeren Quadranten der weiblichen Brust. Zur Unterscheidung der *Carcinoma in situ* von den invasiven Tumoren wird der Durchbruch der Basalmembran als Ausgangspunkt herangezogen (Abb. 6). Sobald diese dünne Zellschicht in ihrer Kontinuität unterbrochen wird, kann sich der Tumor ungehindert im umgebenden Stroma ausbreiten und die utgefäße als Voraussetzung für Metastasenbildung erreichen [95].

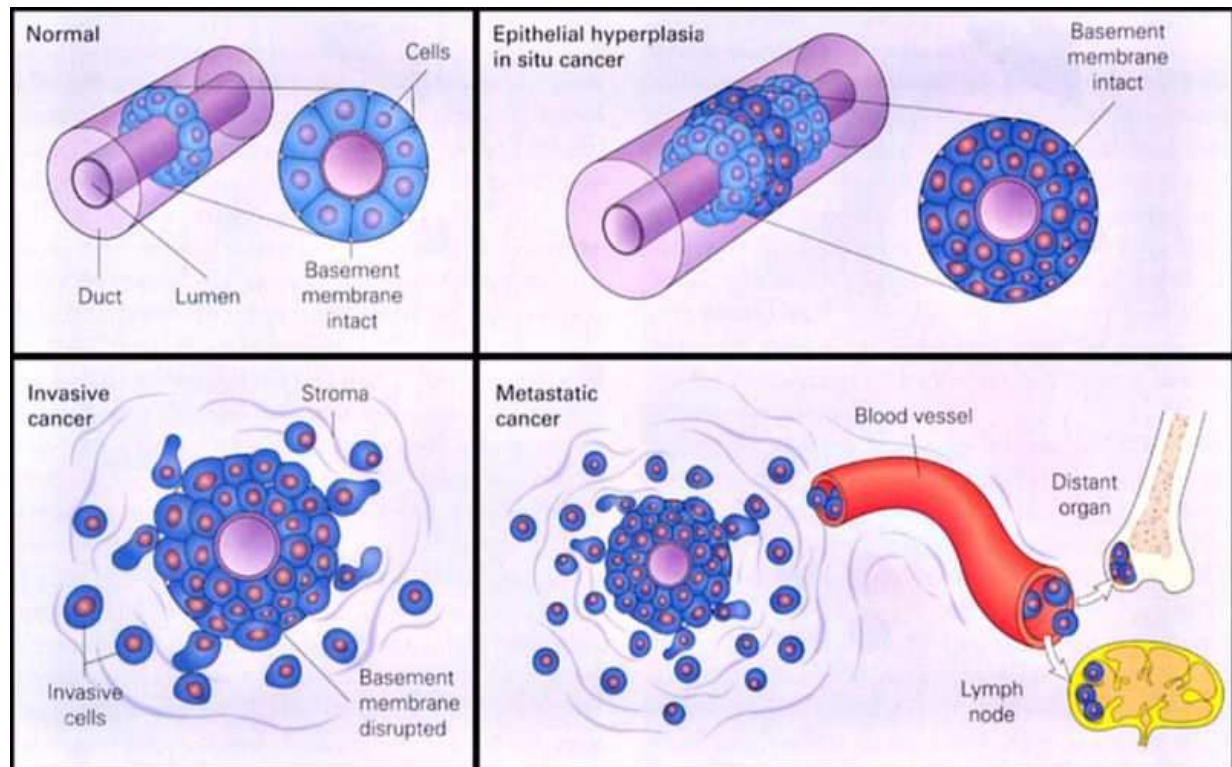


Abb. 6 : Stadien der Tumorentwicklung vom normalen, gesunden Brustepithelgewebe zum invasiven, metastasierendem Karzinom [95]. In normalem Epithelgewebe ist die Basalmembran gut erhalten und die Zellen liegen in einem normalen Verhältnis zur Extrazellulärmatrix vor. Durch Hyperplasie entsteht ein epitheliales *Carcinoma in situ*, bei dem die Basalmembran noch erhalten ist. Im Folgestadium, dem invasiven Karzinom, ist diese dünne Membran durchbrochen und die Zellen können in das umgebende Stroma einwandern. Gelangen die abgesiedelten Zellen in die nahe gelegenen Blut- oder Lymphgefäße, so kommt es zur Metastasenbildung und einer Streuung des Tumorgewebes im gesamten Organismus.

Viele Studien haben sich mit der Frage befasst, ob eine *multistep*-Karzinogenese existiert, bei der sich ein invasiver Tumor aus gesundem Gewebe über die Stufen atypische Hyperplasie und *Carcinoma in situ* (CIS) entwickelt [96, 97]. Jedoch wurde beobachtet, dass nicht alle invasiven Tumoren aus einem duktalem CIS hervorgehen, sodass man heute nicht mehr davon ausgeht, dass alle Hyperplasien Vorläufer von invasiven Tumoren darstellen bzw. dass diese Vorstufen nötig sind, um invasive Tumoren entwickeln zu können [98, 99].

Zu den typischen allgemeinen Risikofaktoren des Mamma-Karzinoms zählen, neben der Tumorlokalisation und seiner Ausbreitung, das Alter der Patientin, das weibliche Geschlecht, die familiäre Häufung von Tumoren der Brust, Alkoholkonsum und der Estrogen- bzw. Androgenstatus [100-102].

Im Laufe der letzten Jahre wurden vor allem Risikofaktoren auf molekularer Ebene diskutiert. So scheint die Überexpression des *human epidermal growth factor receptors 2*, dem Rezeptor für EGF, in Mamma-Tumoren die Prognose deutlich zu verschlechtern und somit auch die Therapie zu bestimmen [103, 104]. Je höher die Expressionsrate des HER-2-Rezeptors liegt, umso schlechter wird die Prognose des Karzinoms eingeschätzt [105]. In

Tumorzellen, in denen HER-2 überexprimiert wird, notwendig ist, jedoch nur wenn der Wachstumsfaktor EGF fehlt. Somit kann Akt das Wachstums- und Überlebenssignal von EGF simulieren und kompensieren [106].

Weitere wichtige Prognosefaktoren, vor allem im Bereich der Metastasenbildung, sind das PA-Protein (*plasminogen activator*) und das PAI-1-Protein (*plasminogen activator inhibitor 1*), welche in hohen Konzentrationen eine sehr schlechte Prognose angeben. So führten Meryet-Figuières *et al.* Untersuchungen an MDA-MB-231-Zellen durch, in denen mit Hilfe von siRNA spezifisch die Expression von PAI-1 gehemmt wurde. Es kam zu einer verminderten Synthese und Sekretion und somit zu einer verbesserten Prognose [107].

Zuletzt wird auch seit Langem immer wieder der Einfluss von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise VEGF, auf die Zellproliferation und die Prognose von Mamma-Tumoren untersucht. Während Lee *et al.* eine Überexpression in Tumorgewebe beobachten konnten und somit einen Zusammenhang zwischen Prognose und VEGF-Konzentration vermuteten, konnte in einer neuen Studie gezeigt werden, dass VEGF kein sinnvoller Marker für die Bestimmung der Prognose darstellt [108, 109].

1.4.3 Diagnostik und Therapie

In der gynäkologischen Routinediagnostik wird nach einem auffälligen Tastbefund eine Sonographiekontrolle durchgeführt, um mögliche Zysten auszuschließen, die mit Hilfe von Ultraschalluntersuchungen sicher diagnostiziert werden können. Im weiteren Verlauf werden vermutete Tumoren in der Mammographie abgesichert, wobei diese Methode keinen Unterschied zwischen benignen und malignen Neoplasien feststellen kann. Eine Feinnadel-Stanzbiopsie, bei der mehrere Gewebeproben aus dem auffälligen Areal gewonnen werden, gibt nach histopathologischer Auswertung Aufschluss über die Klassifikation des Tumors.

Zusätzliche diagnostische Maßnahmen wie MRT, CT und PET, sowie Röntgen der Knochen und Szintigraphien sind nur in der weiterführenden Tumordiagnostik sinnvoll, um beispielsweise den Lymphknotenbefall oder eine mögliche Metastasierung feststellen zu können [110, 111].

Die Therapiekonzepte sind vor allem im Bereich von Mamma-Tumoren sehr breit gefächert, sodass an dieser Stelle exemplarisch nur die Grundprinzipien dargestellt werden sollen. Die groben Therapievorschlüsse besagen, dass im Frühstadium eine Heilung angestrebt wird, beim metastasierenden Karzinom eine Lebenszeitverlängerung und im Spätstadium eine palliative Behandlung der Symptome.

Bei großen Tumoren oder solchen in ungünstiger Lage mit guten Heilungschancen wird eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt, um eine Verkleinerung des Tumorgewebes zu erreichen. Dies erfolgt häufig vor dem eigentlichen chirurgischen Eingriff, bei dem die möglichst vollständige Entfernung des Tumorgewebes im Vordergrund steht [112, 113].

Zunächst wird immer eine brusterhaltende Operation angestrebt, jedoch sind oft aufgrund von Tumorgröße und weiteren Verwachsungen mit dem umliegenden Gewebe nur Mastektomien möglich. Dabei wird der gesamte Brustdrüsenkörper entfernt, was vor allem auch bei multizentrischen oder multifokalen Karzinomen indiziert ist. Zusätzlich wird in den heutigen neuen Operationsverfahren der so genannte Sentinel-Lymphknoten entnommen, bei dem es sich um die erste Lymphknotenstation im Bereich des Tumors handelt [114-117]. Im folgenden Zeitintervall werden die hormonunabhängigen Tumoren zu 90% mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt, wobei die Zytostatika sehr von den histopathologischen Befunden des Tumorgewebes abhängen. Bei hormonsensitiven Tumoren wird meist postoperativ auf eine Chemotherapie verzichtet, wobei die aggressiven HER2-positiven Karzinome eine Ausnahme darstellen [111].

Zusätzlich werden fast alle betroffenen Patientinnen postoperativ bestrahlt, um kleine Tumorreste zu eliminieren und das Rezidivrisiko zu verkleinern [118, 119]. Weitere mögliche Therapieoptionen beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern gegen den HER2-Rezeptor (Trastuzumab) sind erst seit einigen Jahren in die Therapieschemata eingegangen [104, 120, 121].

1.4.4 Zytokine und Entzündungsmechanismen

Viele Studien haben sich in den vergangenen Jahren mit dem Zusammenhang zwischen der Tumorgenese in Mammagewebe und vorausgegangenen oder begleitenden Entzündungsprozessen befasst. Dabei ergab sich, dass Immunzellen die Karzinomentwicklung durch funktionelle Regulation von Epithelzellen beeinflussen und sogar fördern können [122, 123].

Wird die Gewebemöostase aus dem Gleichgewicht gebracht, so sezernieren gewebeständige Makrophagen und Mastzellen lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und weitere bioaktive Moleküle, von denen eine zusätzliche Auswirkung auf die Mobilisierung von Lymphozyten ins Gewebe vermutet wird [124, 125]. Dieses Gesamtkonzept scheint im akuten Prozess eine anti-neoplastische Wirkung ("natürliche Immuntherapie") zu haben. Frühe entartete Zellen werden eliminiert, indem Th1-CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen Makrophagen aktivieren und mit Hilfe von Granzymen und Perforinen ebenfalls an der Eradikation beteiligt sind. Zusätzlich aktivieren T-Helferzellen B-Zellen, die im akuten Entzündungsprozess mit sezernierten Immunglobulinen zur Destruktion des Tumors beitragen [126]. Jedoch zeigt sich bei chronischer Aktivierung des Immunsystems ein paradoxes pro-tumoröses Verhalten. B-Zellen sezernieren Zytokine und Immunglobuline, die die Proliferation von Tumorgewebe fördert. So zeigten Whitford *et al.* mit Hilfe der Durchflusszytometrie, dass die B-Zell-Population in Sentinel-Lymphknoten mit den Stadien des Brustkrebs ständig zunimmt

[127, 128]. Weitere Studien bestätigten, dass eine B-Zell-Aktivierung im chronischen Prozess mit der dazugehörigen Immunglobulinbildung eine schlechte Prognose von Mamma-Tumoren und auch anderen Karzinomen darstellt [129, 130].

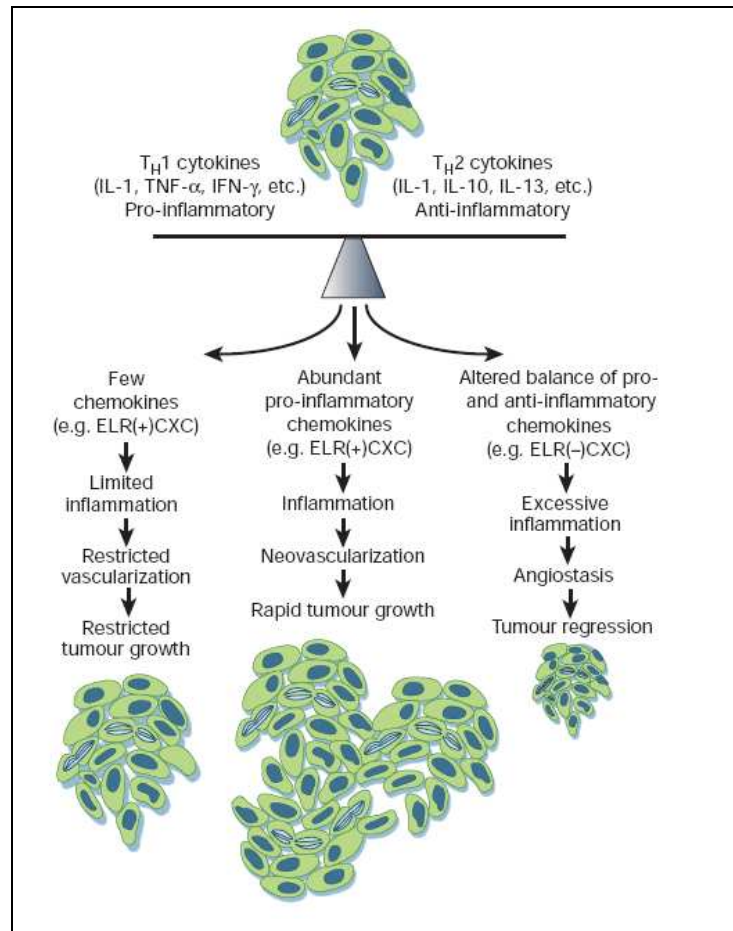


Abb. 7: Modelldarstellung der Auswirkungen von akuten und chronischen Entzündungsprozessen auf tumoröses Gewebe. Während TH-1-Zellen in akuten Entzündungen Anti-Tumor-Zytokine sezernieren, schütten TH-2-Zellen eher pro-tumoröse Faktoren aus, die als Wachstumsfaktoren zusammen mit den Immunglobulinen der chronisch-aktivierten B-Zellen wirken [124].

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass B-Zellen eine wichtige Funktion in der frühen Entwicklungsphase von malignen Neoplasien innehaben, während T-Lymphozyten vor allem in *High-Grade*-Tumoren zu finden sind [131]. Dabei scheint die CD4⁺/CD8⁺-Ratio von besonderer Bedeutung zu sein. Liegt diese oberhalb von eins, so beobachteten Kohrt *et al.* einen verstärkten Lymphknotenbefall und eine verminderte Überlebenszeit [132]. Zusätzlich überwiegen Th2-Zellen, die über ihre Interleukin-Sekretion ebenfalls die Tumorphilierung und Differenzierung in chronisch-entzündetem Gewebe fördern können. Regulatorische T-Zellen tragen durch Ausschüttung des *transforming growth factor beta* (TGF- β) zur Tumorausbildung bei [133].

Zusätzlich wurde kürzlich eine Aktivierung des Akt-Signalweges in Tumorzellen entdeckt, welche durch eine proinflammatorische Umgebung hervorgerufen wird [134].

Somit zeigt sich insgesamt eine deutliche Verbindung zwischen Entzündungsprozessen und Tumorgenese, wobei die Einzelschritte noch lange nicht vollständig geklärt sind. Doch neueste Ansätze in der Tumorthherapie versuchen, das Immunsystem und seine pro-tumorösen Veränderungen zu beeinflussen und somit am Entstehungsprozess von Karzinomen anzugreifen [135].

1.4.5 Wechselwirkung von Makrophagen und Tumorzellen beim Mamma-Karzinom

Makrophagen können auf verschiedenen Wegen mit Tumorzellen interagieren. In diesem Zusammenhang werden die Makrophagen als *tumor-associated-macrophages* (TAMs) bezeichnet, die über Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Entwicklung von Tumorgewebe fördern [136]. Hagemann *et al.* untersuchten die Wirkung von TNF- α , das aus TAMs ausgeschüttet wird und über den NF- κ B-Weg zu einer erhöhten MIF-Expression führt. Über diesen Signalweg wird die Invasion der Tumorzellen signifikant gesteigert [137]. Zusätzlich haben Mausmodelle in den vergangenen Jahren gezeigt, dass die Anzahl der Makrophagen im Tumorgewebe mit der Angiogenese, der Anzahl der befallenen Lymphknoten und der Überlebensrate korreliert [138, 139]. Die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie VEGF bewirken ein proliferationsförderndes Verhalten der gewebeständigen Makrophagen [140].

Somit versuchen neue therapeutische Konzepte an der Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Tumorzellen anzugreifen, um Tumorgenese schon in frühen Stadien zu unterbinden [141].

1.5 Verhalten von Tumorzellen

In den folgenden Abschnitten soll kurz das Verhalten von Tumorzellen beschrieben werden. Aufgrund der umfassenden Studienlage soll das Augenmerk jedoch, soweit bereits Informationen in der Literatur vorhanden sind stets auf Mamma-Karzinome in Kombination mit der Wirkung von MIF gelenkt werden.

1.5.1 Adhäsion

Die Adhäsion von Tumorzellen beschreibt ihre Fähigkeit zur Anhaftung an der Extrazellulär-matrix und die damit verbundenen Signalwege. In diesem Zusammenhang sind Integrine als heterodimere Oberflächenmoleküle von besonderer Bedeutung [142]. Zum Einen bewirken

sie intrazellulär eine Anheftung des Aktin-Zytoskelettes an die Zellmembran, zum Anderen regulieren sie extrazellulär die Wechselwirkung mit Matrix-Molekülen [143].

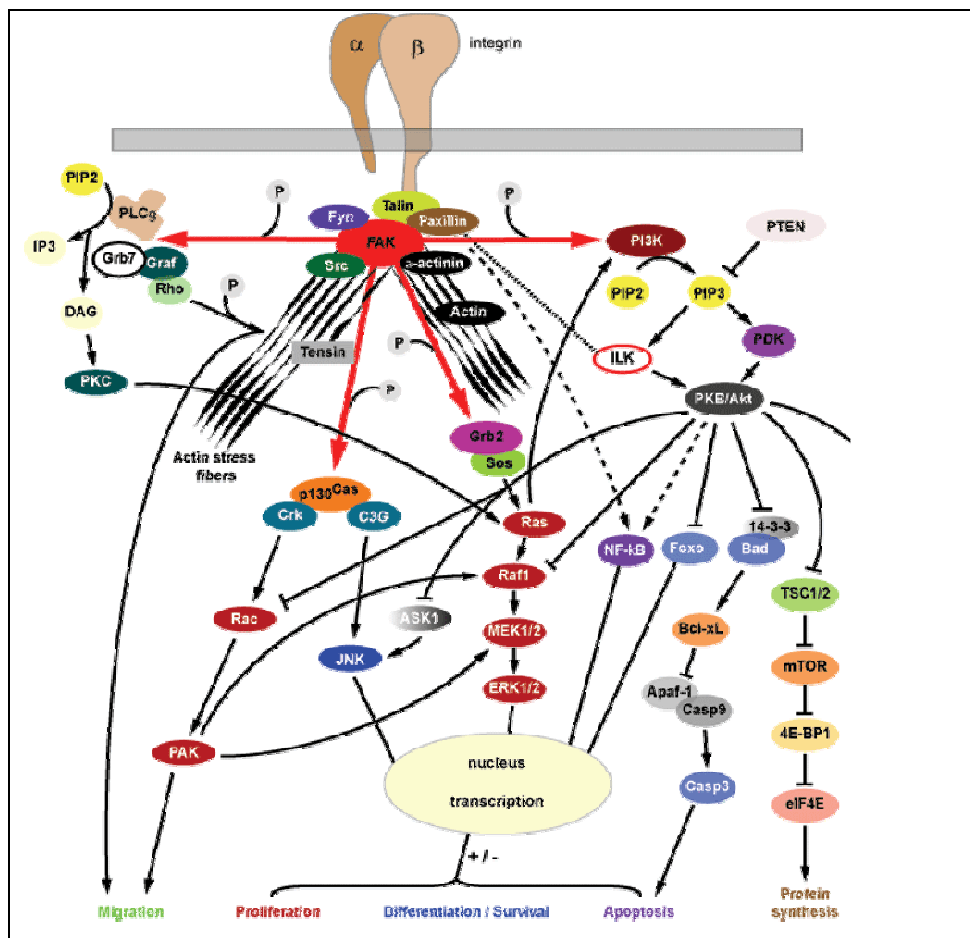


Abb. 8: Modell der möglichen Signalwege, die nach Ligandenbindung an Integrine ausgelöst werden können. FAK zeigt sich als Mittelpunkt der breit gefächerten Signalkaskade. Nachdem Liganden an die beiden Integrinuntereinheiten gebunden haben, kommt es zu einer FAK-Aktivierung, wodurch u.a. Akt über den PI3K-Weg phosphoryliert wird. Die Integrinbindung von Liganden kann insgesamt eine erhöhte Migration, Proliferation und Protein-Synthese bewirken (Abbildung der Universität Lausanne).

Durch Interaktionen mit Laminin, Kollagen IV und weiteren Komponenten der Extrazellulär-Matrix werden intrazellulär Signalwege aktiviert, die sowohl Adhäsion und Proliferation als auch Zellform und Überleben beeinflussen können [144]. Es findet eine Signaltransduktion über verschiedene Proteine statt, zu denen FAK (*focal adhesion kinase*), ILK (*integrin-linked kinase*), Nck2 (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2*) und PINCH (*particularly interesting new cysteine-histidine rich protein*) gehören. Arbeiten von Oktay *et al.* und Slack *et al.* haben gezeigt, dass eine Überexpression vor allem der FAK besonders in Mamma-Tumorgewebe auftritt und zu erhöhter Proliferation und einer verminderten Überlebensrate führt [145, 146]. Somit ist die Zelladhäsion von zweifacher Bedeutung: es kommt zur Anheftung der Zellen, die sich an diesem Ort vermehren können, und gleichzeitig

werden intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, die die Tumorgenese und die spätere Invasion fördern.

Im Bezug auf Mamma-Tumoren gibt es in der Literatur noch keine Angaben, ob exogenes oder autokrin sezerniertes MIF auf die Zelladhäsion wirkt. Es ist lediglich bekannt, dass die Zelladhäsion von Maus-Fibroblasten zu einer autokrinen MIF-Ausschüttung führt. MIF aktiviert daraufhin Integrin-abhängig den MAP-Kinase-Signalweg und reguliert somit Zellproliferation und weitere onkogene Prozesse [147]. Der umgekehrte Effekt, dass MIF-Sekretion die Adhäsion beeinflusst, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Zusätzlich zeigt Abb. 8 deutlich, dass über den Signalweg der FAK auch die PI3-Kinase aktiviert wird, die wiederum Tumorstadium und -ausbreitung beeinflusst. So postulierten Liu *et al.* erst kürzlich, dass veränderte Mechanismen in Mamma-Karzinomen zu einer Überaktivierung des Akt-Signalweges führen können. Somit liegt in der Inhibition der PI3K eine klare Therapieoption [148].

1.5.2 Proliferation

Die Proliferation von Tumorzellen wird von unzähligen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und weiteren Signalmolekülen beeinflusst, sodass in diesem Abschnitt besonders die proliferative Wirkung von MIF im Tumorgewebe beschrieben werden soll. Im Rahmen von Mamma-Tumoren sind in der Literatur jedoch noch keine Angaben bezüglich der MIF-Wirkung auf die Proliferation zu finden.

Meyer-Siegler *et al.* konnten eine pro-proliferative Wirkung von MIF sowohl in Karzinomen der Blase als auch der Prostata nachweisen und gleichzeitig den hemmenden Effekt von Anti-MIF-Antikörpern demonstrieren [48, 86].

In ähnlicher Art und Weise beeinflusst MIF die Angiogenese und die Proliferation in intestinalem Tumorgewebe, wobei die MIF-Wirkung besonders in Adenomen und frühen Karzinomstadien beschrieben werden konnte [32].

Der Proliferations-Signalweg scheint möglicherweise ebenfalls über PI3K-Akt abzulaufen. Hagemann *et al.* konnten in Ovarialtumoren zeigen, dass ein MIF-*knockdown* sowohl eine verminderte Proliferationsrate als auch eine reduzierte Akt-Phosphorylierung hervorruft [87]. Weitere mögliche Signaltransduktionsmechanismen sind für die MIF-Wirkung in diesem Bereich noch nicht bekannt.

1.5.3 Migration und Invasion

Der Mechanismus der Migration von aggressiven Mamma-Karzinom-Zellen (MDA-MB-231) wurde kürzlich von Zhao *et al.* untersucht. Dabei ergab sich, dass der Akt-Weg eine wichtige Rolle bei der Migration von CXCR4-positiven Tumorzellen spielt und dass dieser Signalweg notwendig ist um eine CXCL12-abhängige Migration hervorzurufen [149]. In weiteren Arbeiten im Jahre 2006 war entdeckt worden, dass zwischen den beiden Akt-Isoformen

unterschieden werden muss. Akt1 ist sowohl in der Lage pro-proliferativ und anti-apoptotisch auf Tumorgewebe zu wirken, als auch anti-tumorös, indem es die Migration und Invasion der Karzinomzellen unterdrückt [150, 151].

Wie zuvor bereits beschrieben, entwickelten Hagemann *et al.* für die Invasion von Mamma-Karzinomzellen die Modellvorstellung, dass Makrophagen über TNF- α Tumorzellen aktivieren und diese über den NF- κ B-Signalweg die MIF-Expression hochregulieren. Diese Hochregulation soll eine erhöhte Invasionsfähigkeit der Zellen bewirken [137]. Weitere Studien an nasopharyngealen Tumoren konnten zusätzlich zeigen, dass MIF die Expression der beiden Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 bewirkt, die für das Invasionsverhalten von Tumorzellen essenziell sind [152]. In diesem Zusammenhang demonstrierten Yu *et al.*, dass MIF in atherosklerotischen Plaques über den ERK-MAP-Kinase-Weg die MMP-9-Expression reguliert [153]. Ein ähnlicher Weg über die Proteinkinase-C wurde in rheumatoiden Arthritismodellen für die MMP-2- und MMP-9-Hochregulation beobachtet [154, 155].

Weitere Studien über die Wirkung von MIF auf die Invasion von Mamma-Karzinomzellen sind in der Literatur nicht vorhanden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Zytokins MIF bei der Entwicklung von Mamma-Karzinomen zu untersuchen. Dazu sollten die verwendeten Brust-Epithel- und Karzinomzelllinien zunächst genauer in Bezug auf MIF-Konzentration, PTEN-Status und p-Akt/Akt-Ratio charakterisiert und in ihrer MIF-Sekretion und ihrem Verhalten ohne Stimuli beobachtet werden.

Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob MIF Auswirkungen auf die Adhäsions-, Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen hat und ob hier gegebenenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Mamma-Karzinom-Zellarten beobachtet werden können. Zusätzlich wird in der Literatur stets die MIF-Sekretion beschrieben. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob exogenes MIF als Triggerfaktor des autokrinen MIF-loop dienen könnte. Solche möglichen MIF→MIF→*feed-forward-loops* wurden bis dato noch nicht beschrieben.

Da MIF in großen Mengen von Makrophagen exprimiert und sezerniert wird, sollte zusätzlich anhand von Maus-Makrophagen-Überständen überprüft werden, ob diese Einfluss auf das Verhalten von Mamma-Karzinomzellen haben. Hierbei dienten die Überstände von MIF-*knockout*-Mäusen als Kontrolle.

Unabhängig von der Arbeit mit Mamma-Zelllinien sollte die MIF-Konzentration in Kombination mit dem Akt-Ratio in Mamma-Biopsaten aus der Pathologie des Uniklinikums Aachens bestimmt werden, um diese Größen mit weiteren klinisch-pathologischen Daten korrelieren zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Folgende allgemeine Chemikalien und Reagenzien wurden in den verschiedenen Experimenten eingesetzt und von den angegebenen Herstellern bezogen:

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller
Accutase	PAA, Pasching
30 % Acrylamid/Bis-Lösung	Bio Rad, München
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio Rad, München
Calcein-AM	Calbiochem, USA
<i>Complete protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen
Chloroform	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
DMSO	Sigma, München
EGF	Sigma, München
ELISA-Substrat (H ₂ O ₂ +TMB)	Pierce, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fluoromount G	Southern Biotech, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Glycin	Fluka Chemie AG, Schweiz
Hydrocortison	Sigma, München
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	KMF Laborchemie, Lohmar
Insuman Rapid	Aventis, Frankfurt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Matrigel (<i>basement membrane</i>)	BD Bioscience, Heidelberg
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Sigma, München
MultiMark® <i>Multi-Colored Protein Standard</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NuPage Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage MES-SDS- <i>running buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage LDS- <i>sample buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe

NuPage LDS- <i>transfer buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, München
Penicillin/ Streptomycin-Lösung	Gibco, Eggenstein
Protein Assay (Bradford-Reagenz)	BioRad, München
Saccharose	Sigma, München
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Schweiz
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Grenzach-Wyhlen
Super Signal West Dura Extended Duration Signal	Pierce Biotechnology, USA
TEMED	BioRad, München
Thioglykolat	Sigma, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, München
Tween 20	Fluka Chemie AG, Schweiz
Zellkulturmedien Gibco	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkultursupplemente Gibco	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Geräte

Es wurden Messinstrumente und weitere Geräte der Arbeitsgruppen Bernhagen, Weber und Dahl verwendet, die sich insgesamt sehr gut ergänzten:

Gerät / Software	Hersteller
Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus, Gießen
AIDA <i>image analyser</i>	Raytest Isotopen GmbH, Berlin
Cary 1 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Varian, Darmstadt
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
CO ₂ -Inkubator MCO-17AIC	SANYO Electric Biomedical Co., Japan
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham, München
FACS Canto Flow Cytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX 40	Olympus, Hamburg
Heizblock UBD	Grant Instruments, Großbritannien
4 °C Kühltank Premium <i>frost-free</i>	Liebherr, Ochsenhausen

LAS-3000 Image Reader	Fujifilm, Düsseldorf
Light Cycler 2.0	Roche Diagnostic, Mannheim
Mikroskop Olympus CK40	Olympus, Hamburg
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
ND 1000 Spectrophotometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Origin Pro 7.0	Origin Lab Corporation, USA
Pipetten Pipetman	Gilbson, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS integra biosciences, Fernwald
PCR-Gerät Primus 96 Plus	MWG Biotech, Ebersberg
PHM82 Standard pH-Meter	Radiometer, Dänemark
RS-60 Tube Rotator	BioSan, USA
Schüttler MM1	Desaga, SARSTEDT-Gruppe, Nümbrecht
SDS-PAGE NuPage XCell SureLock Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Spectra-Fluor Fluoreszenz/Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
Sterilwerkbank Biowizard	Kojair Tech Oy, Finnland
-20 °C Tiefkühlschrank Economic-super	Bosch, Stuttgart
-20 °C Tiefkühlschrank Premium	Liebherr, Ochsenhausen
-80 °C Tiefkühlschrank Ultra Low	Sanyo Electric Bio medical Co., Japan
-152 °C Tiefkühltruhe Ultra Low MDF-1155	Sanyo Electric Biomedical Co., Japan
VICTOR 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, USA
Wasserbad Typ 1004	GFL, Burgwedel
Western Blot NuPage/ X Cell II Blot Modul	Invitrogen, Karlsruhe
WinMDI	Flow Cytometry Application, J. Trotter
Zentrifuge Z 383 K/Z 400 K	Hermle, Wehingen

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cell Scraper	Nunc, USA
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser 12 mm	Merck, Bruchsal
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
Greiner PP-Röhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Immunolon II ELISA Platte	Dynatech, Großbritannien

Kanülen (25 G, 23 G)	BD Microlance, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nalgene, USA
Multiwell-Platten	Falcon, Heidelberg
Bis-Tris 4 - 12 % Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage-Kassetten	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage-Kämme	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger Superfrost	Merck, Bruchsal
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can, USA
Petrischalen (6 cm Ø)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pipettenspitzen blau (1000 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen gelb (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen weiß (20 µl)	Gilson, USA
Protran Nitrocellulosetransfermembran 0,2 µm	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (2, 10, 50 ml)	Dispomed, Gelnhausen
Transwell Inserts 8 µm Filter (Fluobloc)	Corning, USA
Whatmann Filterpapier	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zellkultur-T-Flaschen (25 m ² ; 75 cm ²)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zellkulturplatten Cellstar	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Heidelberg

2.4 Kits

Kitbezeichnung	Hersteller
<i>Cell-Proliferation-Kit</i>	Roche Diagnostic, Mannheim
<i>Cell-Death-Detection-ELISA</i>	Roche Diagnostic, Mannheim
<i>Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I-Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>Reverse Transcription System</i>	Promega, USA

2.5 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Typ	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
Anti-Aktin C4	Maus IgG (monoklonal)	WB: 1:500	(1)

Anti-Akt 1/2 (sc-8312)	Kaninchen IgG (polyklonal)	WB: 1:1000	(2)
Anti-p-Akt (Ser 473)	Kaninchen IgG (polyklonal)	WB: 1:1000	(3)
Anti-CD-74 (sc-5438)	Ziege IgG (polyklonal)	WB: 1:200	(2)
Anti-hu-CD-74	Maus IgG (monoklonal)	FACS: 1:20	(4)
Anti-CD-74-FITC	Maus IgG (monoklonal)	FACS: 5 µg/ml IF: 5 µg/ml	(5)
Anti-CXCR4 (MAB 170)	Maus IgG (monoklonal)	FACS: 10 µg/ml Neutralisierung: 5 µg/ml	(6)
Anti-CXCR2 (MAB 331)	Maus IgG (monoklonal)	FACS: 2,5 µg/ml	(6)
Anti-JAB1 (sc-9074)	Kaninchen IgG (polyklonal)	WB: 1:1000	(2)
Anti-MIF Ka565	Kaninchen IgG (Serum)	WB: 1:1000	(7)
Anti-MIF MAB 289	Maus IgG (monoklonal)	ELISA: 2 µg/ml	(6)
NIH anti-MIF III.D9	Maus-Aszites (monoklonal)	Neutralisierung: 58 µg/m	(8)
Anti-PTEN (sc-7974)	Maus IgG (monoklonal)	WB: 1:500	(2)
IgG _{2A}	Maus	Neutralisierung: 58 µg/ml	(8)
IgG ₁	Maus	Neutralisierung: 58 µg/ml	(8)

WB: Westernblot; **IF:** Immunofluoreszenz; **FACS:** *Fluoreszenz activated cell sorting*

Sekundärantikörper

Antikörper	Typ	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	F(a,b') ₂ aus Schaf, HRP-konjugiert	WB: 1:5000	(9)
Anti-Maus	IgG aus Ziege, FITC-markiert	FACS: 1:1000 IF: 1:1000	(10)
Anti-Kaninchen	IgG aus Esel, HRP-konjugiert	WB: 1:5000	(9)
Anti-Ziege	IgG aus Kaninchen HRP-konjugiert	WB: 1:5000	(11)
Anti-MIF BAF 289	IgG aus Ziege, biotinyliert	ELISA: 0,2 µg/ml	(6)

Hersteller

- (1) MP Biomedicals, Solon/USA
- (2) Santa Cruz, USA
- (3) Cell Signaling, Danvers/USA
- (4) BD Pharming, San Diego/USA

- (5) Biomeda, Foster City/USA
- (6) R&D, Wiesbaden
- (7) Labor Bernhagen, Aachen
- (8) Bucala, Yale/USA
- (9) Amersham, Freiburg
- (10) Dianova, Hamburg
- (11) Pierce, Rockford/USA

2.6 Verwendete Primer

Name	Sequenz	Verwendung
<i>MIF</i> F312	agaaccgctcctacagcaag	<i>real-time</i> -PCR
<i>MIF</i> R432	gagttgttccagcccacatt	<i>real-time</i> -PCR

2.7 Stimulantien und Zellmodulatoren

Name	Lösungsmittel	Einsatz	Hersteller
Cycloheximid, USP	Ethanol	MIF-Kinetik	Sigma, Taufkirchen
Glyburid	DMSO	MIF-Kinetik	Sigma, Taufkirchen
IL-6	PBS	Maus-Makrophagen	Arbeitsgruppe Scharper, Aachen
LY 294002	DMSO	Adhäsion	Calbiochem, USA
Pertussis Toxin	Glycerol	Adhäsion	Calbiochem, USA
Pertussis Toxin (B-Oligomer)	Glycerol	Adhäsion	Calbiochem, USA
SDF-1 α	PBS	Invasion	Santa Cruz, USA
TNF- α	PBS	Maus-Makrophagen	Arbeitsgruppe Bernhagen

2.8 Allgemeine Lösungen und Puffer

PBS	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

TBS	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM

100x Proteaseinhibitor-Cocktail 1 (PIC 1)	Konzentration
α 2-Macroglobulin	100 μ g/ml
AEBSF	100 mM in DMSO
Aprotinin	30 μ M in DMSO
EDTA	100 mM in DMSO
E-64	1 mM in DMSO
Leupeptin	1 mM in ddH ₂ O

3 Methoden

3.1 Proteinbiochemische Methoden

3.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung wird routinemäßig die spektroskopische Messung nach Bradford (1976) eingesetzt. Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von Coomassie Blau, wenn dieses an Arginin und hydrophobe Aminosäuren von Proteinen bindet. Gebundenes Coomassie Blau hat ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, während die ungebundene Form grün bis rot erscheint. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um ein schnelles Verfahren, das gegenüber Störfaktoren relativ unempfindlich ist.

Zur Konzentrationsbestimmung werden 200 µl Farbreagenz-Lösung der Firma BioRad in einer 1:5-Verdünnung in jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und 10 µl der zu bestimmenden Proben hinzu pipettiert. Um die Konzentration exakt bestimmen zu können, wird parallel ein BSA-Standard angesetzt, wobei eine BSA-Stammlösung mit Puffer auf Konzentrationen zwischen 0 µg/ml und 50 µg/ml verdünnt und ebenfalls analog zu den Proben aufgetragen wird. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur kann die gesamte Platte im ELISA-Reader bei 595 nm und 450 nm als Referenzwert gemessen werden.

Die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen sich aus der BSA-Standardgeraden, die sich durch Auftragen der BSA-Konzentrationen und ihrer zugehörigen OD-Werte in einem Diagramm ergibt.

3.1.2 SDS-Page-Gelelektrophorese

Gießen von Polyacrylamidgelen

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht der einzelnen Komponenten verwendet man Polyacrylamidgele, die in zwei Teilschritten hergestellt werden. Zunächst wird je nach gewünschter Porengröße der Trenngelpuffer angesetzt und nach Zugabe von TEMED und APS in eine dafür bereitgestellte Gelkassette eingefüllt. Das Gemisch wird mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche gewährleisten zu können. Nach einigen Minuten ist die Polymerisationsreaktion abgelaufen und die Hilfskomponente Isopropanol kann mit einem dünnen Filterpapier vorsichtig wieder entfernt werden. Der in der Zwischenzeit angesetzte Sammelgelpuffer wird auf das feste Trenngel gegossen und relativ zügig ein Kamm mit 10 bzw. 15 Taschen eingelassen. Dieser formt die Taschen zur Auftragung der Proben im weiteren Verlauf. Auch in diesem Fall dauert die

Polymerisierung nur einige Minuten, sodass die Gele zügig verwendet oder bei 4 °C mit etwas ddH₂O gelagert werden können.

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris pH 6.8	Menge
Tris-HCl	6,06 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

Trenngelpuffer 1,5 M Tris pH 8.8	Menge
Tris-HCl	60,57 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

10 % APS	Menge
Ammoniumpersulfat	1 g
ddH ₂ O	ad 10 ml

10 % SDS	Menge
SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

12 % Trenngel für 2 Gele	Menge
ddH ₂ O	10 ml
Trenngelpuffer 1,5 M Tris, pH 8.8	7,5 ml
Acrylamid	12 ml
10 % SDS	300 µl
10 % APS	300 µl
TEMED	15 µl

4 % Sammelgel für 2 Gele	Menge
ddH ₂ O	6 ml
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris, pH 6.8	2,5 ml
Acrylamid	1340 µl
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden vor allem Proteinbestimmungen in Zelllysaten, Zellüberständen und Gewebeproben vorgenommen, wobei sich ein Lysepuffer aus DTT, LDS-NuPage-Buffer und ddH₂O als sehr hilfreich erwies. Die Proben wurden mit diesem Puffer lysiert und durch eine nachfolgende Hitzebehandlung bei 95 °C denaturiert. Eine zusätzliche UV-Behandlung führte zum vollständigen Zellaufschluss, sodass sämtliche Proteine in Lösung vorlagen. Nach Zentrifugation und kurzzeitiger Abkühlung auf Eis konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Zelllysispuffer (für 4 ml)	Menge
NuPage LDS- <i>sample buffer</i>	1 ml
DTT 1 M	500 µl
ddH ₂ O	2,5 ml

SDS-Gelelektrophorese

Das System der SDS-Gelelektrophorese beruht auf einer Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Zunächst werden die Proben in einer wässrigen Lösung mit SDS, einem negativ-geladenen Detergens aufgenommen. Diese Substanz bindet mit seinen Fettsäureanteilen an hydrophobe Bezirke der Proteine, sodass sich diese entfalten und dadurch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen aufgehoben werden. Die Eigenladung wird überdeckt und die Polypeptidketten sind negativ geladen. Zusätzlich bewirkt DTT eine Spaltung der stabilisierenden Disulfidbrücken, durch die die Konformation von Proteinen erreicht wird.

Als Elektrolyt verwendet man ein Tris-Glycin-Puffersystem, dass ursprünglich von Laemmli (1970) entwickelt wurde und sich sehr gut zur Proteinauftrennung eignet.

Die nun negativ geladenen, denaturierten Polypeptidketten werden zunächst im Sammelgel zusammengeführt und wandern im Trenngel je nach ihrer Größe in verschiedenen Geschwindigkeiten zur Anode. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht sind somit nach Abschluss der Elektrophorese der positiven Elektrode am nächsten. Um nun das Molekulargewicht bestimmen zu können, wird ein Proteingemisch (Marker) mit bekanntem Molekulargewicht in einer Parallelspur aufgetragen und dessen Banden mit den zu bestimmenden Proben verglichen.

In dieser Arbeit wurden zwei SDS-Gelelektrophoresesysteme nach den beiden Prinzipien Laemmli und NuPage verwendet: Zum einen kamen selbst gegossene Gele zum Einsatz, in deren Taschen 15-20 µl Probe und 5 µl Marker parallel eingefüllt wurden. Eine Laufzeit von

ungefähr 120 min bei 120 V erwies sich als ideal, wobei die Laufrfront, bestehend aus Bromphenolblau, oft als zusätzlicher Marker diene.

Das NuPage-System der Firma Invitrogen kam beim Auftrennen von Proteinengemischen mit sehr ähnlichem Molekulargewicht zum Einsatz. Die zugehörige Puffersubstanz Bis-Tris mit einem pH-Wert von 6,4 wird sowohl im Sammel- als auch im Trenngel verwendet. Der niedrige pH-Wert verhindert den Zerfall des Polyacrylamids und macht die Gele für lange Zeit lagerfähig. Es handelt sich um Gradientengele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 4 - 12 %, wobei durch einen MES-NuPage-Laufpuffer der Auftrennungsbereich noch in gewissen Bereichen variiert werden kann. Diese Gele können bei 200 V in etwa 45 min laufen, bis die Laufrfront an der Unterkante der Gelkassette erscheint.

NuPage Laufpuffer	Menge
NuPage MES-SDS-running buffer	40 ml
ddH ₂ O	760 ml

Laufpuffer 5x	Menge
Tris	15,14 g
Glycin	72,05 g
10 % SDS	50 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Laufpuffer 1x	Menge
Laufpuffer 5x	200 ml
ddH ₂ O	800 ml

3.1.3 Western-Blotting

Um nun spezifische Proteine anfärben zu können, verwendet man das Verfahren des Western Blots, bei dem die auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden. Dieser so genannte Blot-Vorgang auf eine Nitrocellulosemembran läuft ebenfalls durch Anlage eines elektrischen Feldes ab, welches in diesem Fall senkrecht zur Laufrfront in der Gelelektrophorese steht. Wiederum ist der Puffer mit SDS versetzt, sodass es zu einer Wanderungsbewegung der Proteine in Richtung Anode kommt. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten, während die Proteine für weitere Methoden zugänglich gemacht werden.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten NuPage-System wurden das Gel und die darauf aufgelegte Membran in einen "Sandwich" eingespannt, sodass jeweils ein Filterpapier die beiden Komponenten umgab und sie durch weitere Schwämme gepolstert und feucht gehalten wurden. Die gesamte Blotting-Kammer wurde mit Eis und Eiswasser umgeben und eine Spannung von 35 V über 90 min angelegt. Dieses verwendete System bezeichnet man auch als *Tank-Blot*, da der Bloteinsatz, der Membran und Gel umgibt, mit Puffer aufgefüllt wird.

Transferpuffer	Menge
NuPage-transfer buffer	12,5 ml
Methanol	25 ml
ddH ₂ O	212,5 ml

Immunoblotwaschpuffer	Menge
Tween 20	1 ml
TBS	1000 ml

1 % BSA	Menge
BSA	1 g
Immunoblotwaschpuffer	100 ml

3.1.4 Immunodetektion

Um im weiteren Verlauf auf den Blots verschiedene Proteine detektieren zu können, wurden spezifische Antikörper eingesetzt. Zunächst wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 1 % BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Dieser Schritt verbessert die spezifische Bandendetektion. Zur Proteinerkennung wurde der Primärantikörper in entsprechenden Verdünnungen in 1 % BSA-Lösung auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten mindesten drei Waschschrte à 10 min mit Immunoblotwaschpuffer, bevor der Sekundärantikörper ebenfalls in 1 % BSA-Lösung für 1h hinzu gegeben werden konnte. Um nicht gebundenen Antikörper wegzuwaschen, schloss sich stets eine erneute Waschzeit von insgesamt 30 min an.

Die Sekundärantikörper sind mit einer Meerrettichperoxidase versehen, einem Enzym, das ein zugegebenes Substrat umsetzt und im Rahmen dieser Reaktion Licht erzeugt. Diese Lumineszenz kann nach Zugabe von SuperSignal West Dura (Pierce) im LAS 3000-Image-Reader detektiert und in digitaler Form aufgenommen werden. Auf den Fotos zeigten sich

somit die zu den Antikörpern gehörigen spezifischen Banden. Die weitere quantitative Auswertung wurde mit Hilfe der Software *AIDA-Image Analyser* durchgeführt.

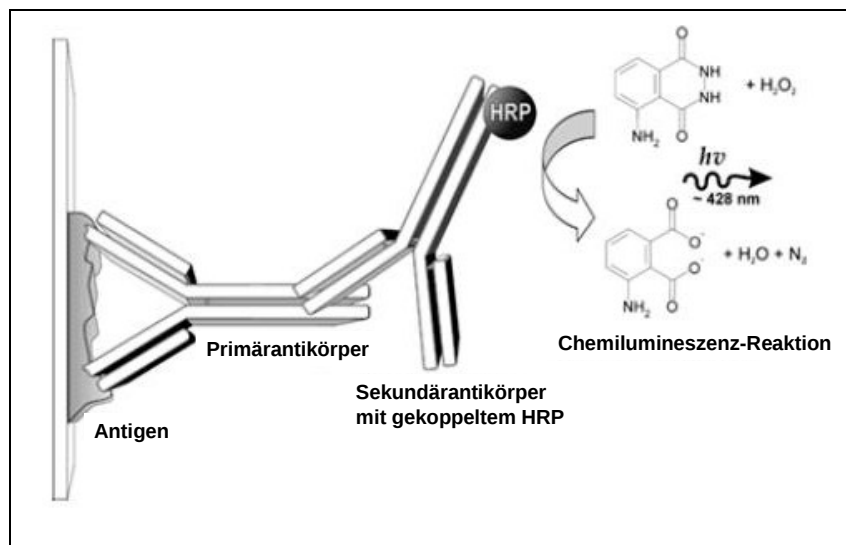


Abb. 9 : Western Blot Detektion über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper. Der Primärantikörper bindet an das auf der Membran immobilisierte Antigen und wird in einem zweiten Schritt von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt. Das zugegebene Substrat wird von der Meerrettichperoxidase im Rahmen einer Chemilumineszenz-Reaktion umgesetzt.

3.1.5 huMIF-Sandwich-ELISA

Der huMIF-ELISA ist ein Verfahren zur Bestimmung des MIF-Proteins in Proteingemischen oder Lysaten. ELISA steht für *enzyme-linked immuno sorbent assay* und beschreibt ein Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Bei der verwendeten Sandwich-ELISA-Technik kommen zwei spezifische Antikörper zum Einsatz: Der erste so genannte *capture*-Antikörper wird auf einer festen Phase gebunden und hat eine spezifische Erkennungsstelle für das Antigen, die nicht der Bindungsstelle des Zweitantikörpers entspricht. Das Antigen bindet somit an den Erstantikörper und wird durch den Zweitantikörper wiederum erkannt. Dieser ist mit einer Meerrettichperoxidase markiert und führt nach Substratzugabe zu einer sichtbaren Farbreaktion, die im Photometer quantifiziert werden kann. Je dunkler die Farbe erscheint, umso mehr humanes MIF ist in der Probe vorhanden. Um auch absolute MIF-Werte angeben zu können wird ein Standard mit rMIF parallel aufgetragen.

Im Einzelnen wurden als Primärantikörper 100 µl/Well MAB-289-Antikörper in einer 96-Well-Platte aufgetragen und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die einzelnen Wells mehrmals mit Waschpuffer gespült, um nicht-gebundene Antikörper abzulösen. Unspezifische Bindungen wurden mit 200 µl/Well der ELISA-Blockierlösung gesättigt, die für 1 h bei Raumtemperatur inkubieren musste. In dieser Zeit

konnten die Probenverdünnungen in Probenpuffer vorbereitet und der Standard mit rMIF von 0 ng/ml bis 200 ng/ml angesetzt werden. Die Blockierlösung wurde mit mehreren Waschschritten entfernt und Proben und Standard in Duplikatur mit jeweils 100 µl/Well aufgetragen. Die Probeninkubationszeit lag bei 2 h, ebenso die Inkubation des Sekundärantikörpers BAF-289, der nach einem erneuten Waschschriff zugegeben wurde. Im weiteren Verlauf folgten 100 µl/Well Streptavidin-POD-Lösung, die für 20 min belassen wurden, um Bindungen mit dem Detektionsantikörper einzugehen. Die Farbreaktion ergab sich nach einem weiteren Waschschriff durch Zugabe von einer angesetzten, lichtempfindlichen Substratlösung. Der Farbumschlag wurde beobachtet und nach wenigen Minuten durch 0,5 M H₂SO₄-Lösung abgestoppt. Die entstandene Gelbfärbung konnte mit Hilfe des Victor-Readers bei 495 nm quantifiziert werden.

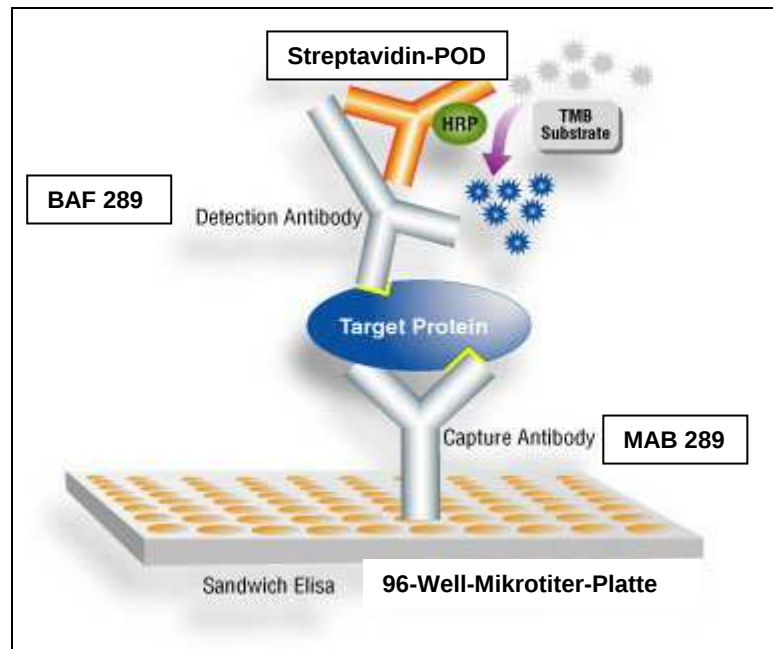


Abb. 10 : Prinzip des huMIF-ELISA (abgewandelte Skizze von Cell Signaling Technology®). Der *capture*-Antikörper MAB 289 wird auf einer 96-Well-Mikrotiter-Platte immobilisiert, sodass in einem zweiten Schritt das passende Antigen binden kann. Das gebundene Zielprotein wird über den Detektionsantikörper BAF 289 erkannt, an den Streptavidin-POD binden kann. Durch Zugabe eines TMB-Substrates wird ein Farbumschlag hervorgerufen, der dann detektiert werden kann.

Zur Auswertung wurde die rMIF-Standardgerade aus den gemessenen optischen Dichten und den eingesetzten Konzentrationen gezeichnet und die MIF-Konzentrationen der Proben über ihre Absorptionswerte auf diese Kurve bezogen.

10 % BSA	Menge
BSA	0,5 g
TBS	5 ml

10 % Tween 20	Menge
Tween 20	5 g
ddH ₂ O	50 ml

Waschpuffer	Menge
10 % Tween 20	5 ml
PBS	995 ml

Primärantikörperlösung	Menge
PBS	10 ml
R&D MAB 289-Antikörper	40 µl

Blockinglösung	Menge
BSA	300 mg
Saccharose	1,5 g
PBS	ad 30 ml

Probenpuffer	Menge
10 % BSA	200 µl
10 % Tween 20	100 µl
TBS	20 ml

Sekundärantikörperlösung	Menge
Probenpuffer	10 ml
R&D BAF 289-Antikörper	40 µl

Streptavidin-POD-Lösung	Menge
TBS	10 ml
Streptavidin-POD	1 µl

Substratlösung	Menge
H ₂ O ₂ -Lösung	5 ml
TMB-Lösung	5 ml

Stopplösung (0,5 M H ₂ SO ₄)	Menge
95 % H ₂ SO ₄	25,8 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

3.1.6 Zelllyse durch *freeze-thaw*-Zyklen

Um intrazelluläre MIF-Konzentrationen bestimmen zu können, erschien eine Kombination aus Zelllyse und huMIF-ELISA als sehr sinnvoll. Da die Zellen keinen weiteren Detergentien ausgesetzt werden sollten, wurde das Verfahren der Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff für einige Sekunden und das darauf folgende, sofortige Auftauen im Wasserbad bei 37 °C verwendet. Dabei befanden sich etwa 100.000 Zellen in 200 µl Lysepuffer und die *freeze-thaw*-Zyklen wurden 10-15-mal durchgeführt. Bei diesem Verfahren brechen die Zellmembranen durch die schnelle Eiskristallbildung auf und werden porös, sodass intrazelluläres MIF in der Auftauphase nach außen in den Puffer strömen kann. Dieser Überstand wurde nach Versuchsende abzentrifugiert und die MIF-Konzentration im ELISA bestimmt. Jedoch kann man bei dieser Form der Zelllyse nicht sicher sein, dass alle Zellkompartimente aufgebrochen werden und MIF nicht unter Umständen noch in kleinen Vesikeln oder in gebundener Form vorliegt.

<i>Freeze-thaw</i> -Puffer	Menge
PBS	2 ml
Proteaseinhibitor-Cocktail	20 µl
10 % Tween 20	10 µl

3.2 Fluoreszenzbasierte Methoden

3.2.1 Durchflusszytometrie

Das so genannte *fluorescence activated cell sorting* (FACS) beruht auf Fluoreszenz-Messungen, bei denen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und mit Laserlicht angeleuchtet werden. Aus den emittierten Streulichtbereichen können dann verschiedene Zelleigenschaften abgeleitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um spezielle Oberflächenmoleküle nachweisen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Rezeptoren CD74, CXCR4 und CXCR2 mit Antikörpern markiert, an denen in einem zweiten Schritt spezifische Sekundärantikörper binden konnten. Diese sind FITC-markiert, das heißt, sie

tragen ein kleines, organisches Molekül namens Fluorophor, das bei Laserlicht mit der Wellenlänge 488 nm Strahlen emittiert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit jeweils 200.000 Zellen pro Reaktionsgefäß vorbereitet und in einer Zentrifuge bei 200 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das sichtbare Pellet in 90 µl FACS-Puffer aufgenommen. Als parallele Ansätze galten eine Kontrolle, bei der die Population völlig unbehandelt blieb, so wie eine Zweitantikörperkontrolle, die nur mit 10 µl einer 1:10 Sekundärantikörperverdünnung behandelt wurde, und eine FACS-Probe mit beiden Antikörpern. Der Primärantikörper verblieb für 60 min im FACS-Puffer 1:200 verdünnt auf den Zellen, die während dieser Zeit auf Eis gelagert wurden. Nach der Inkubation wurde der nicht-gebundene Erstantikörper durch dreimaliges Waschen entfernt, wobei jeder Waschschrift aus einer Zentrifugation von 5 min und erneuter Aufnahme in FACS-Puffer bestand. Darauf folgend wurde das verbleibende Zellpellet mit der Sekundärantikörperverdünnung parallel zur Zweitantikörperkontrolle für 30 min auf Eis inkubiert. Ein letzter Waschschrift sollte helfen den ungebundenen Sekundärantikörper zu eliminieren. Die fertigen Proben wurden in spezielle FACS-Röhrchen umgefüllt und am FACS-Gerät Canto gemessen. Wurden die Zellen länger als 60 min nach dem letzten Waschen aufbewahrt, so zeigte sich eine Fixierung mit Paraformaldehyd in einer 1:1 Verdünnung als sehr sinnvoll.

Während der so genannten FACS-Analyse wurde sowohl ein Dot Plot als auch ein Histogramm für jede Probe erstellt. Der Dot Plot zeigt das *forward scattering* (FCS), d.h. die Vorwärtsstreuung des Lichtes, die die Zellgröße beschreibt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC - *side scattering*) resultiert aus der Lichtbrechung und dient als Maß für die Granularität der Zellen. In diesem Plot erkennt man sowohl verschiedene Populationen innerhalb der Probe als auch die Überlebensrate der verwendeten Zellen. Im zugehörigen Histogramm werden die Fluoreszenz-markierten Oberflächenmerkmale gemessen. Je weiter rechts die Population im Histogramm liegt, umso mehr Fluoreszenzfarbstoff reflektiert die Strahlung, d.h. umso mehr Moleküle der untersuchten Klasse befinden sich auf der Zelloberfläche.

In den beschriebenen Messungen wurden im Normalfall 10.000 Zellen pro Messung betrachtet.

FACS-Puffer	Menge
PBS	100 ml
FCS	1 ml

3.2.2 Fluoreszenzfärbung von nativen Zellen

Um die durchgeführten FACS-Analysen auf CD74 auch visuell unterstützen zu können, wurden Oberflächenmoleküle nativer Zellen der verwendeten Zelllinien Fluoreszenz-gefärbt und mikroskopische Aufnahmen in digitaler Form erstellt.

In einer 6-Well-Platte wurde auf dem Boden jedes Wells ein Deckgläschen ausgelegt und 300.000 Zellen im Vollmedium ausgesät. Nach 24 h Inkubations- und Adhäsionszeit wurden die Platten auf Eis für eine Stunde mit einer 1:100 Verdünnung eines FITC-markiertem-CD74-Antikörper in PBS inkubiert. Einmaliges Waschen mit PBS nach der Inkubationszeit reichte aus, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Als Negativkontrollen dienten völlig unbehandelte Zellen und solche, die nur mit einem Anti-Maus-Sekundärantikörper behandelt worden waren.

Die gesamten 6-Well-Platten wurden nach dem letzten Waschschrift für 20 min bei 37 °C mit 1 ml Paraformaldehyd zur Zellfixierung inkubiert. Danach konnten die Deckgläschen vorsichtig mit Hilfe eines Tropfens Fluoromount-G-Kleber auf Objektträgern befestigt werden, sodass die mit Zellen bewachsene Seite nach unten zeigt. Als Trocknungszeit wurde eine Zeitspanne von 24 h verwendet.

3.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops können Zellen bzw. nur bestimmte Moleküle auf der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden. Dazu werden die zu untersuchenden Präparate mit fluoreszierenden Molekülen markiert, die in bestimmten Lichtbereichen zum Leuchten angeregt werden können. Die emittierte Wellenlänge ist dabei durch den sog. Stokes-Shift langwelliger als die des einstrahlenden Lichtes. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen können in einem gemeinsamen Strahlengang optisch getrennt werden und der Experimentator sieht in seinem Bild nur das emittierte Licht (Abb. 11). Mit Hilfe von speziellen Kameras können die leuchtenden Zellen digitalisiert und im Verlauf beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl FITC-markierte Antikörper als auch der Fluoreszenzfarbstoff Calcein alleine verwendet. Die geeignete Anregungswellenlänge war im blauen Lichtbereich, während das emittierte Licht sich im grünen Farbbereich zeigte.

Von jedem Objektträger wurden sowohl in einer 4-, in einer 10- als auch in einer 50-fachen Vergrößerung jeweils zehn Bilder aufgenommen und mit Hilfe der zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Software ausgezählt und bearbeitet.

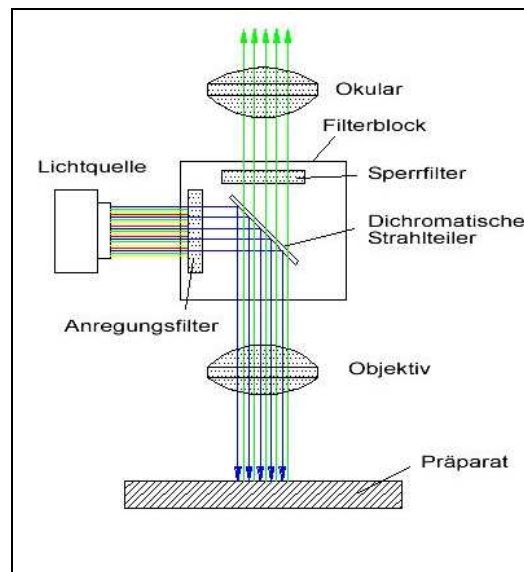


Abb. 11 : Aufbau und Prinzip eines Fluoreszenzmikroskops bei FITC- bzw. Calcein-gefärbten Präparaten (abgeänderte Abbildung nach W. Jülich). Das markierte Präparat wird mit Hilfe von Licht, welches durch einen Anregungsfilter strahlt, zum Fluoreszieren angeregt. Durch das Okular gelangen daraufhin nur emittierte, langwelligere Lichtstrahlen in das Auge des Beobachters, die durch einen dichromatischen Strahlenteiler von den Strahlen der Anregungsquelle getrennt werden können.

3.3 Funktionelle Assays

3.3.1 Adhäsions-Assay

Die Adhäsion von Zellen beschreibt ihre Fähigkeit, auf einem gegebenen Untergrund fest zuhaften. Diese Eigenschaft ist besonders für Bestandteile des Blutes wichtig, die zunächst in bestimmten Organen oder Kapillaren binden müssen, um ins umliegende Gewebe einwandern zu können. Ebenso sind Adhäsionsprozesse im Bereich der Extrazellulärmatrix wichtig, um Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse von Zellen zu fördern. Zellen, die nicht adhären, zeigen deutlich geringere Differenzierungsgrade, was besonders im Bereich der Entartung von Tumorzellen wichtig sein kann. Zum anderen müssen sich Tumorzellen jedoch auf der Basalmembran festsetzen, um diese bei der Invasion durchdringen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Adhäsions-Assays untersucht werden, wie sich das Anhaftungsvermögen von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen unter verschiedensten Bedingungen ändert. Dazu wurden zunächst 6-Well-Platten mit so genannten Matrigel beschichtet. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus Laminin (56 %), Kollagen IV (31 %) und Entactin (8 %), das die physiologische Basalmembran zumindest teilweise simulieren kann. Das Matrigel wurde einen Tag vor Versuchsbeginn mit einer Konzentration von 50 µg/ml aufgetragen und die Platte zunächst für 2 h bei Raumtemperatur und im Anschluss über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei der Matrigel-Verdünnung war es wichtig,

dass eiskaltes RPMI verwendet wurde, da dieses Gemisch ab ca. 18 °C geliert und es dabei zu Unebenheiten kommen kann. Die Inkubation über Nacht im Kühlraum diente dem Ausgleich von Unebenheiten, da bei dieser Temperatur die Schicht wieder leicht flüssig wird. Am Versuchstag wurden die Platten 1 h vor Beginn bei Raumtemperatur gelagert, um die imitierte Basalmembran endgültig zu festigen. Zeitgleich wurden 300.000 Zellen pro Well in 1 ml 0,5 % FCS-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Diese Zeit diente zum einen der Vorabwirkung von eventuell verwendeten Antikörpern oder Inhibitoren und sollte zum anderen den Zellen die Möglichkeit geben, Oberflächenmoleküle zu recyceln, die durch die Ablösung mit Trypsin aus den Kulturflaschen zerstört worden waren.

Nach dieser Inkubation wurde jeweils 1 ml Zellsuspension pro Well ausgesät und eine Adhäsionszeit zwischen 40 und 45 min bei 37 °C ange setzt. Je nach Versuch konnte eine MIF-Stimulation zu verschiedenen Zeiten mit 150 ng/ml MIF durchgeführt werden.

Ein Großteil der ausgesäten Zellen hatte in dieser Stunde ausreichend adhäriert, um nicht im nachfolgenden Waschschrift mit kaltem PBS gewaschen zu werden. Die haftenden Zellen wurden mit 1 ml 70 % Ethanol pro Well für 10 min fixiert und dann mit 1 ml 0,02 % Kristallviolett für 10 min angefärbt. Der überflüssige Farbstoff wurde in mehreren Waschschriften mit ddH₂O entfernt.

Der Triphenylmethan-Farbstoff färbte fast ausschließlich DNA-assoziierte Nucleoproteine an und konnte nach Trocknung im Inkubationsschrank über Nacht mit 1 ml 0,02 % Triton-X-100 pro Well wieder aus den Zellen herausgelöst werden. Dieser Entfärbungsschritt benötigte mindestens 30 min Inkubationszeit auf dem Schüttler und zusätzliche 5 min nach Zugabe von 1 ml Isopropanol pro Well.

Die entstandene Farblösung wurde mit Hilfe einer Pipette mehrmals durchmischt und aus jedem Well in Duplikatur 200 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Platte bei 590 nm (Referenzwellenlänge: 450 nm) am Spectra-Fluor gemessen. Je größer die Absorptionswerte waren, umso höher war die Adhäsionsrate.

Färbelösung	Menge
Kristallviolett	0,1 g
ddH ₂ O	100 ml

Entfärbelösung	Menge
Triton-X-100 (0,02 %)	20 µl
ddH ₂ O	100 ml

3.3.2 Matrigel-Invasion

Die Invasion beschreibt das Verhalten von Tumorzellen, welche die Basalmembran durchbrechen, um in das umgebende Stroma einwandern zu können und Blutgefäße zu erreichen.

In diesem Experiment sollte das Invasionsvermögen von Mamma-Karzinom-Zellen untersucht werden. Die Basalmembran wurde wiederum mit Matrigel simuliert und die Invasionszeit mit 72 h festgelegt.

Zur Matrigelbeschichtung der verwendeten Fluobloc-Transwell-Einsätze wurde die Stamm-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml in kaltem PBS auf 500 ng/ml verdünnt und 60 µl dieser Lösung pro Einsatz (0,33 cm²) angesetzt. Die Inkubation über Nacht diente wiederum der Oberflächenglättung.

Am darauf folgenden Tag wurde zunächst ein MIF-Standard auf Eis angesetzt, sodass sich nach 1:1000 Verdünnung später Konzentrationen von 0 ng/ml bis 250 ng/ml ergaben. Pro Ansatz wurden 100.000 MDA-MB-231-Zellen in jeweils 200 µl 0,5 % BSA-Medium angesetzt. Nach allen Vorarbeiten konnten nun die unteren Kammern der Invasionskammer jeweils mit 450 µl 0,5 %-BSA-Medium und 5 µl der jeweiligen MIF-Verdünnungen befüllt und die Einsätze blasenfrei eingehakt werden (Abb. 12). Das überschüssige Matrigelmedium wurde abgesaugt und durch 200 µl der angesetzten Zellsuspension ersetzt. Die gesamte Invasionskammer blieb abgedeckt für 72 h bei 37 °C im Inkubationsschrank.

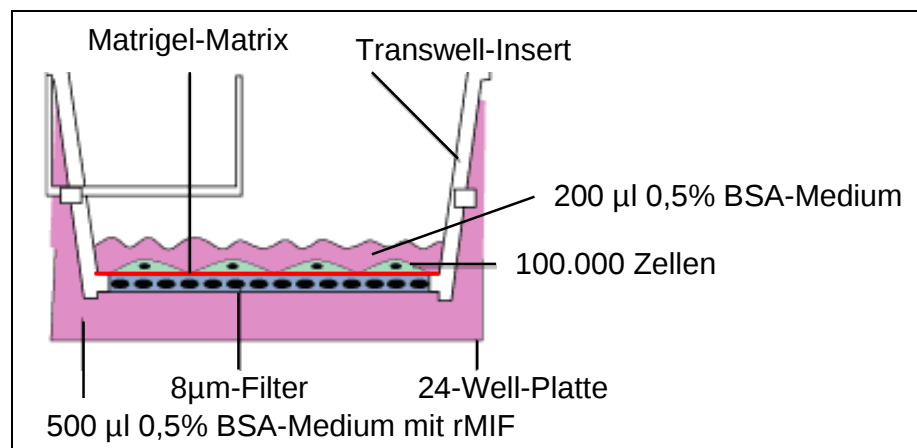


Abb. 12 : Matrigel-Invasionskammer. Verwendung von 8 µm-Filtern als Einsatz für eine 24-Well-Platte. In der unteren Kammer befindet sich Medium mit verschiedenen Konzentrationen von rMIF, während in der oberen Kammer Zellen auf einer Matrigel-Matrix ausgesät werden. Das Kulturmedium ist in beiden Kammern jeweils mit 0,5 % BSA versetzt. Die Zellen durchbrechen nun bei der Invasion die simulierte Basalmembran und gelangen in die untere Kammer bzw. verbleiben an der Unterseite des *Transwell*-Einsatzes.

Danach wurden die Einsätze in 450 µl 0,5 % BSA-Medium umgesetzt, welches 8 mM Calcein zur Zellfärbung enthielt. Durch diese Methode wurden die unten an der Membran

haftenden, durchgewanderten Zellen gefärbt und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop digitalisiert werden. Bei einer Vergrößerung von 10, wurden 4 bis 6 Bilder pro MIF-Konzentration aufgenommen und ausgezählt.

Zusätzlich zu dieser Auswertungsmethode wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin pro Well von den Einsätzen abgelöst und 200 µl der fluoreszierenden Zellsuspension in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Daraufhin konnte im ELISA-Reader ebenfalls die Fluoreszenzintensität gemessen werden.

3.3.3 Proliferationsassay

Mit Hilfe des Proliferationsassays sollte die Zellvermehrung unter verschiedenen Stimulationen und Inhibitionen untersucht werden.

Dazu wurden zunächst in einer 96-Well-Platte 8.000 Zellen pro Well in ihrem passenden Vollmedium ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde ein Mediumwechsel auf 0,5 % FCS-Medium durchgeführt, um die Zellen in ihrer Proliferation zu inhibieren und die Stimulations- bzw. Inhibitionswirkung der untersuchten Substanzen besser verfolgen zu können.

Die Proliferationsdauer variierte je nach Experiment zwischen 24 und 48 h. Kurze Zeit vor Versuchsende, meist 2 bis 4 h vorher, wurde eine zum Roche-*Proliferation*-Kit gehörige BrdU-Markierungs-Lösung in jedes Well pipettiert; die Kontrollwells blieben ohne Zugabe.

BrdU (Bromodeoxyuridin) ist ein synthetisch hergestelltes Thymidinanalogon, welches, wie Thymidin selbst, in die DNA eingebaut wird und später über Antikörper detektiert werden kann. Eine Farbreaktion zeigt, in welchem Maße der Enzym-markierte Antikörper gebunden hat und somit auch in welchem Maße die Zellen proliferiert bzw. BrdU bei der DNA-Synthese eingebaut haben.

Der weitere Proliferationsassay nach der BrdU-Zugabe wurde nach der *Proliferation*-Kit-Anleitung durchgeführt und die gefärbte Platte im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Verwendete Lösungen wurden nach Kit-Anleitungen der Firma Roche angesetzt. An dieser Stelle werden nur zusätzliche Lösungen genannt:

Stopplösung (1 M H ₂ SO ₄)	Menge
95 % H ₂ SO ₄	51,6 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

3.4 Molekularbiologische Methoden

Zur Analyse der Expression verschiedener Gene in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen musste zunächst die RNA isoliert werden. Darauf folgte die Umschreibung in cDNA, die als Template in der *real-time*-PCR eingesetzt werden konnte.

3.4.1 RNA-Isolation

In etwa 1 Million Zellen jeder Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinie wurden zentrifugiert und jeweils in 1 ml Trizol aufgenommen und gut resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzu gegeben. Trizol zerstört dabei die Zellmembran und weitere Zellbestandteile, beeinflusst jedoch nicht die Stabilität der RNA und eignet sich somit ideal zur RNA-Isolierung.

Nach mehrmaligem Invertieren des Trizol-Chloroform-Gemischs und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei 12000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, während sich weitere Zellbestandteile zusammen mit Trizol in der unteren Phase befanden.

Die wässrige Phase wurde möglichst vollständig entnommen und mit 500 µl Isopropanol gut gemischt und zunächst 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und darauf folgend wiederum bei 12000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die RNA pelletierte als Gel am Rand und Boden des Reaktionsgefäßes, sodass der Überstand vorsichtig entfernt und durch 1 ml 75 % Ethanol in DEPC-Wasser ersetzt werden konnte. Ein letzter Zentrifugationsschritt von 5 min bei 7500 g und 4 °C ging der Trocknungsphase an der Vakuumzentrifuge für 45 min voraus. Die RNA-Pellets wurden, je nach Pelletgröße, in 20 bis 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration am Nano-Drop bei 280 nm bestimmt. Die Reinheit konnte bei dieser Messung ebenfalls am Absorptionsspektrum abgelesen werden.

3.4.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die isolierte RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase AMV und einem Oligo-dT-Primer in stabilere cDNA umgeschrieben. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 15 U AMV-RT und 0,25 µg Oligo-dT-Primer in 20 µl Gesamtvolumen umgesetzt. Außerdem wurden 5 mM MgCl₂, 2 µl RT-Puffer (10x), je 1 mM dNTPs und 1 U RNase Inhibitor hinzu gegeben, sowie 0,25 µg Random-Primer und ddH₂O zur Verdünnung auf 20 µl. Dieser Ansatz blieb 10 min bei Raumtemperatur und wurde dann 15 min bei 42 °C, 5 min bei 95 °C und 5 min bei 4 °C belassen.

Während des ersten Inkubationsschritts bindet der Primer an das RNA-Template. Die reverse Transkription mit cDNA Bildung findet während der zweiten Inkubationsphase statt.

Die Synthese erfolgt an einem Primer in 5' - 3' Richtung beginnend nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Die Denaturierung der AMV reverse Transkriptase wird durch Erhitzen der Proben auf 95 °C erreicht. Die letzte Kühlungsphase dient der Inaktivierung sämtlicher Enzymwirkungen und Syntheseprozesse, nach der die Lagerung der synthetisierten cDNA bei -20 °C erfolgen kann.

3.4.3 Semiquantitative *real-time*-PCR

Mit Hilfe der semiquantitativen *real-time*-PCR kann die relative Expression von Genen untersucht werden. Die Methode beruht auf der Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes, der während der Amplifikation an die doppelsträngige DNA bindet, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus, die nach jeder Elongation bestimmt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet.

Am Ende jeder Amplifikation wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, indem die Fluoreszenz bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 40 °C bis 99 °C gemessen wurde. Es kommt zu einer Aufschmelzung der PCR-Produkte, wobei ein spezifisches Produkt bei einer genau definierten Temperatur zerfällt. Diese Aufschmelzung wird durch eine starke Abnahme der Fluoreszenzintensität detektiert. Somit können unspezifische Produkte und Primer-Dimere von dem spezifischen Produkt unterschieden werden.

Für einen Standard-*real-time*-PCR-Ansatz wurden die folgenden Komponenten verwendet:

Komponente	Menge in µl	Endkonzentration
MgCl 25 mM	4	5 mM
10x RT Buffer	2	1x
dNTP Mix 10 mM	2	je 1 mM
Rnase Inhibitor	0,5	1 U
AMV RT 25 U/µl	0,6	15 U
Oligo dT	0,5	0,25 µg
Random Primer	0,5	0,25 µg

Alle verwendeten Substanzen gehörten zum *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I-Kit* der Firma Roche.

Es wurden jeweils 10,1 µl Master-Mix mit 9,9 µl Probenverdünnung gemischt, sodass sich in jedem Ansatz 1 µg Gesamt-RNA-Menge befand. Für die spätere Normalisierung der RNA-Menge wurde bei jedem PCR-Lauf das *housekeeping gene* Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-

Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente bei jedem Lauf ein Doppelansatz ddH₂O.

Folgendes *real-time*-Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
Initiale DNA-Denaturierung	95 °C	5 min	1x
Denaturierung	95 °C	20 s	40x
Primer-Anlagerung	61 °C	10 s	
Elongation	72 °C	12 s	
Finale Elongation	72 °C	60 s	1x
Schmelzkurve	40 - 99 °C	10-20 min	1x

Um die Ergebnisse sinnvoll auswerten zu können, wurde für jede Probe der *cycle-threshold*-Wert (CT-Wert) bestimmt. Dieser beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen nicht optimal, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte so stark ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt. Zusätzlich hybridisieren häufig Produktfragmente miteinander und die Substrate werden langsam verbraucht. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur zwischen diesen beiden Phasen. Als Referenz zur Normalisierung der Proben diente in allen Analysen das *housekeeping gene* GAPDH.

Zur Endauswertung der RNA-Expression der verwendeten Mamma-Zell-Proben wurde die $\Delta\Delta$ -CT-Methode nach Pfaffl *et al.* verwendet, in die die normierten CT-Werte einfließen [156, 157]:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \frac{\text{Probe1}}{\text{Probe2}} = \frac{2^{CT_{B1}-CT_{B2}}}{2^{CT_{A1}-CT_{A2}}} = 2^{(CT_{B1}-CT_{B2})-(CT_{A1}-CT_{A2})}$$

3.5 Isolierung und Kultivierung von Maus-Makrophagen

3.5.1 Isolierung von Peritonealmakrophagen

Zur Isolierung von Peritonealmakrophagen aus Mäusen, wurde zunächst eine Peritonitis hervorgerufen. In etwa 72 h später konnten die eingewanderten Entzündungszellen nach

Freipräparation des Abdomens mit Hilfe von Succrose-Lösung vom Peritoneum abgelöst und isoliert werden.

Zu diesem Zweck wurden 2 bis 3 ml Thioglycolat-Lösung in das rechte, distale Abdomen injiziert und die Mäuse für 72 h in ihrer bekannten Umgebung belassen. Nach Ablauf der 72 h konnte eine deutliche Peritonitis diagnostiziert werden, sodass die Ablösung der Makrophagen mit peritoneal gespritzter Succrose-Lösung nach dem Exitus durch das Narkotikum Isofluran recht ertragreich war. Diese Lösung wurde nach Präparation des Abdomens unter Sicht in die Bauchhöhle gespritzt und die Maus leicht geschüttelt, um die Entzündungszellen vom Peritoneum ablösen zu können.

Thioglycolat-Lösung	Menge
Thioglycolat-Bouillon	10 g
ddH ₂ O	250 ml

11,6 %-Succrose Lösung	Menge
Saccharose	11,6 g
ddH ₂ O	100 ml

3.5.2 Kultivierung von Peritonealmakrophagen

Die weitere Aufreinigung der Makrophagen fand unter der Sterilbank statt. Zunächst wurde die Saccharose-Makrophagen-Lösung in 15 ml Falcons überführt und dann bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands konnte das Pellet in Makrophagen-Medium resuspendiert und zum Waschen erneut zentrifugiert werden. Schon beim Zählen in der Neubauer-Kammer konnte die Reinheit der isolierten Zellen relativ gut beurteilt werden, da Thrombozyten und eventuell vorhandene Erythrozyten in ihrer Form recht stark von den Makrophagen abweichen. Die Zellen wurden mit 200.000/Well ausgesät und für 24 h bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Darauf folgend fand ein Mediumwechsel auf 0,5 % FCS-Medium statt, sodass die Zellen nach weiteren 24 h mit IL-6 bzw. TNF- α stimuliert werden konnten, um die MIF-Ausschüttung der Makrophagen zu erhöhen.

Kulturmedium	Menge
RPMI-1640-Medium	500 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
FCS	50 ml / 2.5 ml

3.5.3 Stimulation der Makrophagen

Die Stimulationen der Makrophagen wurden mit 200 U/ml IL-6 und 1 µg/ml TNF-α für 30 min durchgeführt, nach deren Ablauf die Überstände abgesaugt und frisches 0,5 % FCS-Medium hinzu gegeben wurde. Unterschiedliche Zeitspannen wurden festgelegt, nach denen die Überstände abgenommen und bei -20 °C eingefroren wurden, um sie für Co-Kulturversuche verwenden zu können. Zur Abschätzung des MIF-Gehaltes in den Überständen wurden Western Blot Analysen mit einem MIF-Standard zum Vergleich durchgeführt.

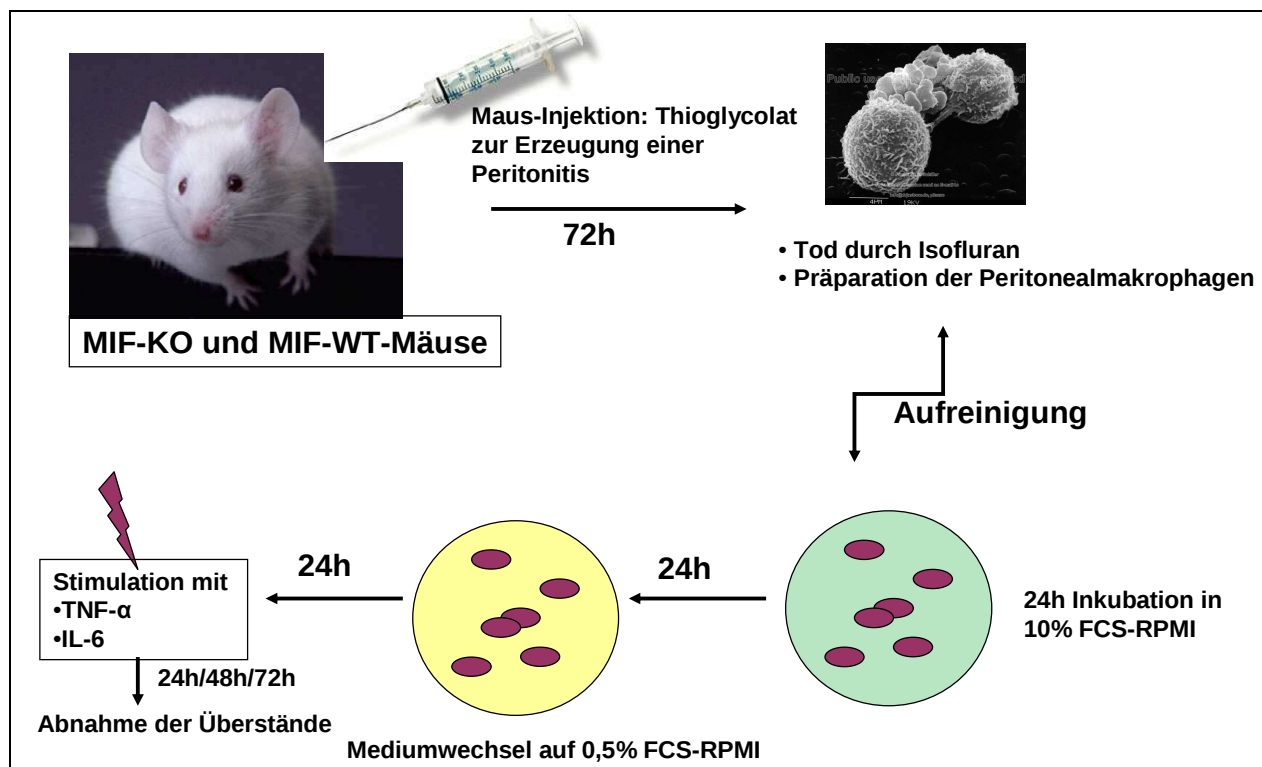


Abb. 13 : Ablauf der Maus-Makrophagen-Isolation. Eine Thioglykolat-Lösung wurde zur Erzeugung einer Peritonitis in MIF-WT- und KO-Mäuse injiziert. Nach 72 h wurden die Tiere mit Hilfe des Narkotikums Isofluran getötet und die Präparation eingewandelter Makrophagen aus dem Peritoneum durchgeführt. Die mit Hilfe von Saccharose abgelösten Zellen wurden im weiteren Verlauf aufgereinigt und 24 h in 10 % FCS-RPMI-Medium inkubiert. Darauf hin fand ein Mediumwechsel auf 0,5 %-RPMI-Medium statt und weitere 24 h später wurde eine Stimulation der Zellen mit TNF-α oder IL-6 durchgeführt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Überstände der Zellen abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Zelllinien

Die Zelllinie MCF-12A diente als gesunde Kontrolle, während es sich bei den weiteren verwendeten Linien um verschiedene Karzinomzellen handelt. Mono-Mac 6-Zellen dienten als Kontrollzellen bei den FACS-Analysen auf CD74 als Oberflächenmolekül. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Name:	MCF-12A	
Herkunft:	epithelial; Gewebe aus Brustrekonstruktion	
Invasionsfähigkeit:	keine	
Besonderheiten:	Mamma-Epithelzellen ohne tumoröse Eigenschaften; Östrogenrezeptor-positiv	
Kulturmedium:	DMEM-Medium (<i>low glucose</i>)	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	FCS (10/0,5 %)	50 ml / 2.5 ml
	Insulin Rapid (10 µg/ml)	3 ml
	Hydrocortison (500 ng/ml)	1 ml
	EGF (20 ng/ml)	500 µl

Name:	MDA-MB-468	
Herkunft:	epitheliale Mamma-Karzinom-Zellen (Adenokarzinom)	
Invasionsfähigkeit:	nicht bis mäßig invasiv	
Besonderheiten:	Zellisolation aus 51-jähriger, dunkelhäutiger Patientin; metastasierender Tumor; Östrogenrezeptor-negativ	
Kulturmedium:	DMEM-Medium (<i>low glucose</i>)	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	FCS (10/0,5 %)	50 ml / 2.5 ml

Name:	ZR-75-1	
Herkunft:	epitheliale Mamma-Karzinom-Zellen eines duktales Karzinoms	
Invasionsfähigkeit:	nicht bis mäßig invasiv	
Besonderheiten:	Isolation aus einem Aszitespunktat bei metastasierendem, duktales Mamma-Karzinom; Östrogenrezeptor-positiv	
Kulturmedium:	RPMI-1640-Medium	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	FCS (10/0,5 %)	50 ml / 2.5 ml
	MEM Vitamin-Lösung (100x)	5 ml

Name:	MDA-MB-231	
Herkunft:	epitheliale Mamma-Karzinom-Zellen eines duktales Karzinoms	
Invasionsfähigkeit:	invasiv	
Besonderheiten:	51-jährige, kaukasische Patientin, Östrogenrezeptor-negativ	
Kulturmedium:	RPMI-1640-Medium	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	FCS (10/0,5 %)	50 ml / 2.5 ml

Name:	Mono Mac 6	
Herkunft:	humane Monozyten aus akuter myeloischer Leukämie	
Invasionsfähigkeit:	keine	
Besonderheiten:	stark CD74 positiv	
Kulturmedium:	RPMI-1640-Medium	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	FCS (10/0,5 %)	50 ml / 2.5 ml
	NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren)	5 ml
	Insulin Rapid (4,5 g)	3,2 ml

3.6.2 Auftauen von Zellen

Um neue Zellen in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C von -152 °C aufgetaut. Die Zell suspension wurde mit vorgewärmtem Medium verdünnt, um die toxische Wirkung des DMSO zu vermindern. Nach einer Zentrifugation mit 1000 g für 5 min konnte der Überstand entfernt und die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden. 2 bis 3 Millionen Zellen wurden in 15 ml Medium kultiviert, wobei am nächsten Tag ein erneuter Mediumwechsel stattfinden sollte. Nach 2 bis 3 Tagen waren die Zelllinien zum Großteil zu 80 % oder mehr konfluent, sodass sie mit Trypsin abgelöst und passagiert werden konnten.

3.6.3 Zellzahlbestimmungen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und mit ausreichend Medium zentrifugiert. Ein Aliquot von in etwa 20 µl wurde in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben und jeweils die großen Eckquadrate ausgezählt. Dabei wurden Zellen, die auf dem äußeren Rand lagen, mitgezählt, solche auf den inneren Rändern jedoch nicht.

Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich durch die folgende Formel:

$$N = \frac{n}{4} \cdot 10^4 \quad (N = \text{Zellzahl pro ml}; n = \text{Gesamtanzahl der vier äußeren Quadrate})$$

3.6.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren sollten die Zellen zu höchstens 90 % konfluent und in Vollmedium inkubiert worden sein. Nach Ablösen mit Trypsin, Zellzahlbestimmung und Zentrifugation, wurden die Zellen in Einfriermedium mit 10 % DMSO und 20 % FCS aufgenommen und mit jeweils 2 bis 3 Millionen Zellen pro ml in dafür vorgesehenen Kryoröhrchen eingefroren. Vor der Überführung in den -152 °C Gefrierschrank wurden die Röhrchen 16 h bis 24 h bei -80 °C gelagert.

3.6.5 MIF-Stimulation und Zellyse mit Abnahme der Überstände

In verschiedenen MIF-Kinetik-Experimenten sollten die MIF-Sekretion in Überstände und der MIF-Gehalt in Zellysaten nach Stimulation mit rekombinantem MIF untersucht werden.

Dazu wurden 100.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und in Vollmedium 24 h bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag fand ein Mediumwechsel zu 0,5 % FCS-Medium statt. Nach 6 h Inkubation begann der eigentliche Stimulationszeitraum. Alle Zellen verblieben für weitere 48 h in Kultur und wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit rekombinantem MIF stimuliert. So wurde 48h vor Versuchsende mit der ersten Stimulation begonnen, während weitere Zellen 24 h, 6 h, 4 h, 2 h bzw. 20 min und 10 min vor Ende stimuliert wurden. Zu den Kontrollzellen wurde zu Beginn der Stimulationszeit 10 µl Dialysepuffer gegeben, während die Zellen zu ihren jeweiligen Zeitpunkten mit 150 ng/ml rMIF stimuliert wurden, die ebenfalls durch Zugabe von 10 µl einer MIF-Vorverdünnung erreicht wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 h wurden alle Überstände abgenommen, zentrifugiert und die flüssigen Überstände bei -20 °C in neuen Reaktions-

gefäßten eingefroren. Die verbleibenden, adhärenenden Zellen wurden mit Hilfe des LDS-Lysepuffers lysiert und für den Western Blot nach Anleitung vorbereitet.

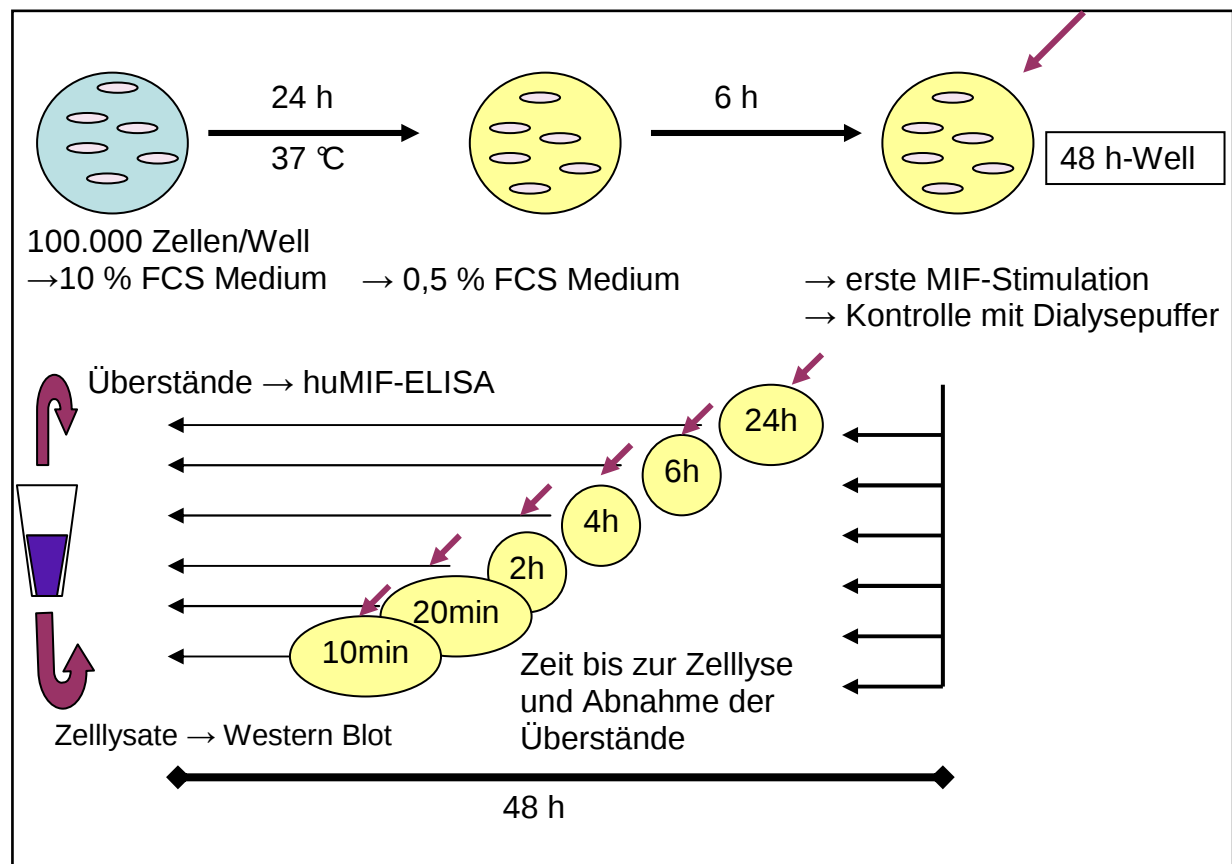


Abb. 14 : Ablauf der Stimulation mit rMIF (150ng/ml). Es wurden jeweils 100.000 Zellen/Well in 10 % FCS-Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Darauf hin fand ein Mediumwechsel auf 0,5 % FCS statt. Nach weiteren 6 h Inkubation begann die Stimulationszeit. Im folgenden Zeitintervall von 48 h wurden die Zellen jeweils für die letzten 48 h, die letzten 24 h usw. mit MIF stimuliert. Nach Ablauf dieses Intervalls wurden die Zellen für weitere Auswertungen mit Hilfe der Technik des Western Blots lysiert und die Überstände abgenommen und auf ihre MIF-Konzentration mit Hilfe des huMIF-ELISA untersucht.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software *Origin Pro 7.0* durchgeführt. Neben Mittelwert- und Standardabweichungsberechnungen wurde zur Signifikanzbestimmung der Student's t-Test angewandt. Die P-Werte wurden für ein 95 %-Konfidenzintervall und unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz berechnet. Ab einem $p < 0,05$ wurden die Unterschiede zwischen zwei Größen als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Unterschiede in der Konzentration von MIF-, PTEN- und p-Akt/ Akt in Mamma-Epithel- und in Mamma-Karzinom-Zelllinien

4.1.1 Tumoren unterscheiden sich in MIF-Konzentration und MIF-Genexpression von gesundem Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst eine Charakterisierung verschiedener Mamma-Karzinom-Zelllinien durchgeführt werden, jeweils im Vergleich zu der nicht-tumorösen Zelllinie MCF-12A. Die beiden nicht-invasiven bis mäßig-invasiven Zelllinien MDA-MB-468 und ZR-75-1 sowie die hoch-invasive Zelllinie MDA-MB-231 wurden bisher weder auf ihre MIF-Gen-Expression noch auf ihre MIF-Proteinkonzentration in lysierten Zellen hin untersucht. Lediglich im Rahmen der Untersuchungen des MIF-vermittelten Akt-Signalweges wurden erste nicht-quantitative Western Blots zur MIF-Bestimmung in Brustkrebszellen in der Arbeitsgruppe Bernhagen angefertigt [53].

Die Genexpressions-Analysen von unstimulierten Zellen wurden mit Hilfe der *real-time*-PCR durchgeführt, bei der sich deutliche Unterschiede in der MIF-Expression zeigten. Im Vergleich zu gesunden MCF-12A-Zellen war die Expression in den beiden nicht-invasiven Zelllinien deutlich hochreguliert, während die invasive Zelllinie eine etwas geringere MIF-Gen-Expression aufwies (Abb. 15 A). Da sich alle Zellen in unstimuliertem Zustand befanden, kann festgestellt werden, dass sowohl Mamma-Epithel- als auch Mamma-Karzinom-Zellen MIF benötigen, jedoch in unterschiedlichem Maße.

Zur weiteren Untersuchung der Frage, ob lediglich die MIF-Expression Unterschiede aufweist oder ob auch der MIF-Protein-Gehalt intrazellulär differiert, wurden Zelllysate von wiederum unstimulierten Zellen mit Hilfe von Western Blots analysiert. Analog zu den Expressionsmustern, wiesen die invasiven MDA-MB-231-Zellen weniger MIF-Gesamtprotein auf als die gesunden Epithelzellen MCF-12A, während in den beiden nicht-invasiven Zelllinien eine Hochregulation beobachtet werden konnte (Abb. 15 B und C).

Somit konnte insgesamt festgestellt werden, dass sowohl die MIF-Synthese als auch die intrazelluläre Speicherung dieses Proteins in den verschiedenen Mamma-Karzinom-Zelllinien sehr unterschiedlich sind, sodass MIF in den verschiedenen Mamma-Zellen eine wichtige Rolle einnehmen könnte, die beispielsweise die Invasionsfähigkeit des Tumors bestimmt. Schon hierbei zeichnet sich ab, dass Tumoren je nach ihrer Invasionsfähigkeit unter Umständen verschieden therapiert werden müssen.

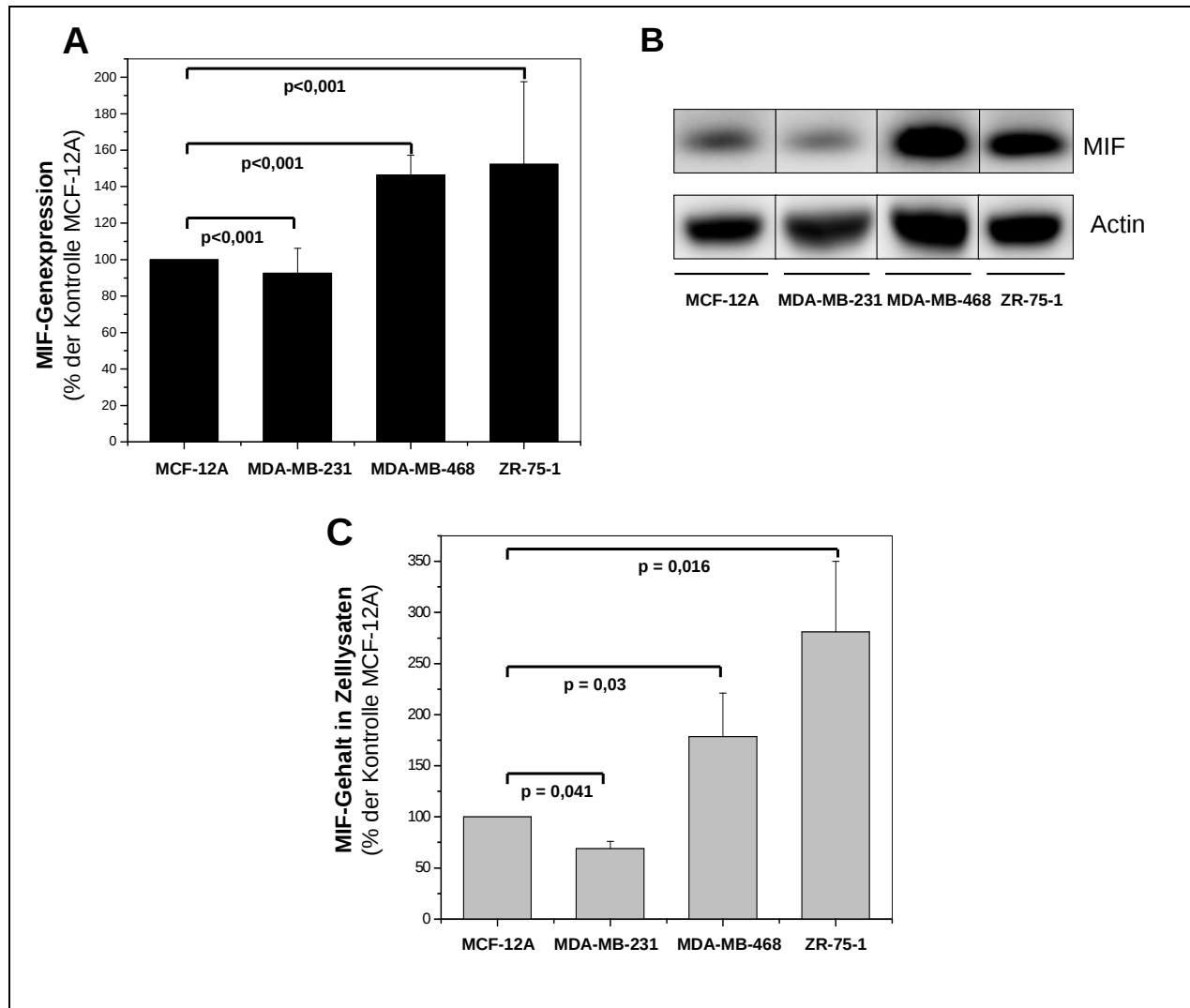


Abb. 15: MIF-Genexpression und MIF-Konzentration in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien

(a) MIF-Genexpression in den nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen im Vergleich zu den invasiven MDA-MB-231 und den beiden nicht-invasiven MDA-MB-468 und ZR-75-1-Zelllinien. Die mRNA wurde aus unstimulierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die MIF-Expression mit Hilfe der *real-time*-PCR bestimmt. Die Expressionslevel wurden jeweils im Vergleich zu den Kontrollzellen MCF-12A angegeben. Die MIF-Genexpression zeigte in allen Zellarten einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle mit $p > 0,0001$. Die Abbildung stellt die Untersuchung von zwei unabhängigen Experimenten dar, die jeweils in Duplikatur durchgeführt wurden. (b) Repräsentative Western Blot Banden. Zellysate von unstimulierten Zellen wurden in der SDS-Page aufgetrennt und auf eine Blot-Membran übertragen. Die Detektion wurde nach Behandlung mit anti-human-MIF-Antikörpern durchgeführt, wobei Aktin als Kontrolle zur Normalisierung verwendet wurde. Das Experiment wurde vierfach unabhängig voneinander durchgeführt. (c) Quantitative Auswertung der Western Blot Analysen aus (b). Alle Bandenintensitäten für MIF wurden auf Aktin normiert. Signifikante Unterschiede im Bezug auf die Kontrolle MCF-12A sind jeweils mit zugehörigen p-Werten angegeben. Die Balken stellen Werte aus vier unabhängigen Experimenten dar. In den Abbildungen (a) und (c) sind die Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben.

4.1.2 PTEN korreliert mit der Akt-Aktivierung in Mamma-Zelllinien

Vorherige Arbeiten von Lue *et al.* [53] haben gezeigt, dass die beiden nicht-invasiven Zelllinien MDA-MB-468 und ZR-75-1 sehr geringe PTEN-Konzentrationen aufweisen, wobei der Tumorsuppressor PTEN in ZR-75-1-Zellen hemizygot ausgeprägt ist. Das verbleibende

Allel in den heterozygoten Zellen trägt jedoch eine *missense*-Mutation und ist somit nicht funktionsfähig. Somit können beide Zelllinien als PTEN-negativ betrachtet werden.

Die invasive Zelllinie MDA-MB-231 und die gesunden Kontrollzellen der MCF-12A-Linie wiesen in Western Blot Analysen eine erhöhte Konzentration an PTEN-Protein auf, wobei der PTEN-Gehalt in den MDA-MB-231-Zellen deutlich unter dem der MCF-12A-Zellen lagen (Abb. 16 A).

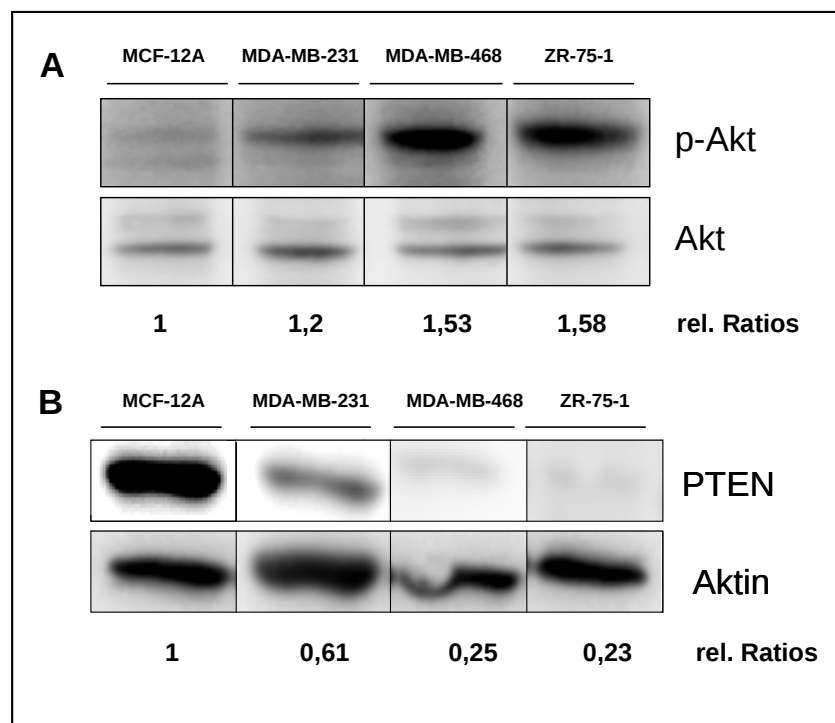


Abb. 16: Negative Korrelation von Akt-Aktivierung und PTEN-Gehalt in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinomzellen. Western Blot Analysen von Zelllysaten unstimulierter Zellen. (a) Die Banden wurden mit Hilfe von p-Akt und Akt-Antikörpern dargestellt. Zusätzlich sind die p-Akt/Akt-Ratios angegeben. (b) Der PTEN-Gehalt in den vier Mamma-Zelllinien wurde durch Inkubation mit einem PTEN-Antikörper sichtbar gemacht. Aktin wurde dabei als Auftragskontrolle verwendet. Die relativen PTEN-Konzentrationen im Bezug auf Aktin sind angegeben. Beide Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die jeweiligen Ratios sind auf die Werte der Zelllinie MCF-12A normiert.

Im weiteren Verlauf sollte die p-Akt/Akt-Ratio der Tumorzellen mit Hilfe von Western Blots bestimmt werden. Eine Akt-Aktivierung wird sehr häufig in Tumoren beobachtet und mit der Zelldifferenzierung und der Tumorausbreitung in Verbindung gebracht [158, 159].

Es ist bekannt, dass viele menschliche Karzinome PTEN-negativ sind und durch die fehlende Inhibitionswirkung des Tumorsuppressors die Akt-Aktivierung stark hochreguliert werden kann. Jedoch wurde gleichzeitig in einigen Nierentumoren beobachtet, dass auch ein erhöhtes PTEN-Level mit einer starken Akt-Aktivierung in Kombination auftreten kann [160].

Die vorliegenden Analysen von unstimulierten Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen zeigten, dass die beiden PTEN-negativen Zelllinien eine relativ starke Akt-Aktivierung aufwiesen (Abb. 16 B). Durch das fehlende PTEN wird die PIP3 nach der Aktivierung des

PI3K-Weges nicht dephosphoryliert und somit kann Akt aktiviert werden. In den gesunden, nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen lag PTEN in hoher Konzentration vor, sodass der Akt-Signalweg zumindest teilweise gehemmt wurde und das Verhältnis von p-Akt zu Akt deutlich geringer war. Die invasiven MDA-MB-231-Zellen wiesen ein geringeres, aber feststellbares PTEN-Level auf und zeigten eine höhere Akt-Aktivierung. Die hemmende PTEN-Wirkung war somit geringer als in den Kontrollzellen, sodass der PI3K-Weg ungehinderter ablaufen konnte.

Somit kann festgehalten werden, dass sich in den untersuchten Mamma-Zelllinien PTEN invers zur Akt-Aktivierung verhält.

Im weiteren Verlauf sollte nun der MIF-Signalweg genauer betrachtet werden, ausgehend von seinen Rezeptoren CD74 und CXCR4.

4.2 CD74 und CXCR4 werden auf Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien exprimiert

Das Oberflächenmolekül CD74 ist bekannt als membranständige Bindungsstelle für den Makrophagen-migrationsinhibierenden-Faktor (MIF), wobei auf Monocyten auch CXCR2 und CXCR4 als funktionelle Rezeptoren für MIF identifiziert werden konnten [46, 161].

CD74 scheint jedoch nicht allein als Rezeptor zu fungieren, sondern seine Funktion ist nur im Komplex mit CD44 gewährleistet, sodass CD44 einen integralen Bestandteil des Gesamtkomplexes darzustellen scheint [49].

Da MIF das Tumorstadium und die Differenzierung von Tumorzellen beeinflusst, wie auch Meyer-Siegler *et al.* schon am Beispiel von Prostata-Biopsien und Zelllinien gezeigt haben, sollte nun auch im Bereich von Mamma-Tumoren der Zusammenhang von CD74 und MIF bestimmt werden [48]. Dazu wurde zunächst untersucht, ob die verwendeten Mamma-Zelllinien CD74 exprimierten und ob dieses auch als Oberflächenprotein vorlag.

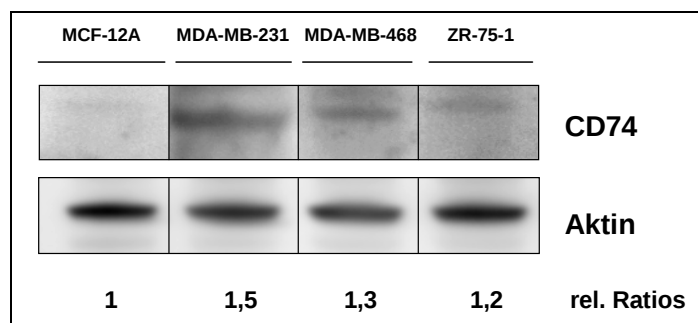


Abb. 17: Der CD74-Gehalt ist in Mamma-Karzinomzellen deutlich höher als in den nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen; Zelllysate von unstimulierten Mamma-Zellen wurden mit Hilfe von Western Blots untersucht. Aktin wurde als Auftragskontrolle verwendet. Die CD74/Aktin-Ratios sind normiert auf MCF-12A angegeben. Es handelt sich um repräsentative Banden aus drei unabhängigen Experimenten. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie wurde eine unspezifische Bande unterhalb der CD74-Bande wegretuschiert.

Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurden Lysate der unstimulierten Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen auf CD74 untersucht. Es zeigte sich, dass in allen Zelllinien CD74 vorlag, jedoch in unterschiedlichem Maße. MCF-12A-Zellen waren nur marginal CD74-positiv, während die invasive Zelllinie MDA-MB-231 erhöhte CD74-Level zeigte. Die beiden nicht-invasiven Zelllinien zeigten ebenfalls CD74-Expression, jedoch etwas geringer als in der invasiven Linie (Abb. 17).

Im weiteren Verlauf war es nun interessant zu untersuchen, in welchem Verhältnis CD74 als Oberflächenmolekül in den verschiedenen Zelllinien vorhanden ist, um als Rezeptor wirken zu können, da der Mechanismus der Internalisierung von CD74 und des späteren Recyclings schon länger bekannt ist [162].

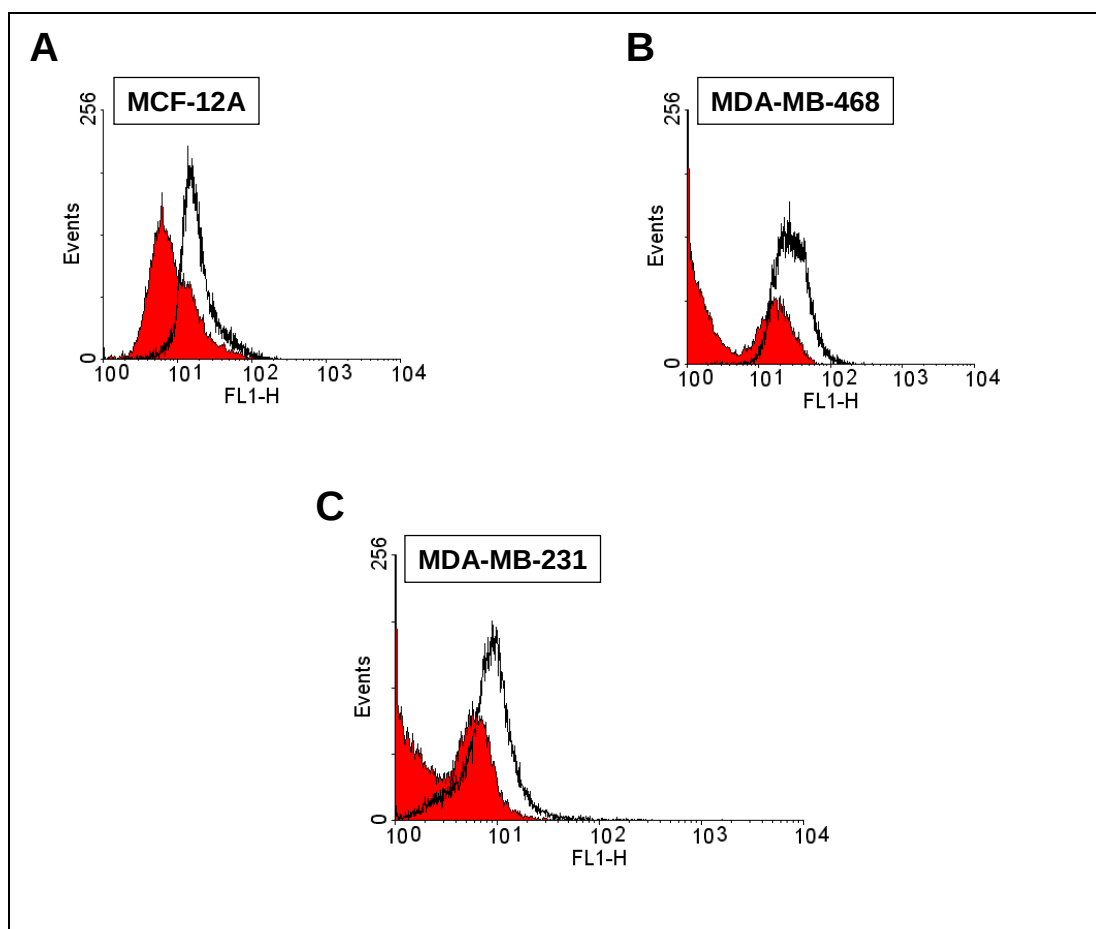


Abb. 18: CD74 als möglicher MIF-Rezeptor auf Mamma-Zellen. Es wurden FACS-Analysen mit Hilfe eines CD74-Antikörpers in Kombination mit einem FITC-markierten Sekundärantikörpers durchgeführt. In rot ist die unbehandelte Population dargestellt und in schwarz die jeweilige mit Antikörpern behandelte Population. CD74 wird sowohl auf nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen (a) als auch auf nicht-invasiven MDA-MB-468- (b) und invasiven MDA-MB-231-Zellen (c) als Oberflächenmolekül exprimiert. Es handelt sich bei den Abbildungen um repräsentative Histogramme, wobei drei unabhängige FACS-Analysen durchgeführt wurden. Die Populationen erschienen im Dot Plot durchgehend einheitlich, die Kontrolle nach Behandlung nur mit Sekundärantikörper war unauffällig.

Als Methode diente zunächst die FACS-Analyse, wobei die Kontrolllinie MCF-12A in Kombination mit jeweils einer invasiven (MDA-MB-231) und einer nicht-invasiven (MDA-MB-468) Zelllinie gemessen wurde. Auch in diesen Experimenten wiesen alle untersuchten Zelllinien CD74 als Oberflächenmolekül auf, jedoch konnte nur ansatzweise abgeschätzt werden, dass die beiden Tumorzelllinien etwas mehr CD74 tragen (Abb. 18).

FACS-Analysen auf CXCR-4 (Daten nicht gezeigt) ergaben auf allen drei Zelltypen sehr geringe CXCR4-Level.

Im Bereich von Prostata-Tumoren war beschrieben worden, dass invasive Karzinome eine höhere CD74-Expression haben, die sich in einem deutlich vermehrtem Oberflächen-CD74-Gehalt zeigt [48]. Um dieses Ergebnis im Bereich der Mamma-Tumoren bestätigen oder widerlegen zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nativen, CD74-markierten Zellen der unterschiedlichen Zelllinien betrachtet.

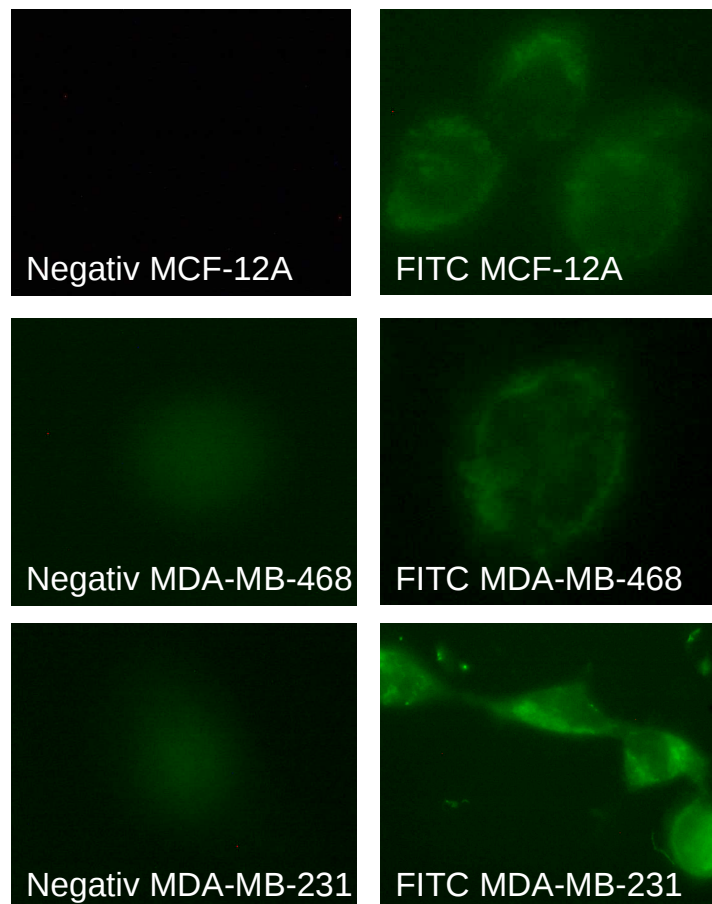


Abb. 19: CD74 als Oberflächenmolekül findet sich vermehrt auf invasiven MDA-MB-231-Zellen. Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die CD74-Oberflächenexpression in MCF-12A, MDA-MB-468 und MDA-MB-231-Zellen untersucht. Dabei wurde ein FITC-markierter CD74-Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Zellen nur mit einem Anti-Maus-Antikörper gefärbt, um unspezifische Antikörper-Bindungen ausschließen zu können. Die geringfügige, intrazelluläre Grünfärbung scheint sich aus Antikörper-CD74-Komplex-Internalisierungen zu ergeben. Die Bilder stehen repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Dort zeigte sich wiederum eine Oberflächenexpression von CD74 auf allen Zelltypen, wobei jedoch die invasiven MDA-MB-231-Zellen eine erhöhte Anzahl an CD74-Molekülen aufwiesen (Abb. 19). Die Zellen wiesen einen deutlich gefärbten Ring auf, der anzeigte, dass die CD74-Moleküle auf der Oberfläche sitzen. Die leicht grüne, intrazelluläre Färbung lässt sich wahrscheinlich aus der Internalisierung einiger CD74-Antikörper-Komplexe erklären. Als Negativkontrolle wurde ein Anti-Maus-Antikörper verwendet, um trotz des FITC-gekoppelten CD74-Antikörpers unspezifische Bindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass CD74 eine entscheidende Rolle im Bereich der Tumorentstehung einnimmt, sodass invasive Tumoren in erhöhtem Maße die Möglichkeit haben, auf stimulierendes, extrazelluläres MIF zu reagieren. In diesem Zusammenhang sollten im weiteren Verlauf der Arbeit funktionelle Eigenschaften der verschiedenen Mamma-Zelllinien genauer untersucht werden.

4.3 Stimulation mit rMIF bewirkt eine gesteigerte, endogene MIF-Sekretion der Mamma-Zellen

In Makrophagen wurde die Sekretion von MIF nach Stimulation schon in diversen Studien nachgewiesen, wobei auch erste Arbeiten über die MIF-Sekretion von Tumorzellen veröffentlicht worden sind [39]. Insbesondere wurden auch autokrine Wege vorgeschlagen, über die Makrophagen MIF sezernieren können [53]. Im Bereich von Mamma-Karzinomen liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor.

Um der Hypothese der autokrinen MIF-Ausschüttung weiter nachzugehen und diesen möglichen Weg des Tumorzellwachstums in Mamma-Karzinomen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Stimulationen von Tumorzellen mit rekombinantem MIF und nicht-tumorösem Gewebe zu einer erhöhten endogenen MIF-Sekretion führen. Es sollte also überprüft werden, ob die Zellen ihre MIF-Sekretion nach Stimulation über einen autokrinen *loop* regulieren können.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die MIF-Sekretion von unstimulierten Zellen untersucht, die lediglich in 0,5 %-FCS-Medium inkubiert wurden. Die Überstände wurden nach 20 min, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h abgenommen und die MIF-Konzentration mit Hilfe des huMIF-ELISA bestimmt.

Es zeigten sich große Unterschiede im Sekretionsverhalten der verschiedenen unstimulierten Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen (Abb. 20). Zunächst konnte festgehalten werden, dass die MIF-Sekretion bei allen Zelltypen kontinuierlich ablief und durch den kumulativen Effekt eine Zunahme der MIF-Konzentration in den Überständen zu beobachten war. Somit waren die MIF-Wiederaufnahme und der mögliche Abbau langsamer

als die Sekretion oder nicht vorhanden. Die nicht-invasiven Tumorzellen, deren MIF-Gehalt intrazellulär sehr hoch ist, sezernierten deutlich größere MIF-Mengen als die invasive MDA-MB-231-Zelllinie und die nicht-tumörösen MCF-12A-Zellen.

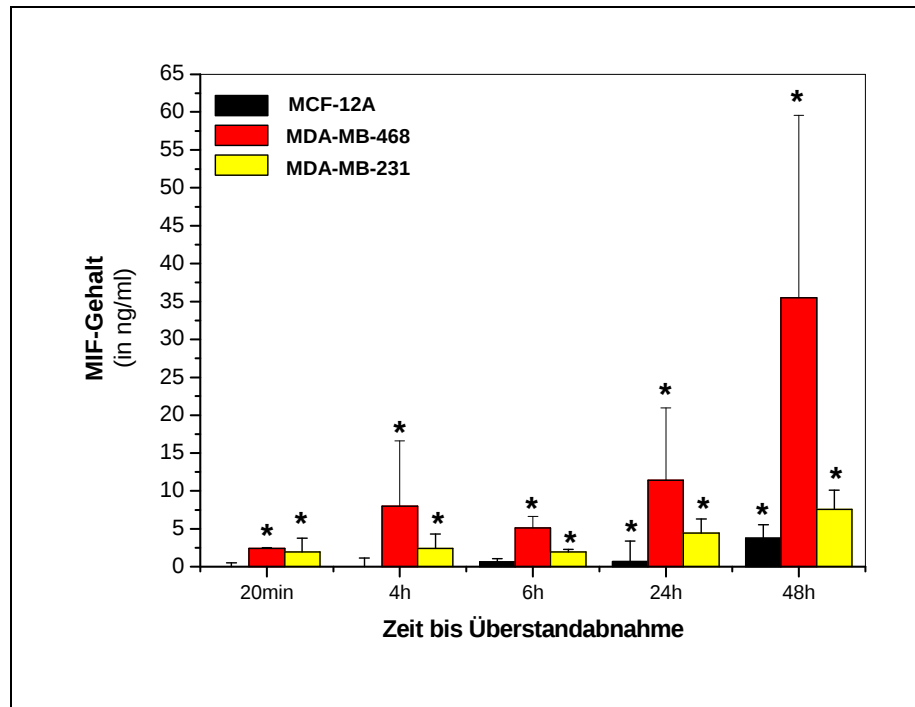


Abb. 20: Mamma-Karzinomzellen zeigen im unstimulierten Zustand eine erhöhte MIF-Sekretion im Vergleich zu gesunden Mamma-Epithelzellen. Die Überstände von Mamma-Zellen wurden nach Inkubation in 0,5 % FCS-Medium nach 20 min, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h gewonnen und die MIF-Konzentration mit Hilfe des huMIF-ELISA jeweils in Duplikatur bestimmt. Die MCF-12A-Zellen (schwarz) sezernierten weniger MIF als die invasiven MDA-MB-231-Zellen (gelb). Die höchste MIF-Konzentration zeigte sich im Überstand von den nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede im Bezug auf die Kontrollzellen MCF-12A zum Zeitpunkt 20 min wurden mit einem Stern gekennzeichnet: *: $p < 0,05$.

Im weiteren Verlauf sollte nun die MIF-Sekretion unter Stimulation mit rekombinantem MIF (150 ng/ml) beobachtet werden. Dazu wurden die Zellen wiederum in 0,5 %-FCS-Medium inkubiert, um eventuell durch FCS verursachte Störeffekte zu eliminieren. Die Zellen wurden alle für 48 h in Kultur gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten vor Versuchsablauf mit rMIF stimuliert.

Abb. 21 zeigt zunächst die absoluten MIF-Konzentrationen in den Überständen nach Stimulation mit rMIF (150 ng/ml), wobei die Zeiten jeweils die Stimulationsdauer angeben. Alle Zellen wurden für 48 h inkubiert und jeweils in den letzten Zeitintervallen vor Versuchsende stimuliert. Bei den gemessenen Werten muss beachtet werden, dass anteilmäßig, soweit nicht endozytiert oder abgebaut, das zur Stimulation verwendete rMIF enthalten ist. Somit können nur Konzentrationen über 150 ng/ml eindeutig als Sekretion angesehen werden, da noch nicht genau bekannt ist wie lange MIF benötigt, um in die Zelle

zu gelangen und in welchen Mengen verschiedene Zelltypen MIF aufnehmen können. Es sei auch bemerkt, dass die MIF-Konzentration in den Überständen vor allem bei den längeren Inkubationszeiten auch einen gewissen Anteil *de-novo*-Synthese umfasst. Jedoch zeigte sich trotz dieser Probleme in allen Zelllinien eine deutliche MIF-Sekretion, die nach Stimulation mit gekochtem MIF und Dialysepuffer (Daten nicht gezeigt) nicht vorzufinden war. Die absoluten MIF-Konzentrationen lagen in den MDA-MB-468-Zellen mit bis zu 700 ng/ml am höchsten, während die nicht-tumorösen MCF-12A-Zelllinie deutlich weniger sezernierten (bis 490 ng/ml). Die invasive Tumorzelllinie MDA-MB-231 lag mit ihrem MIF-Gehalt in Bereichen von 500 bis 600 ng/ml. Die Sekretion der ZR-75-1-Zellen schwankte zwischen den einzelnen Experimenten sehr stark (Daten nicht gezeigt).

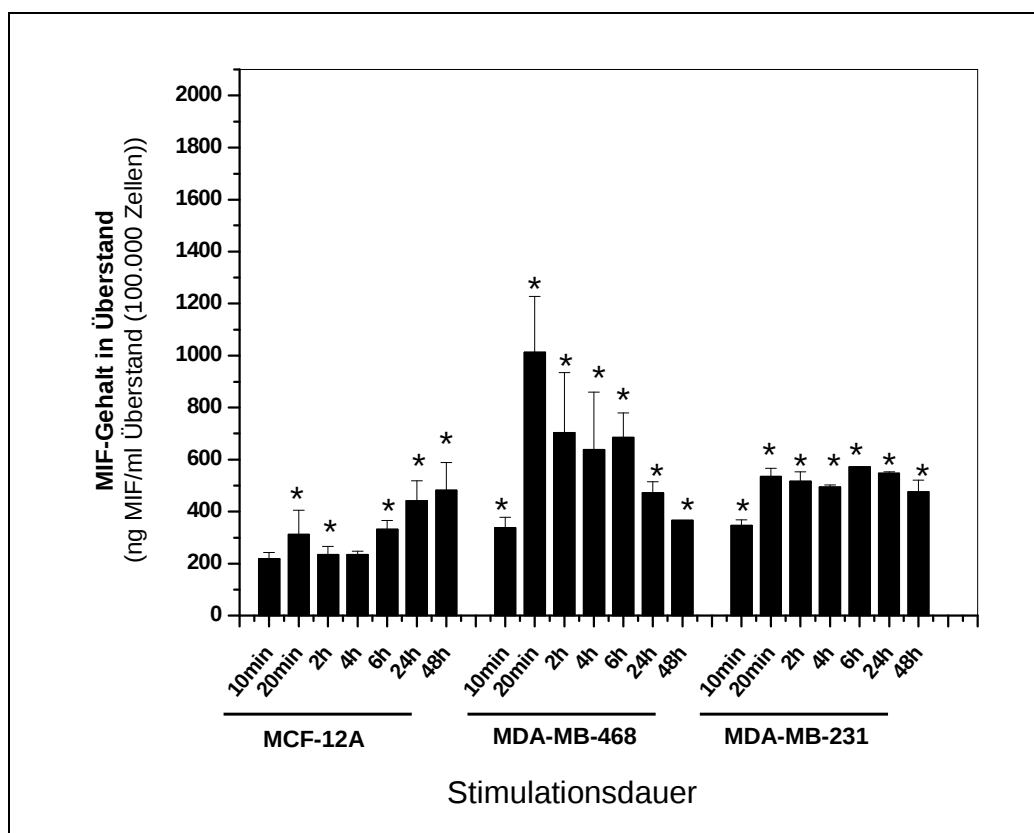


Abb. 21: MIF-Gehalt in Überständen von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen nach Stimulation mit exogenem, rekombinatem MIF. Die nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen und die Tumorzellen MDA-MB-468 und MDA-MB-231 wurden in 0,5 % FCS-Medium für unterschiedliche Zeitintervalle mit rMIF stimuliert. Die Stimulationsdauer bezieht sich dabei jeweils auf das Intervall vor Ablauf der 48 h Gesamtinkubationszeit. Die absolute Sekretion, bestimmt mit Hilfe des huMIF-ELISA, ist in den nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen am höchsten, während die invasiven MDA-MB-231-Zellen nur geringfügig mehr sezernieren als die nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant von den zugegebenen 150 ng/ml MIF mit $p < 0,05$. Bei allen dargestellten MIF-Konzentrationen handelt es sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit Bestimmungen jeweils in Duplikatur.

Betrachtete man nun die Hochregulation der MIF-Sekretion im Vergleich zur Sekretion der unstimulierten Zellen, so ergaben sich interessante Zusammenhänge. Die MDA-MB-231, die

intrazellulär die niedrigste MIF-Konzentration der untersuchten Zelllinien aufwiesen, zeigten die stärkste relative Hochregulation der MIF-Sekretion nach Stimulation mit rMIF (Abb. 22). Im Gegensatz dazu konnten die stark MIF-positiven MDA-MB-468- und die ZR-75-1-Zellen ihre Sekretion deutlich weniger steigern. Um ganz sicher sein zu können, dass das stimulierende MIF nicht mit in die Berechnungen der Hochregulationen eingeht, wurden von den jeweiligen MIF-Konzentrationen zu allen Zeitpunkten 150 ng/ml subtrahiert. Somit entspricht die Abbildung nicht ganz den realen Sekretionssteigerungen, die teilweise noch etwas höher liegen könnten.

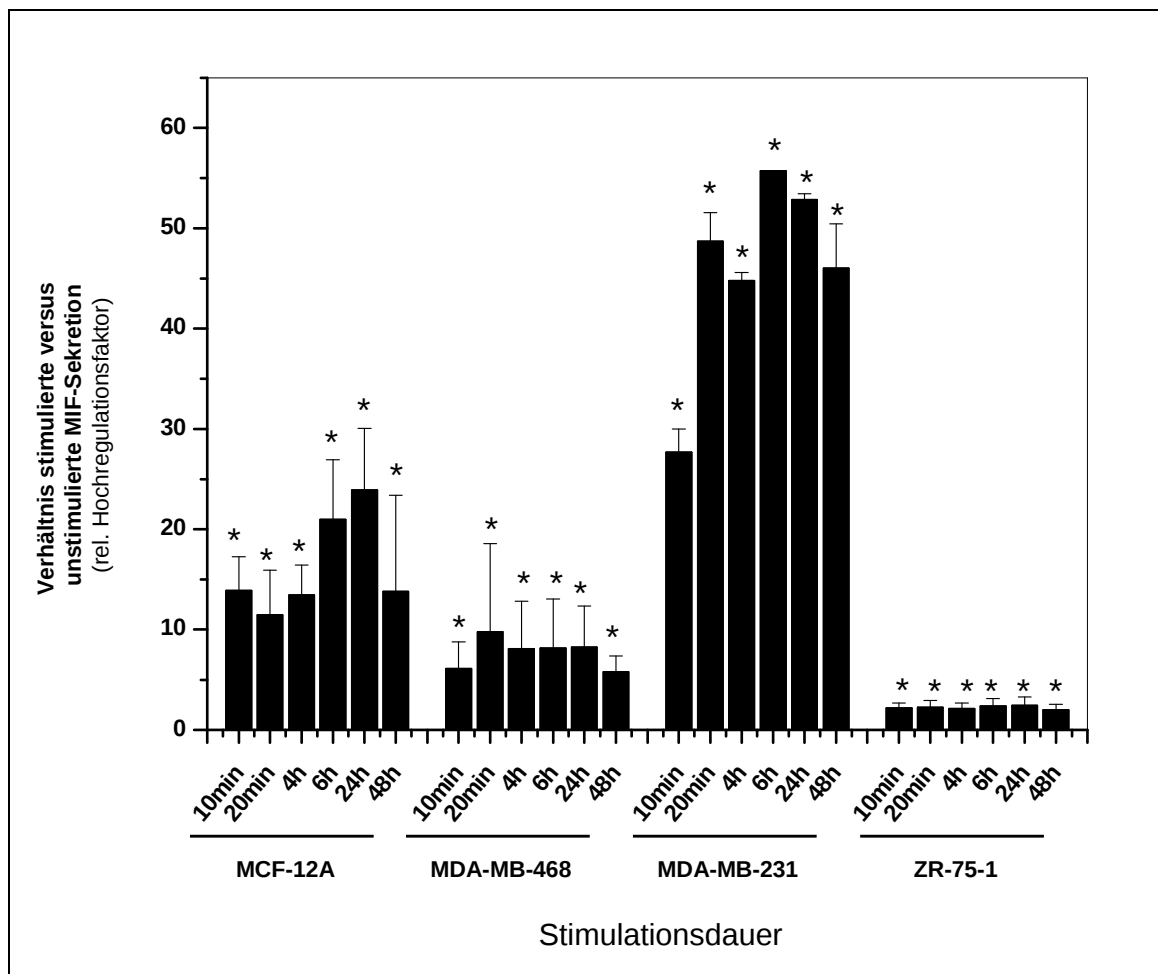


Abb. 22: Starke Hochregulation der MIF-Sekretion nach Stimulation mit exogenem, rekombinantem MIF besonders bei den invasiven MDA-MB-231-Zellen. Es wurde ein relativer Hochregulationsfaktor bestimmt, der sich aus den MIF-Konzentrationen in den Überständen von unstimulierten Zellen nach 48h Inkubation und den MIF-Konzentrationen in den Überständen von zu verschiedenen Zeitpunkten stimulierten Mamma-Zellen zusammensetzt. Um die zugegebene MIF-Menge von 150 ng/ml nicht einbeziehen zu müssen, wurde dieser Wert von allen MIF-Konzentrationen, die sich in den Überständen der stimulierten Zellen mit Hilfe des huMIF-ELISA ergaben, subtrahiert. Die invasiven Mamma-Karzinom-Zellen können ihre Sekretion stark hochregulieren, während die beiden nicht-invasiven Zelllinien MDA-MB-468 und ZR-75-1 auf die rMIF-Stimulation deutlich schwächer reagieren. Die MCF-12A-Zellen zeigen eine stärkere Erhöhung der Sekretion als die beiden nicht-invasiven Linien. Die Balken repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten, wobei die Konzentrationen in den Überständen jeweils in Duplikatur bestimmt wurden. Die Sterne kennzeichnen die Werte, die sich signifikant mit $p < 0,05$ von einem relativem Hochregulationsfaktor mit dem Wert 1 unterscheiden, welcher keiner Veränderung der MIF-Sekretion entspricht.

Diese Experimente ergaben insgesamt, dass exogen zugegebenes rMIF die endogene MIF-Sekretion in bestimmten Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen dramatisch steigert. Ist die MIF-Sekretion der unstimulierten Zelllinie sehr gering, so sind gerade diese Zellen in der Lage, ihre Sekretionsvorgänge deutlich zu steigern. Die ohnehin schon stark MIF-positiven Zelllinien sezernieren sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Zustand hohe Mengen an MIF, sodass die Hochregulation nach Stimulation mit rMIF entsprechend niedriger ausfällt. Insgesamt kann man sagen, dass die Zellen ihre Stimulation durch MIF wiederum mit einer MIF-Sekretion beantworten, einhergehend mit der Aktivierung eines autokrinen *loop*.

4.4 MIF fördert das Adhäsionsverhalten von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien

4.4.1 Unterschiedliche Adhäsion von Mamma-Zellen ohne Stimulus

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels haben gezeigt, dass Mamma-Zellen MIF schon in unstimuliertem Zustand in gewissem Maße sezernieren, jedoch nach Stimulation mit rMIF in deutlich erhöhtem Maße.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob rekombinantes MIF die Zelladhäsion fördert und die Zellen sich somit unter Umständen selber zur Anhaftung an die Extrazellulärmatrix stimulieren können. Die Adhäsion ist ein Integrin abhängiger Prozess, bei dem die Oberflächenmoleküle an entsprechende Liganden in der Extrazellulärmatrix binden [142].

Zur Simulation der physiologischen Basalmembran wurde eine Matrigel-Matrix verwendet, deren Hauptbestandteile Laminin, Kollagen IV und Entactin sind [144, 163]. Integrine regulieren als Oberflächenmoleküle sowohl die Formation von neuen Zell-Matrix-Kontakten als auch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen und weiteren intrazellulären Signalwegen [142].

Zunächst wurde die Adhäsionsrate der drei Zelllinien MCF-12A, MDA-MB-468 und MDA-MB-231 ohne vorherige Stimulation untersucht. Die Adhäsionszeit betrug 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte beobachtet werden (Abb. 23), dass die beiden Tumorzelllinien deutlich besser adhärierten. Die Adhäsionsrate der invasiven MDA-MB-231-Zellen lag leicht über der Rate der nicht-invasiven MDA-MB-468; beide konnten sich relativ deutlich von den MCF-12A-Zellen absetzen.

Tumorzellen entwickeln somit in ihrer Differenzierung Mechanismen, die ihnen helfen, besseren und schnelleren Kontakt zur Extrazellulärmatrix zu gewinnen. Zusätzlich ergeben sich scheinbar auch Effekte, die ihnen bei Invasionsprozessen helfen können. In weiteren

Experimenten sollte nun untersucht werden, ob Stimulationen mit rMIF die Adhäsion zusätzlich fördern können.

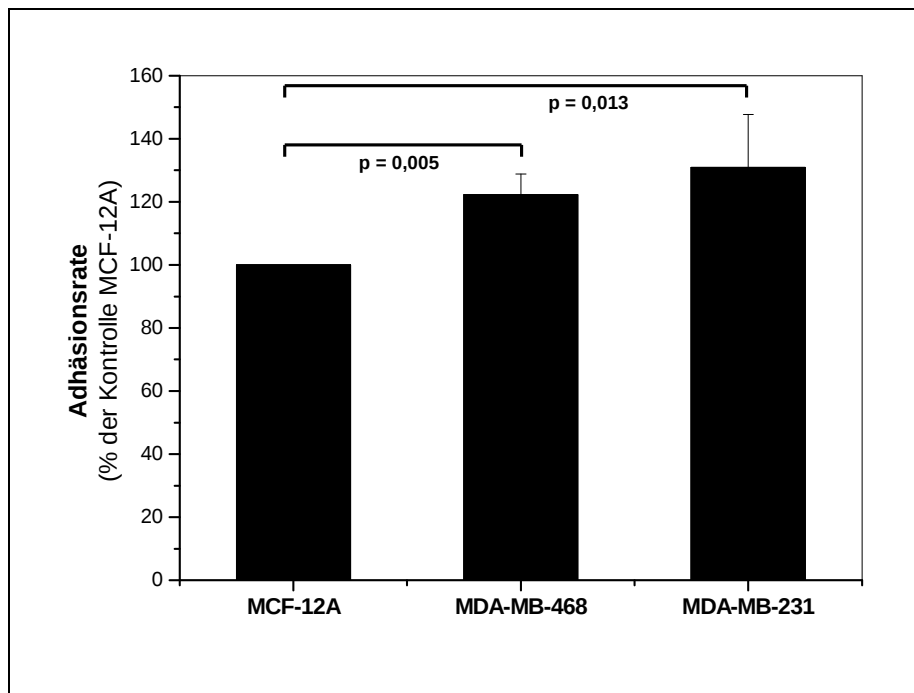


Abb. 23: Mamma-Karzinomzellen MDA-MB-468 und MDA-MB-231 adhäreren besser als die gesunden Epithelzellen MCF-12A. Die Zellen wurden auf einer Matrigelbeschichtung ausgesät und die Adhäsionszeit betrug 45 min; Fixierung und Färbung mit Kristallviolett gingen der Trocknung über Nacht bei 37 °C voraus. Nach 10-16 h wurde der Farbstoff mit Triton-X-100 herausgelöst und der Farbunterschied über Absorptionsmessungen in Triplikatur bestimmt. Alle Messwerte wurden auf die Kontrolle MCF-12A normiert. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle MCF-12A sind mit den zugehörigen p-Werten angegeben. Die Mittelwerte $\pm$ SEM ergeben sich aus sechs unabhängigen Experimenten.

4.4.2 rMIF fördert die Adhäsion

Liao *et al.* konnten beobachten, dass MIF bei der Zelladhäsion autokrin sezerniert wird und dadurch zu einer MAP-Kinase-Aktivierung führt [164]. Im Folgenden sollte nun betrachtet werden, in wie weit die Gabe von rekombinantem MIF die Zelladhäsion stimuliert.

Die 300.000 Zellen/Well wurden nach der Aussaat für 45 min inkubiert und verschiedene Ansätze für die letzten 15 min, 30 min oder die gesamte Adhäsionszeit mit rMIF (150 ng/ml) stimuliert. Als Kontrollansatz diente die Gabe einer äquivalenten Menge Dialysepuffer über die gesamten 45 min.

Die drei verwendeten Mamma-Zelllinien konnten durch MIF-Gabe signifikant in ihrer Adhäsionsfähigkeit gesteigert werden (Abb. 24), sodass man schlussfolgern kann, dass autokrin sezerniertes MIF unter physiologischen Bedingungen die weitere Adhäsion fördert. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Stimulation für die letzten 30 min vor Versuchsende als effektiver, als eine MIF-Gabe über den gesamten Adhäsionszeitraum.

Dies ließe sich nun mit Hilfe der autokrinen MIF-Sekretion erklären. Nach der ersten, leichten Anhaftung sezernieren die Zellen unter physiologischen Bedingungen MIF, welches die weitere Adhäsion fördert. Liegt MIF von Anfang an vor, so werden eventuell Signalkaskaden innerhalb der Zelle gehemmt, es wird weniger MIF ausgeschüttet und somit die Adhäsion verlangsamt. Zusätzlich entspricht die durchgeführte Stimulation mit 150 ng/ml MIF eventuell nicht den lokalen, physiologischen Bedingungen, sodass auch Übersättigungseffekte möglich sind.

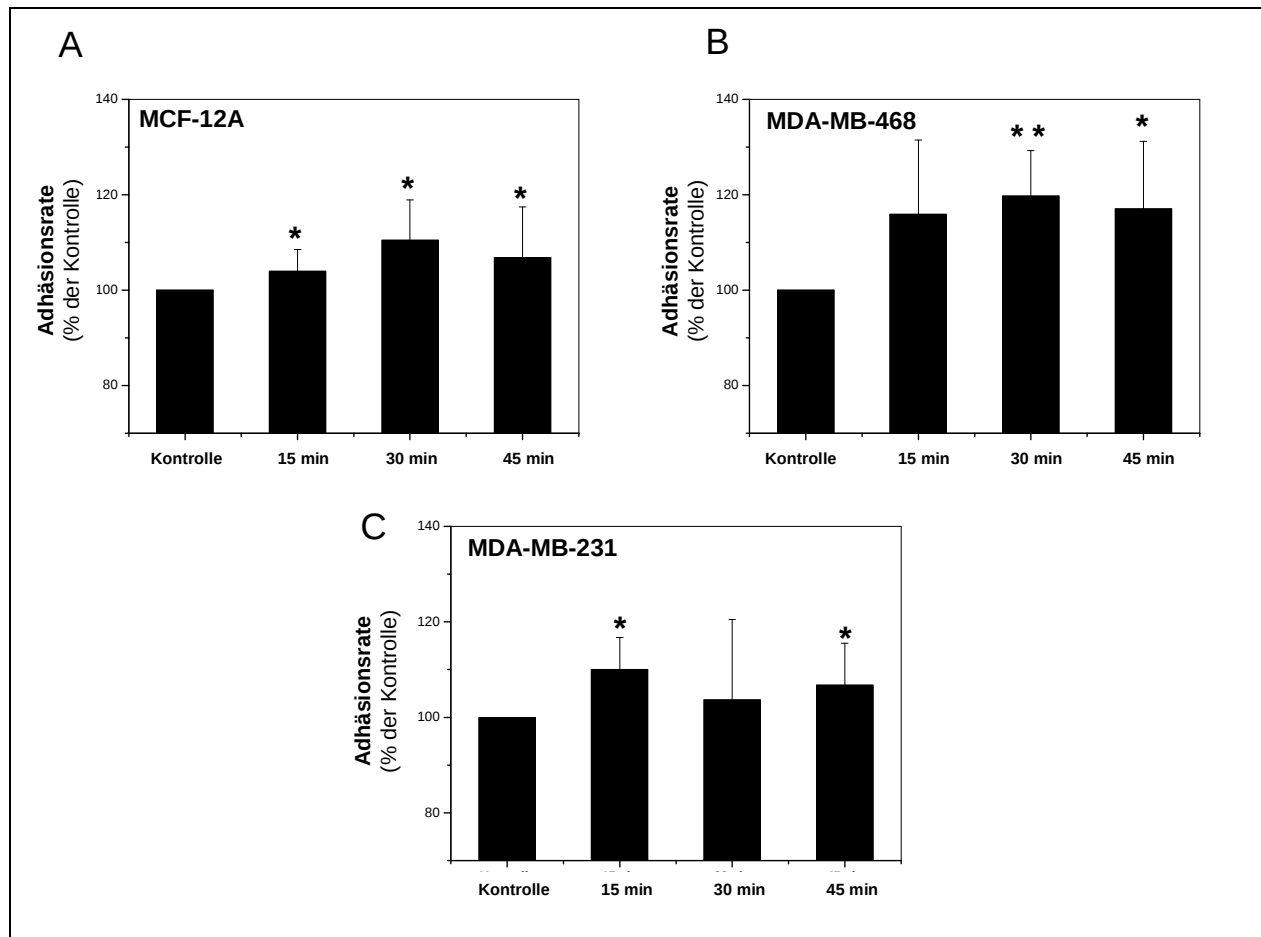


Abb. 24: Die Gabe von exogenem, rekombinantem MIF steigert die Adhäsion von Mamma-Epithel- (MCF-12A) und Mamma-Karzinom-Zellen (MDA-MB-468/231). Die Zellen wurden jeweils in Matrigel-beschichteten Wells ausgesät. Die Adhäsionszeit betrug 45 min. Die MIF-Stimulationen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt: für die gesamten 45 min, für die letzten 30 min und für die letzten 15 min. Die Kontrolle wurde für 45 min mit äquivalenten Mengen Dialysepuffer behandelt. Alle Messwerte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. (a) MCF-12A-Zellen können durch rMIF in der Adhäsion gesteigert werden. Bestimmungen der Adhäsionsrate wurden wie zuvor beschrieben über eine Kristallviolett-Färbung und eine Entfärbung über Triton-X-100 durchgeführt. Es handelt sich um die Mittelwerte $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle mit $p > 0,05$ wurden mit einem Stern gekennzeichnet ($p_{15\text{min}}=0,043$; $p_{30\text{min}}=0,042$; $p_{45\text{min}}=0,046$) (b) Nicht-invasive MDA-MB-468-Zellen zeigen die größte Steigerung der Adhäsionsrate durch Stimulation mit rekombinantem MIF. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus fünf unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur mit Dialysepuffer behandelten Kontrolle sind für $p < 0,05$ mit einem Stern und für $p < 0,01$ mit zwei Sternen gekennzeichnet ($p_{15\text{min}}=0,077$; $p_{30\text{min}}=0,0099$; $p_{45\text{min}}=0,0486$) (c) Invasive MDA-MB-231-Zellen zeigen ebenfalls eine Adhäsionssteigerung, jedoch ist diese geringer als bei den MDA-MB-468-Zellen. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle mit $p < 0,05$ sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p_{15\text{min}}=0,039$; $p_{30\text{min}}=0,386$; $p_{45\text{min}}=0,05$). Alle zugrunde liegenden Absorptionsmessungen wurden jeweils in Triplikatur durchgeführt.

Im Vergleich der nicht-invasiven Karzinomzelllinie mit den gesunden MCF-12A-Zellen zeigte sich unter MIF-Gabe ein gesteigertes Adhäsionsvermögen der MDA-MB-468-Zellen, obwohl diese Zellen ohnehin schon ohne Stimulation deutlich stärker adhärirten. Die invasiven MDA-MB-231-Zellen reagierten ebenfalls auf MIF-Stimulation mit einem Anstieg der Adhäsionsrate, die jedoch etwas niedriger lag als die Rate der MDA-MB-468-Zellen. Dieses Verhalten könnte damit zusammenhängen, dass die invasiven Zellen schon ohne Stimulus am stärksten an der Extrazellulär-Matrix anhaften und MIF anteilmäßig keinen so großen adhäsionssteigernden Effekt mehr hat, wie bei der nicht-invasiven Zelllinie.

4.4.3 Anti-MIF und Anti-CD74 wirken hemmend auf das Adhäsionsverhalten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass exogen-zugegebenes rMIF die Adhäsion von Mamma-Zellen positiv beeinflusst, sollte nun in weiteren Experimenten dieser Effekt untermauert und auch die Wirkung von Anti-MIF-Antikörpern überprüft werden. Da MIF hauptsächlich über CD74 interagiert, wurde auch der Anti-CD74-Antikörper in seiner adhäsionsbeeinflussenden Wirkung überprüft, um die Mechanismen der MIF-Wirkung systematisch zu untersuchen. Als Zelllinie wurden die MDA-MB-468-Zellen verwendet, da sich diese durch rMIF am deutlichsten in ihrem Anhaftungsvermögen beeinflussen ließen. Die Antikörper wurden kurz vor Beginn der Adhäsionszeit hinzu gegeben, um vorhandene Rezeptoren bzw. Liganden schon vorab blocken zu können.

In der Abb. 25 wird deutlich, dass durch Zugabe beider Antikörper die Adhäsion gehemmt werden konnte. In diesem Versuchsansatz wurde durch den Antikörper das sezernierte, zelleigene MIF blockiert, sodass man die Bedeutung des autokrinen Sekretionsweges erkennen konnte. Unter Gabe von Anti-CD74 wurde MIF zwar ausgeschüttet, konnte jedoch nicht über den Oberflächenrezeptor wirken und die Adhäsion beeinflussen. Somit wurden vermutlich sowohl Matrix-Metalloproteinasen als auch Integrine in geringerem Maße aktiviert. Unter Gabe von einem Anti-MIF-Antikörper sank die Adhäsionsrate weiter ab als bei Blockade des CD74-Rezeptors, was für eine MIF-Wirkung auch über andere Wege als nur den CD74-Weg sprechen würde. Erste Pilotuntersuchungen zu CXCR4 (Ergebnisse nicht gezeigt) ergaben jedoch keine MIF-vermittelten Adhäsionshemmungen, obwohl CXCR4 als funktioneller MIF-Rezeptor identifiziert worden ist [46]. Somit bleibt unklar, wie MIF zusätzlich zur CD74-Rezeptorbindung im Adhäsionsprozess interagieren kann. Eine weitere Möglichkeit der Wirkung über CXCR2 wäre denkbar, jedoch ließen sich mit Hilfe von FACS-Analysen keine solche Oberflächenmoleküle auf den Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

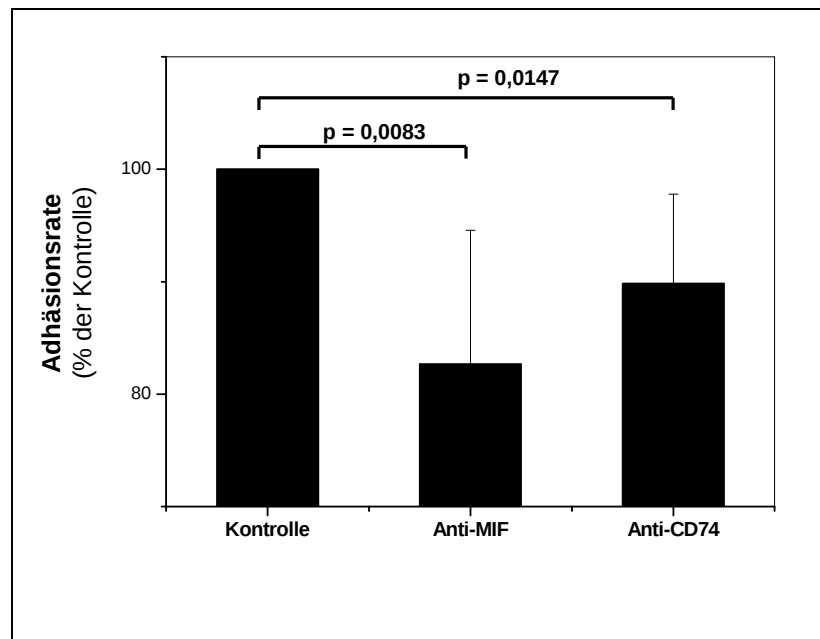


Abb. 25: Blockierung der Adhäsion von MDA-MB-468-Zellen durch Behandlung mit MIF- bzw. CD-74-Antikörpern. Vor der Adhäsionszeit von 45 min wurden die Zellen für 30 min mit MIF- bzw. CD-74-Antikörpern behandelt. Die Kontrolle wurde mit äquivalenten Mengen PBS inkubiert. Nach der Färbung mit Kristallviolett und der Entfärbung mit Triton-X-100 wurden die Absorptionsmessungen jeweils in Triplikatur durchgeführt. Alle Messwerte wurden jeweils auf die Kontrolle normiert. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit zugehörigen p-Werten angegeben.

4.4.4 PI3K-Weg-Inhibitoren beeinflussen die Adhäsion und gleichzeitig auch den Einfluss von rMIF

Die Ergebnisse der Adhäsionsversuche haben gezeigt, dass MIF die Adhäsion von Mamma-Epithel- und Tumorzellen signifikant erhöht und Antikörper gegen MIF bzw. CD74 diesen Effekt hemmen können. Im weiteren Verlauf sollte nun der intrazelluläre Signalweg etwas genauer betrachtet werden. Es ist bekannt, dass in MEF-Zellen durch Gabe von rMIF und seine Bindung an CD74 der PI3K-Weg stimuliert wird, der zu einer Akt-Aktivierung führt [53, 87].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Adhäsion der verschiedenen Mamma-Zelllinien untersucht, da der Akt-Weg als zentraler Signaltransduktionsweg in Bezug auf die Proliferation und Adhäsion von Mamma-Tumoren beschrieben wird [148]. Somit sollte zunächst MIF-unabhängig geklärt werden, ob der PI3K-Weg in seiner Gesamtheit die Adhäsion beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigten sehr deutlich, dass die gesunden MCF-12A-Zellen durch LY294002 in ihrer Adhäsionsfähigkeit gehemmt werden können, ebenso die nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen, jedoch in etwas geringerem Maße (Abb. 26). Die invasive Zelllinie MDA-MB-231 wurde durch eine Inhibition des PI3K-Signalweges nicht in ihrer Adhäsion beeinflusst. Somit

muss dieser Zelltyp eine veränderte Signaltransduktion in Bezug auf die Adhäsion haben, die offenbar völlig Akt-unabhängig abläuft. Die anderen beiden Mamma-Zelllinien zeigten deutlich, dass die Anhaftung der Zellen über den PI3K-Weg und eine damit verbundene Akt-Aktivierung abläuft.

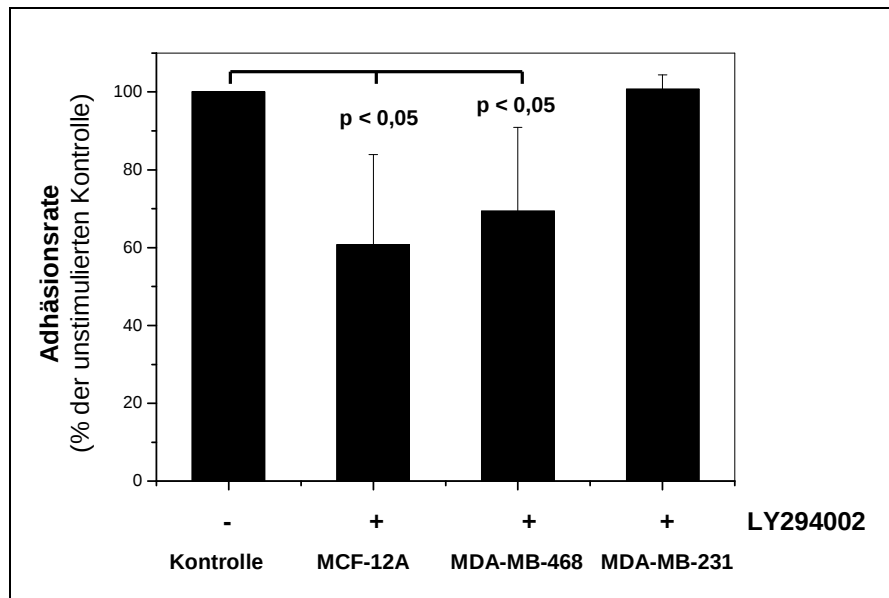


Abb. 26: LY294002 hemmt die Adhäsion von normalen Mamma-Epithel-Zellen und von den nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit dem PI3K-Inhibitor inkubiert und darauf folgend für 45 min ausgesät. Die Kontrolle wurde mit äquivalenten Mengen DMSO behandelt. Alle Messwerte wurden auf die Kontrolle normiert, wobei für jede Zelllinie eine unabhängige Kontrolle inkubiert wurde. Der Balken im Diagramm steht repräsentativ für alle drei Kontrollen. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit zugehörigen p-Werten angegeben.

Da MIF nach Rezeptorwirkung den PI3K-Akt-Weg aktiviert [53], sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob eine Stimulation der mit LY294002-behandelten Zellen mit rMIF ebenfalls keine Adhäsionsänderung zeigt. Wäre dies der Fall, so könnte geschlossen werden, dass MIF im Rahmen der Adhäsion ausschließlich über den PI3K-Akt-Weg wirkt.

Im Rahmen dieses Experiments wurden die Zellen nun mit dem PI3K-Inhibitor vorbehandelt und verschiedene Ansätze nach dem Aussäen für 45 min, 30 min und 15 min zusätzlich mit rMIF stimuliert.

Abb. 27 zeigt zunächst wiederum die beiden schon vorher beschriebenen Effekte; zum einen die Adhäsionsverbesserung unter MIF-Stimulation und zum anderen die Adhäsionshemmung durch LY294002 mit Ausnahme der MDA-MB-231-Zellen. Die weiteren Effekte waren bei den MCF-12A-Zellen nicht ganz eindeutig, lassen jedoch vermuten, dass diese unter Inhibition des PI3K-Akt-Weges nicht mehr auf MIF-Stimulation reagierten. Aus fünf Messungen ergab sich im Mittel nicht die typische *bell-shaped* Kurve. MDA-MB-468-Zellen

zeigten ein sehr interessantes Verhalten. Trotz Gabe von LY294002 konnte die Adhäsion durch rMIF gesteigert werden, wobei die anteilmäßige Zunahme der Adhäsionsrate sogar größer war als ohne Inhibitor. Die Anhaftung der Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 60 % gesteigert werden.

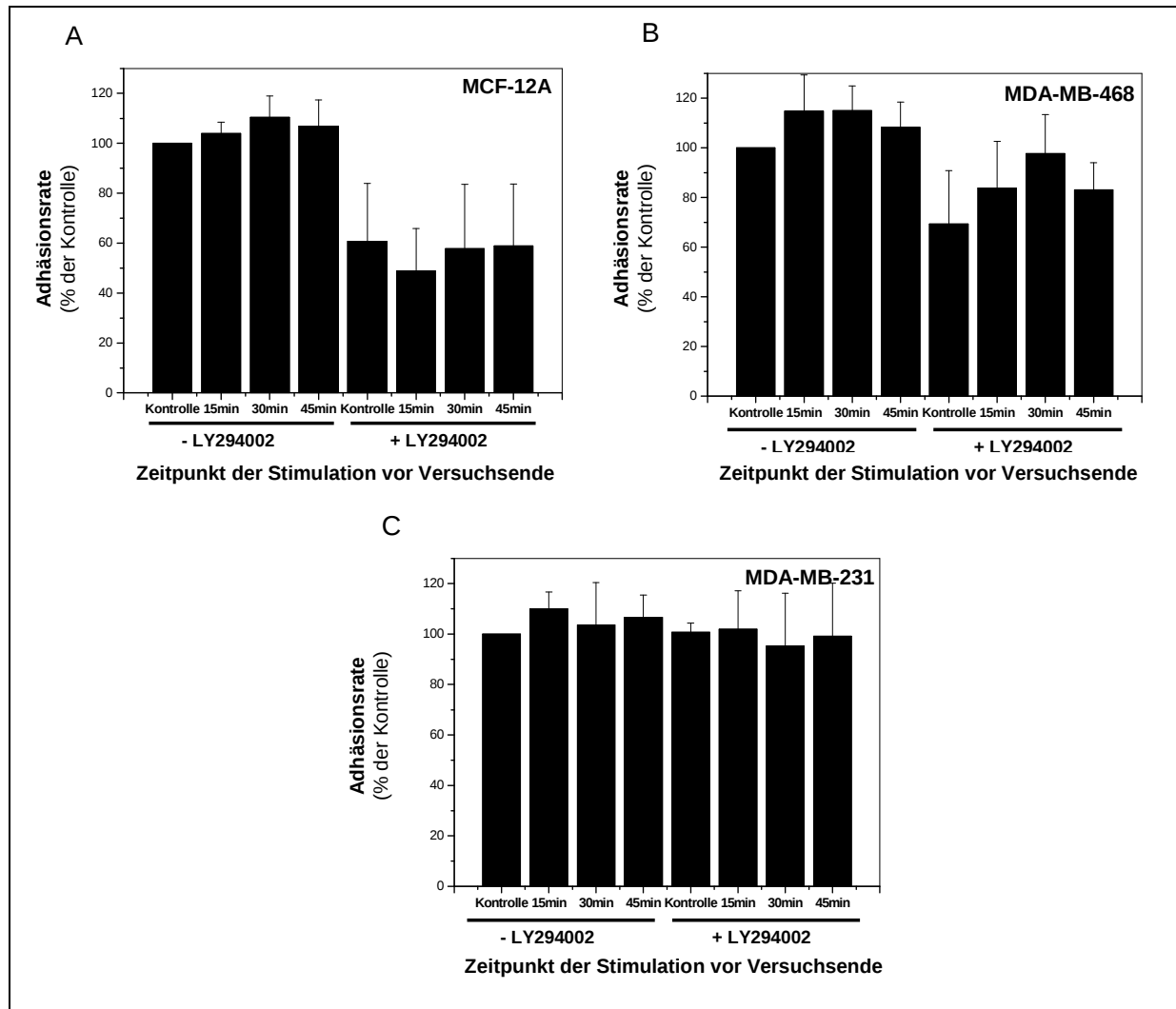


Abb. 27: Adhäsion von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien unter MIF-Stimulation ohne bzw. mit Gabe von LY294002. Die Zellen wurden mit dem PI3K-Inhibitor für 30 min vorinkubiert, danach ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten, für 45 min, für die letzten 30 min und für die letzten 15 min mit rMIF stimuliert. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne LY294002 verwendet. Die nach Färbung und Entfärbung in Triplikatur gemessenen Absorptionswerte wurden jeweils auf die Kontrolle ohne MIF-Stimulation und ohne LY294002 normiert. (a) Ohne LY294002 reagieren die nicht-tumörösen MCF-12A-Zellen mit einer Adhäsionszunahme nach MIF-Stimulation. Dieser Effekt scheint unter Blockade des PI3K-Akt-Weges nicht mehr vorhanden zu sein. Es handelt sich bei den angegebenen Werten um Mittelwerte $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten. (b) MDA-MB-468-Zellen reagieren auf die Stimulation mit exogen zugegebenem MIF sowohl mit als auch ohne LY294002. Jedoch hat rMIF einen größeren Einfluss unter Hemmung des PI3K-Weges. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM aus fünf unabhängigen Experimenten. (c) Die invasiven MDA-MB-231-Zellen zeigen keine eindeutige Reaktion auf rMIF-Stimulation nach LY294002-Gabe, jedoch ist bei diesen Zellen auch die Adhäsionssteigerung durch rMIF ohne den PI3K-Inhibitor relativ gering. Es handelt sich in der Abbildung um Mittelwerte $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

Aus dieser Beobachtung könnte geschlossen werden, dass es in Tumorzellen einen PI3K-unabhängigen, alternativen Weg gibt, über den MIF die Adhäsion stimuliert. Wurde nun der

erste Weg geblockt, könnte der alternative Signalweg hochreguliert worden sein, um eine adäquate Anhaftung weiterhin gewährleisten zu können. Bei den MDA-MB-468-Zellen scheint gerade in dieser Stress-Situation MIF von besonderer Bedeutung zu sein.

Die invasiven MDA-MB-231-Zellen reagierten auch unter LY294002-Gabe unverändert auf MIF, sodass ihre Adhäsion MIF-abhängig, jedoch PI3K-unabhängig zu sein scheint. Vielleicht wird in diesen Zellen der schon vorher vermutete, alternative Weg als Signaltransduktionsweg für MIF verwendet, wobei der MIF-Effekt in dieser Versuchsreihe nicht ganz so eindeutig war, wie in den Experimenten zuvor.

In Bezug auf die Adhäsion kann somit zusammengefasst werden, dass MIF in allen Zelllinien eine fördernde Wirkung hat, jedoch besonders stark in den MDA-MB-468-Zellen. Der PI3K-Inhibitor hemmt die Anhaftung der Zellen an die Extrazellulärmatrix, beeinflusst jedoch auch die MIF-Wirkung in verschiedener Art und Weise. Während MCF-12A-Zellen nicht mehr auf MIF-Stimulation reagieren, sind die MDA-MB-468-Zellen sensibler. Somit ergibt sich die Frage, ob rMIF über einen alternativen Weg die Adhäsion beeinflussen kann.

4.5 MIF führt zu einer vermehrten Zellproliferation

4.5.1 Unterschiedliche Proliferation von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen ohne Stimulus

Neben der Anhaftung an die Extrazellulärmatrix ist die vermehrte Proliferation von Tumorzellen ein weiterer möglicher Angriffspunkt von therapeutischen Maßnahmen. In ersten Experimenten sollten die verschiedenen Proliferationsraten der nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen im Vergleich zu den beiden Tumorzelllinien zunächst MIF-unabhängig betrachtet werden.

Die beiden Tumorzelllinien proliferieren deutlich stärker als das gesunde Epithelgewebe, wobei sich die invasiven MDA-MB-231-Zellen noch einmal deutlich in ihrer Proliferationsrate hervorheben (Abb. 28). Somit kann nicht die Aussage getroffen werden, dass alleine der MIF-Gehalt der Zellen die Wachstumsgeschwindigkeit via autokrinen *loop* bestimmt, da die MIF-Konzentration in MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu den anderen Tumor- und Kontrollzellen am niedrigsten lag. Jedoch handelt es sich bei dieser Linie um CD74-positive Zellen, die den Rezeptor in erhöhtem Maße exprimieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren, sodass sich daraus Zusammenhänge mit der Sensitivität gegenüber MIF ergeben könnten. Im weiteren Verlauf sollte nun genauer untersucht werden, wie groß der Anteil des MIF-Einflusses bei der Proliferation ist und ob sich daraus eventuell Zusammenhänge ergeben könnten, die neue Therapieansätze zulassen. Wünschenswert wäre eine medikamentöse Eliminierung der Tumorzellen, jedoch keine Beeinflussung der gesunden, epithelialen Mamma-Zellen.

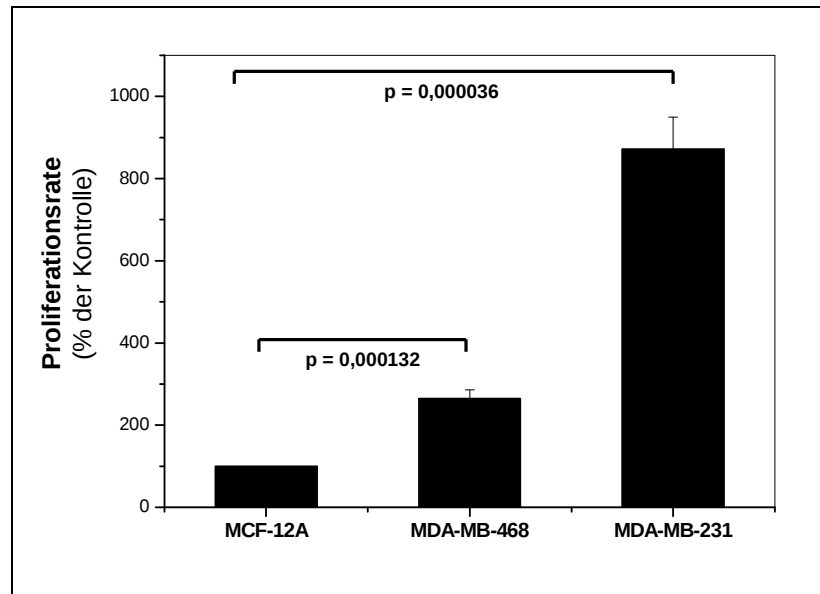


Abb. 28: Die invasiven MDA-MB-231-Zellen proliferieren deutlich stärker als die nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h in 0,5 %-FCS-Medium inkubiert und 4 h vor Versuchsablauf wurde BrdU zur Bestimmung der Proliferation hinzu gegeben. Die weitere photometrische Messung der Absorptionsunterschiede aufgrund verschiedener Proliferationsraten wurde jeweils in Triplikatur durchgeführt. Die einzelnen Messwerte wurden jeweils auf die Kontrolle MCF-12A normiert. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle MCF-12A sind mit den zugehörigen p-Werten angegeben.

4.5.2 Stimulation mit rMIF erhöht die Proliferation besonders in Mamma-Karzinom-Zellen

Nachdem einige Arbeiten gezeigt haben, dass die Stimulation mit MIF einen pro-proliferativen Effekt in Tumorgewebe hervorruft, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von rMIF auf die Proliferation der Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zelllinien untersucht. Dabei wurden verschiedene MIF-Konzentrationen von 0 ng/ml bis 150 ng/ml verwendet [87, 165].

Die Abb. 29 zeigt, dass MIF eine signifikante pro-proliferative Wirkung in allen drei Mamma-Zelllinien besitzt, diese jedoch bei den invasiven MDA-MB-231-Zellen deutlich ausgeprägter war. Obwohl diese Zellen ohne hin schon die höchste Proliferationsrate ohne Stimulus aufwiesen, ließen sie sich am sensibelsten durch rMIF beeinflussen. Zudem erkennt man insgesamt eine deutliche Abhängigkeit der Proliferation von der verwendeten rMIF-Konzentration. So zeigten sich physiologische Konzentrationen von 10 ng/ml als sehr viel effektiver als beispielsweise 150 ng/ml. Jedoch muss festgehalten werden, dass die gesunden MCF-12A-Zellen bei hohen MIF-Konzentrationen keine Veränderungen in ihrer Proliferation im Vergleich zur Kontrolle zeigten, während die beiden Tumorzelllinien weiterhin durch das rMIF stimulierend beeinflusst werden konnten.

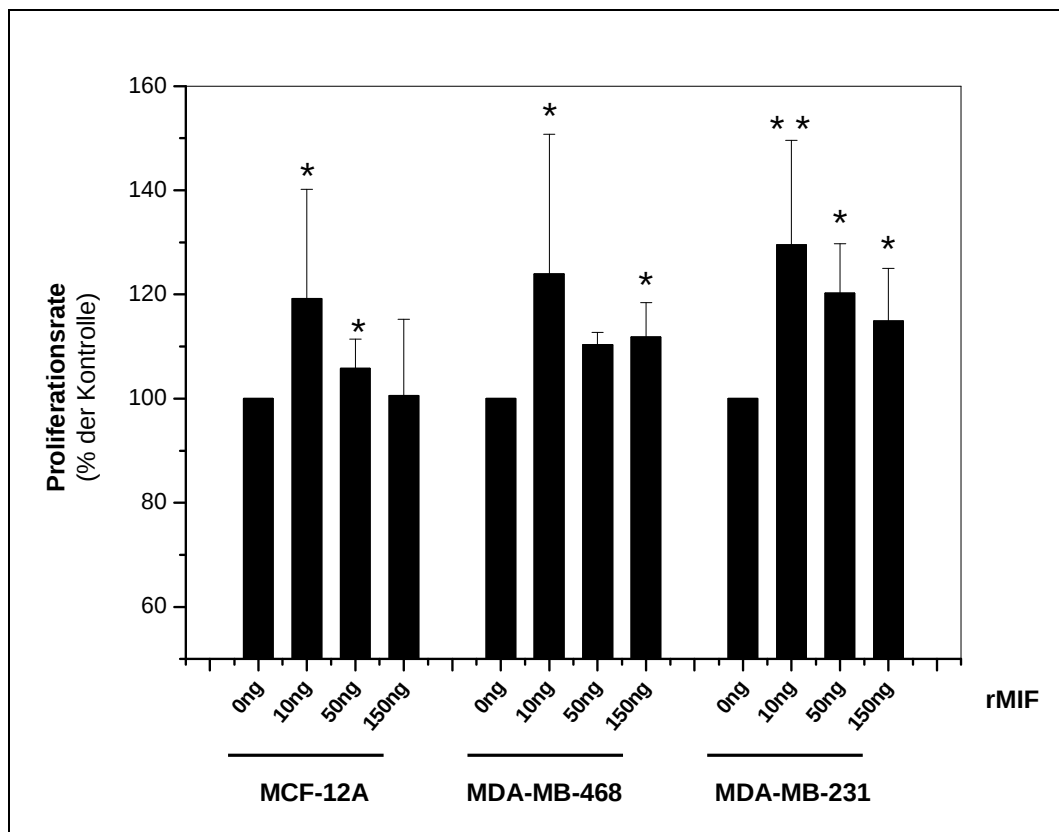


Abb. 29: Exogen-zugegebenes, rekombinantes MIF stimuliert die Proliferation von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen rMIF für 24 h inkubiert und die Proliferationsrate mit Hilfe des BrdU-Proliferationsassays bestimmt. Die Messwerte wurden jeweils in Triplikatur bestimmt und auf die jeweilige Kontrolle, die mit äquivalenten Mengen Dialysepuffer behandelt worden war, normiert. Alle drei verwendeten Zelllinien proliferieren am effektivsten bei physiologischen MIF-Konzentrationen von 10 ng/ml. Die deutlichste Zunahme der Proliferationsrate ergibt sich bei den invasiven MDA-MB-231-Zellen, gefolgt von den nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen. Die nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen zeigen geringere Proliferationssteigerungen. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle sind für $p < 0,05$ mit einem Stern und für $p < 0,01$ mit zwei Sternen gekennzeichnet. Folgende p-Werte zeigten signifikante Ergebnisse: MCF-12A: $p_{10\text{ng}}=0,049$; $p_{50\text{ng}}=0,028$; MDA-MB-468: $p_{10\text{ng}}=0,035$; $p_{150\text{ng}}=0,039$; MDA-MB-231: $p_{10\text{ng}}=0,0064$; $p_{50\text{ng}}=0,047$; $p_{150\text{ng}}=0,045$.

Im Bereich der Mamma-Karzinome kann somit ebenfalls bestätigt werden, dass MIF die Proliferation fördert und vor allem die invasive Tumorzelllinie, wie auch in Meyer-Siegler *et al.* beschrieben, sehr viel sensibler reagiert [48].

4.5.3 Anti-MIF und Anti-CD74 hemmen die Proliferation der Tumorzellen

Als Therapieansatz wäre eine Behandlung mit einem Anti-MIF- oder Anti-CD74-Antikörper geeignet, wenn die Mamma-Karzinomzellen mit einer deutlichen Proliferationsminderung reagieren würden, während normales Epithelgewebe unbeeinflusst bliebe.

Zu diesem Zweck wurden Zellen mit den beiden genannten Antikörpern behandelt und für 72 h bei 37 °C belassen, nach deren Ablauf ein Proliferationsassay weitere Informationen bringen sollte.

Die Ergebnisse waren sehr viel versprechend (Abb. 30). MCF-12A-Zellen wurden durch Antikörper-Gabe in ihrer Vermehrung nicht beeinflusst, während die beiden Tumorzelllinien deutlich in ihrer Proliferation gehemmt werden konnten. Dabei lag die verbleibende Proliferationsrate bei nur in etwa 35 % bis 40 % der jeweilig unbehandelten Kontrolle.

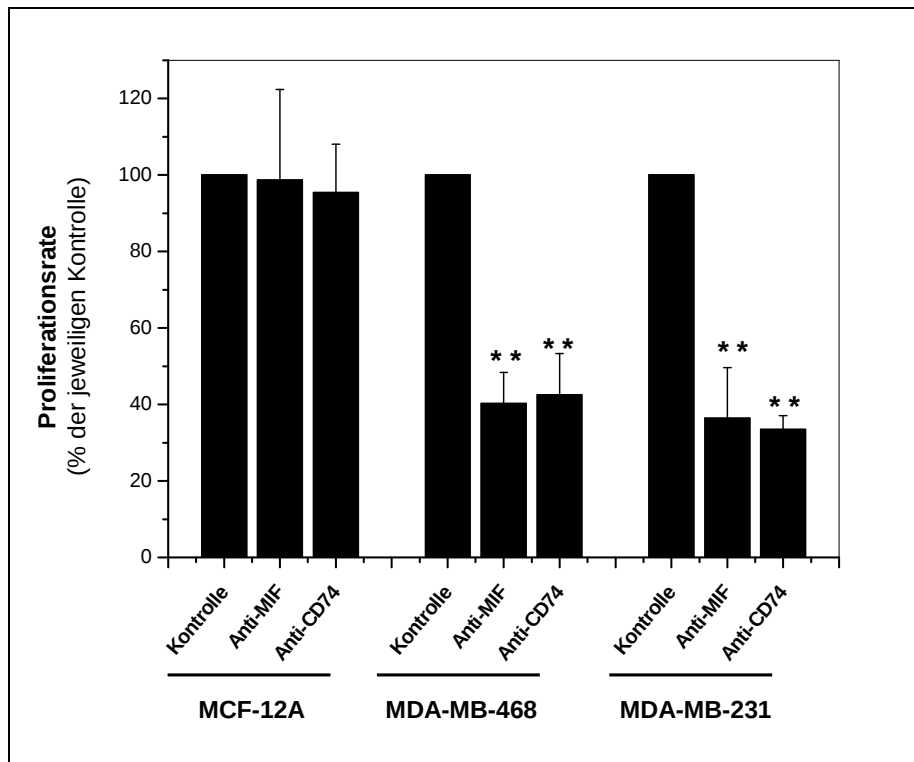


Abb. 30: Die Karzinom-Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-231 werden durch Anti-MIF- und Anti-CD-74-Antikörper in ihrer Proliferation stark gehemmt. Die Zellen wurden mit Anti-MIF- bzw. Anti-CD-74-Antikörper für 48 h inkubiert und die Proliferationsrate mit Hilfe des BrdU-Assays bestimmt. Die Kontrolle wurde mit äquivalenten Mengen PBS behandelt. Während die nicht-tumorösen MCF-12A-Zellen durch die beiden Antikörper in ihrer Proliferation nicht beeinflusst werden, kann die Proliferationsrate der beiden Karzinomzelllinien deutlich gesenkt werden. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle mit $p < 0,01$ sind mit zwei Sternen gekennzeichnet. Folgende p-Werte konnten bestimmt werden: MDA-MB-468: $p_{\text{Anti-MIF}} = 0,00047$; $p_{\text{Anti-CD74}} = 0,000038$; MDA-MB-231: $p_{\text{Anti-MIF}} = 0,000000098$; $p_{\text{Anti-CD74}} = 0,0000000012$.

4.5.4 CD74 ist für die stimulierende MIF-Wirkung verantwortlich

Im vorigen Kapitel wurde deutlich die proliferationshemmende Wirkung von Anti-MIF- und Anti-CD74-Antikörpern gezeigt. Jedoch kann nur mit Hilfe dieser Ergebnisse nicht sicher ausgesagt werden, dass die Inhibition des CD74-Rezeptors ausschließlich die MIF-Wirkung blockiert und nicht einen davon unabhängigen Prozess.

Aus diesem Grund sollte nun unter Gabe von rMIF die Wirkung des CD74-Antikörpers überprüft werden und in einem zusätzlichen Ansatz auch der Einfluss des CXCR4-Rezeptors

auf den durch MIF hervorgerufenen Proliferationseffekt. Als Zelllinie wurden die invasiven MDA-MB-231-Zellen verwendet, die am effektivsten auf Stimulation mit rMIF reagieren.

Abb. 31 zeigt wiederum die pro-proliferative Wirkung von rekombinantem MIF und die inhibierende Wirkung der beiden Antikörper, Anti-MIF und Anti-CD74. Stimulierte man die Zellen unter Gabe der beiden Antikörper zusätzlich mit rMIF (150 ng/ml), so kam es zu keiner Proliferationserhöhung. Somit kann eindeutig geschlossen werden, dass die MIF-Wirkung auf einem CD74-abhängigem Signalweg beruht.

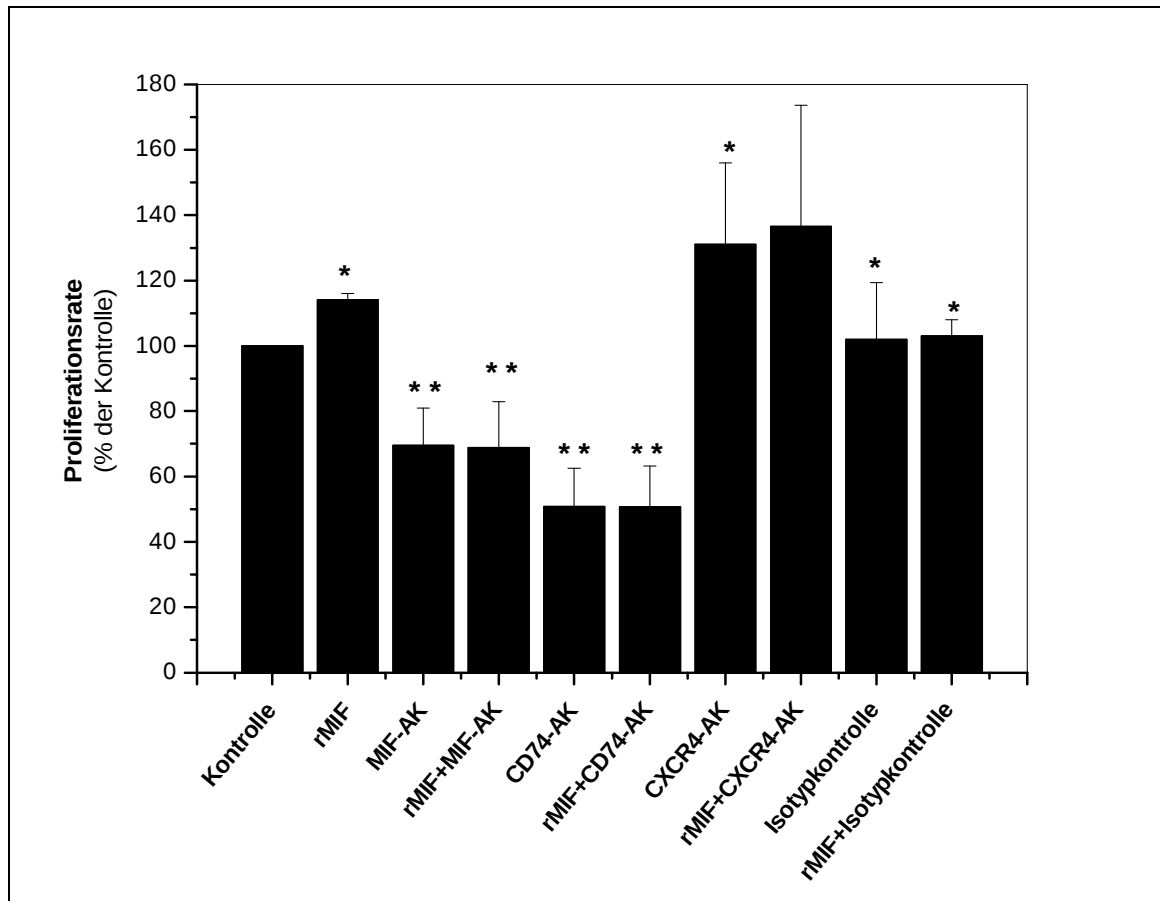


Abb. 31: MDA-MB-231-Zellen werden in ihrer Proliferation durch Anti-MIF- und Anti-CD-74-Antikörper gehemmt, während Anti-CXCR4-Antikörper keinen Einfluss haben. Die invasiven MDA-MB-231-Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern für 24 h inkubiert und die Proliferation mit Hilfe des BrdU-Assays bestimmt. Die Isotypenkontrolle IgG_{2A} hat keinen Einfluss auf die Proliferation, ebenso zeigt auch die Behandlung mit CXCR4-Antikörpern keinen hemmenden Einfluss. Anti-MIF- und Anti-CD-74-Antikörper hemmen die Proliferation deutlich und eine gleichzeitige Stimulation mit rMIF bringt keine Steigerung der Proliferation. Die einzelnen Werte wurden jeweils auf die mit PBS behandelte Kontrolle bezogen. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Vierfachbestimmungen. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind für $p_{\text{rMIF}} < 0,05$ mit einem Stern und für $p < 0,01$ mit zwei Sternen gekennzeichnet. Es ergaben sich folgende p-Werte: $p_{\text{rMIF}} = 0,05$; $p_{\text{MIF-AK}} = 0,0012$; $p_{\text{rMIF+MIF-AK}} = 0,0029$; $p_{\text{CD74-AK}} = 0,00015$; $p_{\text{rMIF+CD74-AK}} = 0,00019$; $p_{\text{CXCR4-AK}} = 0,028$; $p_{\text{rMIF+CXCR4-AK}} = 0,060$; $p_{\text{Isotypenkontrolle}} = 0,05$; $p_{\text{rMIF+Isotypenkontrolle}} = 0,038$.

Die Gabe von CXCR4-Antikörpern führte nicht zu einer inhibierenden Proliferationswirkung, sondern eher war ein leicht inverses Verhalten zu beobachten. Zusätzliche MIF-Stimulation bewirkte die schon bekannte Stimulation der Zellvermehrung. Somit ist in der invasiven MDA-MB-231-Zelllinie ein MIF-Effekt über CXCR4 im Bereich der Proliferation vermutlich

auszuschließen, wobei die AMD-Expression und weitere Einflussfaktoren noch nicht untersucht wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Bereich der Mamma-Tumoren eine Therapie mit Anti-MIF- und Anti-CD74-Antikörpern möglich wäre, da diese die proliferationsstimulierende MIF-Wirkung hemmen und in gleichem Maße das gesunde Brustepithel-Gewebe nicht beeinflussen.

4.6 Erhöhte Invasion von Mamma-Karzinom-Zellen bei Verwendung von rMIF als Chemoattraktant

Die Aggressivität eines Tumors wird meist durch seine Invasionsfähigkeit charakterisiert. Der Durchbruch der Basalmembran ist in der klinischen Diagnostik in vielen Bereichen der Übergang vom gutartigen oder semi-malignen Tumor zum malignen Karzinomgewebe, das in extrazelluläres Stromagewebe einwächst und in kürzester Zeit Blutgefäße erreicht. Mit diesem Schritt beginnen sehr oft Metastasierungsprozesse im gesamten Körper [95].

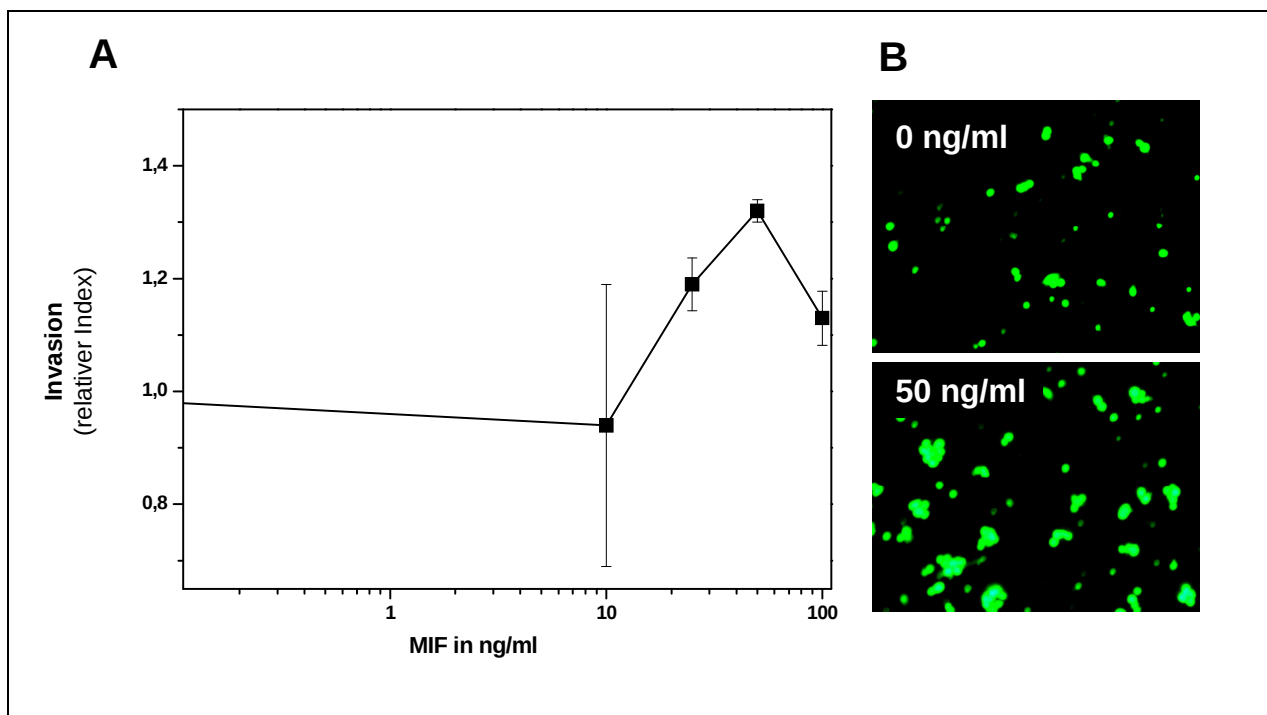


Abb. 32: Stimulation mit rMIF führt zu einer Steigerung der Invasionsrate von invasiven MDA-MB-231-Zellen. Die Zellen wurden in Matrigel-beschichteten Transwell-Inserts ausgesät und die untere Kammer mit Medium und MIF als Chemoattraktant in verschiedenen Konzentrationen befüllt. Die Invasionszeit betrug 72 h, nach denen die Zellen Calcein-gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden konnten. Zusätzlich wurden die Zellen darauf folgend mit Trypsin von der Unterseite der Transwell-Membran abgelöst und die Fluoreszenzintensität im ELISA-Reader bestimmt. (a) Quantitative Auswertung der Invasion von MDA-MB-231-Zellen unter MIF-Einfluss. Die effektivste MIF-Konzentration liegt bei 50 ng/ml. Der Graph zeigt Mittelwerte $\pm$ SEM aus fünf unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils beide Auswertungsmethoden angewendet wurden. Die Messwerte wurden jeweils auf die Kontrolle normiert. Signifikante Unterschiede zur mit Dialysepuffer behandelten Kontrolle sind für $p < 0,05$ mit einem Stern und für $p < 0,01$ mit zwei Sternen gekennzeichnet. Es ergaben sich folgende Signifikanz anzeigende p-Werte: $p_{25\text{ng/ml}} = 0,019$; $p_{50\text{ng/ml}} = 0,0014$; $p_{100\text{ng/ml}} = 0,044$. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei einer zehnfachen Vergrößerung bei Stimulation mit 0 ng/ml MIF und 50 ng/ml MIF. Es zeigt sich eine erhöhte Invasion und eine vermehrte Haufenbildung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun weiter untersucht, ob die Gabe von rMIF zu einer signifikanten Steigerung der Invasionsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen führt. Als Ersatz der physiologischen Basalmembran wurde eine dicke Matrigelbeschichtung der Transwell-Inserts (8 µm-Poren) vorgenommen. Die Invasionszeit betrug 72 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die durchgewanderten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und die Ergebnisse mit Fluoreszenzmessungen am ELISA-Reader verglichen.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Zunahme der Invasion unter Gabe von rMIF um bis zu 35 %, wobei sich eine typische *bell-shaped* Kurve ergab (Abb. 32). Bei einer MIF-Konzentration von 50 ng/ml liegt der effektivste Stimulationswert der MDA-MB-231-Zellen bei der Invasion. Somit kann vermutet werden, dass MIF die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen bewirkt und somit der Durchbruch der Basalmembran schneller ablaufen kann. Sobald der Tumor diese Barriere durchbrochen hat, kann er sich im umgebenden Stroma fast ungehindert ausbreiten. Auf den Fluoreszenzmikroskopbildern war auffällig, dass sich bei höheren MIF-Konzentrationen vermehrt Zellhaufen bildeten.

4.7 MIF in Maus-Makrophagen-Überständen beeinflusst die Aktivität von Mamma-Karzinom-Zellen

Balkwill *et al.* haben sich in den letzten Jahren ausgiebig mit Co-Kulturversuchen von Makrophagen und Mamma-Karzinom-Zellen befasst und wichtige Wechselwirkungen zwischen den beiden Zelltypen vor allem in Bezug auf die Invasivität beobachten können [137, 166]. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen eine gesteigerte TNF- α -Sekretion der Makrophagen bewirken, durch die Matrix-Metalloproteinasen in erhöhtem Maße exprimiert werden. Diese fördern wiederum das Invasionsvermögen. In Co-Kultur kommt es zu einer erhöhten Aktivierung der JNK und des NF- κ B-Signalweges in Tumorzellen, jedoch nicht in gesundem Epithelgewebe [137]. Interessant wäre nun zu sehen, ob Makrophagen auch über MIF-Sekretion mit Tumorzellen speziell in Mamma-Karzinomen wechselwirken können.

Da im Rahmen dieser Arbeit Co-Kulturversuche zu umfangreich gewesen wären, wurde die Situation der Wechselwirkung zwischen Mamma-Karzinom-Zellen und Makrophagen simuliert. Aus dem Peritoneum von Mäusen wurden Makrophagen isoliert und unter TNF- α bzw. IL-6-Stimulation kultiviert. Die Stimulationsdauer war mit 30 min relativ kurz, doch zu einem späteren Zeitpunkt wäre ein Mediumwechsel nicht mehr effektiv gewesen. Die Überstände sollten stimulantienfrei sein, jedoch sollte trotzdem die Phase der gesteigerten MIF-Sekretion abgepasst werden. Diese Überstände wurden im weiteren Verlauf auf ihre MIF-Konzentration hin untersucht und in Adhäsionsassays mit MDA-MB-468-Zellen eingesetzt. Als Kontrolle dienten in allen Fällen Makrophagen-Überstände von MIF-*knockout*-Maus-Makrophagen, die in gleicher Weise stimuliert worden waren.

4.7.1 Charakterisierung der Maus-Makrophagen-Überstände in Bezug auf ihre MIF-Konzentration

Die verwendeten Mäuse waren vor Versuchsbeginn durch drei identische PCR-Ansätze als eindeutig MIF-*knockout* bzw MIF-Wildtyp genotypisiert worden. Zur Sicherheit wurden jedoch die Makrophagen-Lysate nach Überstandsabnahme im Western Blot noch einmal auf ihren MIF-Gehalt untersucht.

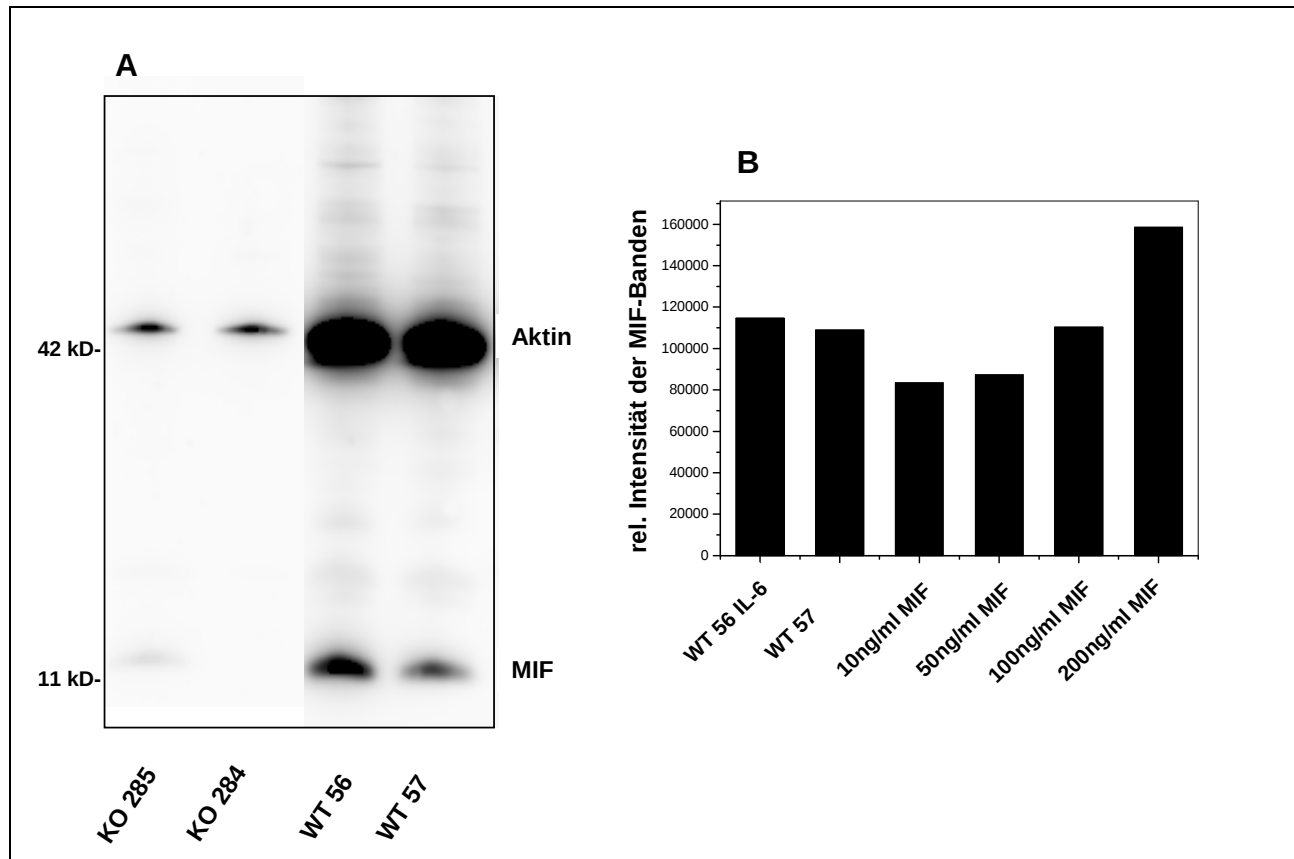


Abb. 33: Analyse des MIF-Gehaltes in Maus-Makrophagen-Lysaten (a) Western-Blot-Analyse der Maus-Makrophagen-Lysate. Es wurden jeweils 15 µl Probe in der SDS-Page aufgetragen und die Blot-Membran mit Anti-MIF-Antikörpern behandelt. Als Kontrolle zur Normierung wurde ebenfalls die Aktin-Konzentration bestimmt. Die beiden Wildtyp-Maus-Makrophagen zeigen deutliche MIF-Banden, während die KO-284-Maus-Makrophagen kein MIF aufweisen. Die KO-285-Mäuse scheinen zumindest eine geringere MIF-Expression zu haben. Es handelt sich um repräsentative Banden aus zwei unabhängigen Experimenten. (b) Semiquantitative Bestimmung des MIF-Gehaltes in den beiden WT-Maus-Makrophagen. Im Western Blot wurden sowohl bekannte MIF-Konzentrationen als auch die beiden Proben aufgetragen und die MIF-Konzentration im Vergleich zum MIF-Standard abgeschätzt. Es handelt sich um ein einzelnes Experiment.

Das Bandenmuster zeigte, dass die beiden Wildtyp-Mäuse für das MIF-Gen homozygot sein mussten, während eine der beiden Kontroll-*knockout*-Mäuse nach Auftragung der Makrophagenlysate eine MIF-Bande zeigte (Abb. 33). Diese war deutlich schwächer als bei den Wildtyp-Mäusen, sodass man annehmen musste, dass es sich um eine heterozygote Maus

handelt. Somit scheint die PCR nicht immer ein geeignetes Verfahren zur Genotypisierung von MIF-Mäusen zu sein.

Im weiteren Verlauf wurden also nur Überstände der *knockout*-Maus mit der Kenn-Nummer 284 verwendet, die zweifelsfrei KO war. Weitere Nachforschungen haben im Nachhinein jedoch gezeigt, dass Änderungen im PCR-Protokoll zu eindeutigen Genotypisierungen führen, die damals noch nicht beachtet worden waren.

Um die MIF-Konzentration in den Überständen abschätzen zu können, wurden die Makrophagen-Lysate in Kombination mit einem MIF-Standard im Western Blot aufgetragen. Dabei zeigten sich MIF-Konzentrationen von 100 ng bis 120 ng MIF in 1 ml Überstand.

4.7.2 MIF in Maus-Makrophagen-Überständen fördert die Adhäsion von Mamma-Karzinom-Zellen

Da MDA-MB-468-Zellen durch rMIF-Stimulation in ihrem Adhäsionsverhalten gut beeinflusst werden konnten, sollten diese Zellen nun mit den Maus-Makrophagen-Überständen als Co-Kultur-Ersatz inkubiert werden. Es wurde sowohl eine Kontrolle nur mit Medium behandelt als auch die eigentliche Negativkontrolle mit Überständen der MIF-*knockout*-Maus.

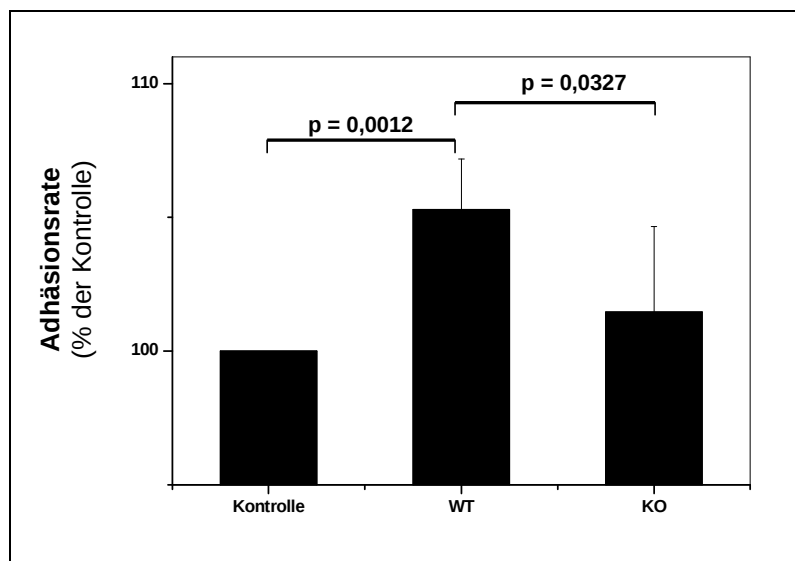


Abb. 34: MIF in Überständen von Maus-Makrophagen steigert die Adhäsionsrate von MDA-MB-468-Zellen.

Die Überstände der mit IL6-stimulierten Maus-Makrophagen wurden nach Aussaat der Zellen zur Adhäsion hinzu gegeben. Als Kontrolle diente 0,5 %-FCS-Medium ohne Überstand und als zweite Kontrolle wurden die Überstände von MIF-KO-Maus-Makrophagen hinzu gegeben. Die Adhäsion nimmt mit Stimulation durch WT-Maus-Makrophagen-Überstände zu, während die beiden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede zeigen. Die Messwerte wurden jeweils auf die Kontrolle mit 0,5 %-FCS-Medium normiert. Es handelt sich um Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM mit jeweils Bestimmungen in Duplikatur. Der signifikante Unterschied ist mit zugehörigem p-Wert angegeben. Der Unterschied zwischen der Adhäsion von Zellen mit KO-Überstand im Vergleich zur Kontrolle ist nicht signifikant mit $p=0,351$.

Die Ergebnisse in Abb. 34 zeigen zum einen, dass auch endogenes MIF die Adhäsion stimuliert und zum anderen, dass Makrophagen mit Karzinom-Zellen interagieren können und MIF dabei eine große Rolle spielen könnte. Während die Adhäsion mit Überständen der WT-Maus-Makrophagen signifikant zunahm, blieb die Anhaftung mit KO-Maus-Überständen im Bereich der Kontrolle zurück.

Somit kann festgehalten werden, dass Makrophagen und Mamma-Karzinom-Zellen in Co-Kultur wechselwirken und die MIF-Sekretion von Makrophagen zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion führen kann. Pilotversuche zur unterschiedlichen Proliferation durch Maus-Makrophagen-Überstände ergaben keine eindeutigen Ergebnisse.

Insgesamt kann jedoch bestätigt werden, dass Makrophagen und Tumorzellen interagieren und somit bei der Tumorentstehung auch das umliegende Stroma mit seinen Immunzellen nicht außer Acht gelassen werden sollte.

4.8 Die Konzentration von MIF in Karzinom-Biopsien korreliert mit klinisch-pathologischen Daten

Schon seit einigen Jahren wird versucht, eine Korrelation zwischen der MIF-Konzentration im Tumorgewebe und weiteren klinisch-pathologischen Faktoren zu finden. Bando *et al.* untersuchten die MIF-Expression in Mamma-Karzinomen, beschäftigten sich dabei aber vor allem mit primären Tumoren [167]. Sie erkannten eine negative Korrelation des Lymphknotenstatus mit dem MIF-Gehalt im Tumorgewebe, konnten jedoch die MIF-Lokalisation nicht nur in Tumorzellen selbst, sondern auch im umgebenden Stromagewebe vorfinden. Weitere klinisch-pathologische Faktoren konnten in dieser Studie nicht sinnvoll mit der MIF-Konzentration korreliert werden.

Im Rahmen meiner Arbeit wurden 50 Mamma-Karzinom-Biopsate auf ihre huMIF-Konzentration hin untersucht, wobei die Tumoren einen verschiedenen Lymphknotenstatus und verschiedene Hormon-Rezeptor-Level aufwiesen. Die gewonnenen Daten konnten mit weiteren Laborwerten aus der klinischen Routinediagnostik und der pathologischen Forschung korreliert werden.

Abb. 35 zeigt die mit Hilfe des hu-MIF-ELISA bestimmten MIF-Konzentrationen der verwendeten Proben in aufsteigender Reihenfolge sortiert. Es konnten deutliche Unterschiede im MIF-Gehalt festgestellt werden, wobei die Werte zwischen 0,1 µg und 1,12 µg MIF pro mg Gesamtprotein liegen.

Im Folgenden sollen nun die bestimmten MIF-Konzentrationen vor allem mit Parametern korreliert werden, mit deren Hilfe wichtige Aussagen über die Prognose eines Tumorleidens gemacht werden können.

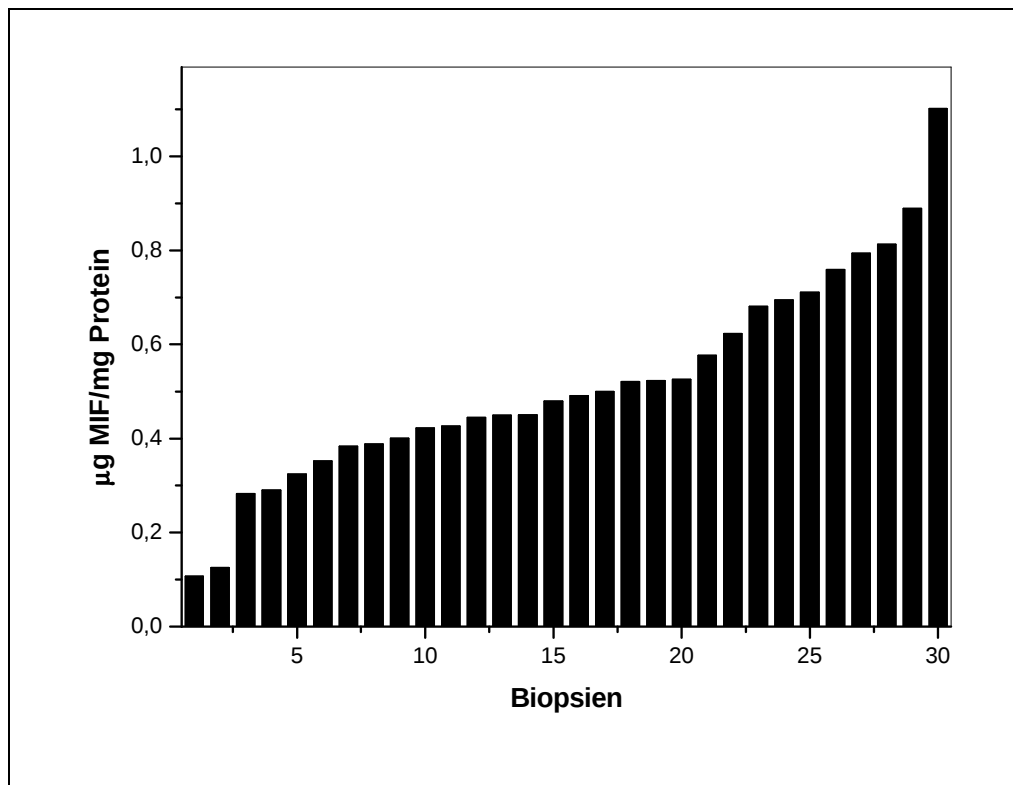


Abb. 35: MIF-Gehalt in Mamma-Karzinom-Biopsien. Die MIF-Konzentrationen in 30 repräsentativen Biopsaten wurden mit Hilfe des huMIF-ELISA jeweils in Duplikatur in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es zeigte sich ein breites Spektrum des MIF-Gehaltes in Bezug auf die jeweilige Gesamtprotein-konzentration. Die Mittelwerte $\pm$ SEM sind angegeben.

4.8.1 Korrelation von MIF mit dem HER2-Rezeptor-Level

Der HER2-Rezeptor-Status ist ein bedeutender prognostischer Faktor im Bereich von Mamma-Tumoren, der heute in der klinischen Diagnostik verwendet wird [105]. 20 % bis 30 % der Brust-Karzinome weisen eine HER2-Überexpression auf und sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Malignität [168, 169]. In der Tumorthherapie werden heute schon spezielle Antikörper (Trastuzumab) gegen den EGF-Rezeptor eingesetzt, die gute Therapieerfolge auch besonders bei primären, malignen Tumoren erreichen konnten [170].

In der Literatur gibt es jedoch noch keine Informationen über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem HER2-Rezeptor-Status von Mamma-Tumoren und der MIF-Konzentration im betroffenen Gewebe, sodass im Rahmen dieser Arbeit versucht werden sollte, eine mögliche Korrelation zu erkennen.

Die Ergebnisse schwankten recht stark, jedoch schien die MIF-Konzentration mit Zunahme des HER2-Rezeptor-Status tendenziell im Vergleich zum Status 0 abzunehmen (Abb. 36). Diese inverse Korrelation würde Experimente an Mamma-Zelllinien bestätigen, bei denen festgestellt werden konnte, dass invasive, hoch-maligne Tumoren eine erniedrigte MIF-Konzentration haben. Ebenso würde die Arbeit von Bando *et al.* untermauert, in der eine

negative Korrelation von Lymphknotenstatus und MIF-Gehalt des Tumorgewebes publiziert wurde [167]. Je invasiver ein Tumor ist, umso mehr Lymphknoten sind zumeist betroffen, umso niedriger scheint das MIF-Level zu sein. Der HER2-Rezeptor korreliert somit offenbar ebenfalls invers mit dem MIF-Gehalt der Mamma-Biopsien.

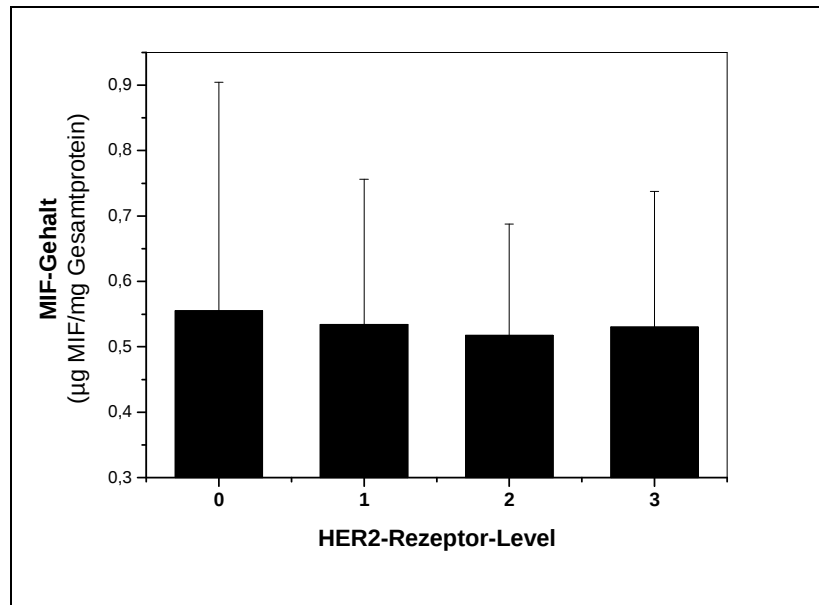


Abb. 36: Der HER2-Rezeptor-Status scheint geringfügig mit dem MIF-Gehalt in Mamma-Karzinom-Biopsien zu korrelieren. Es wurden 30 verschiedene Mamma-Karzinom-Biopsien mit Hilfe des huMIF-ELISA auf ihren MIF-Gehalt untersucht und die Ergebnisse mit dem HER2-Rezeptor-Level aufgetragen. Je stärker die HER2-Expression ist, umso geringer wird die MIF-Konzentration. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Bestimmungen in Duplikatur. (HER2-Rezeptor-Level: 0 = keine Reaktion, keine HER2-Überexpression (Probenanzahl n=8); 1= schwache Reaktion, keine HER2-Überexpression (n=8); 2 = mäßig starke Reaktion, schwache Überexpression (n=7); 3 = starke Reaktion, starke Überexpression (n=7)). Die Ergebnisse waren alle nicht signifikant.

Zusammengefasst muss festgehalten werden, dass der Probenumfang gering war und nur erste Tendenzen abgeschätzt werden können.

4.8.2 Korrelation von MIF mit den Proteinen PA und PAI-1

Das uPA-System (*urinary plasminogen activator*) ist ein wichtiger Faktor bei der Tumordinvasion und Metastasenbildung [171, 172]. Es reguliert den Abbau der extrazellulären Matrix, die den Tumor umgibt und ermöglicht somit bei Überexpression eine schnelle Einwanderung und Ausbreitung von Karzinomzellen [173]. Am Beispiel der invasiven MDA-MB-231-Zellen wurde von Stillfried *et al.* gezeigt, dass eine uPA-Überexpression mit einem erhöhten invasivem Verhalten korreliert, was über ein verbessertes proteolytisches Potential erklärt werden kann [172].

Eine Überexpression des PAI-1-Protein (*plasminogen activator inhibitor 1*) steht ebenfalls in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose im Bereich der Mamma-Karzinom-Diagnostik

[174, 175]. Die metastasenfreie Überlebenszeit wird deutlich verkürzt, wobei ein naher Verwandter, das PAI-3-Protein, eine positive Prognose bestimmt [176].

Der zuvor bestimmte uPA- und PAI-1-Gehalt der Biopsien wurde im Rahmen dieser Arbeit mit den MIF-Konzentrationen der Gewebeproben korreliert. Dabei konnte beobachtet werden (Abb. 37), dass tendenziell eine inverse Korrelation vorlag, was die Hypothese bestätigen würde, dass Tumoren mit niedrigen MIF-Konzentrationen eine stärkere Invasionsfähigkeit zeigen. Eine ähnliche Korrelation zeigte auch der PAI-1-Gehalt, aufgetragen gegen die MIF-Konzentrationen. Da es sich jedoch auch hier wiederum nur um 30 Biopsien handelte, muss die Signifikanz zukünftig weiter untermauert werden.

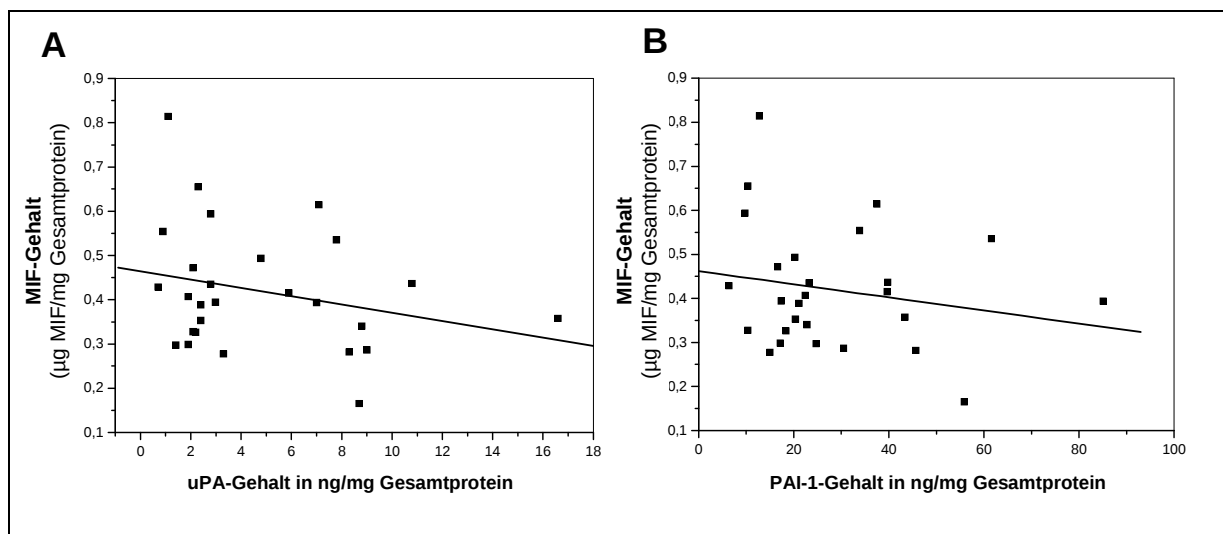


Abb. 37: Der MIF-Gehalt in Mamma-Karzinom-Biopsaten korreliert negativ mit dem uPA- und PAI-1-Gehalt. Die bereits zuvor mit Hilfe des huMIF-ELISA bestimmten MIF-Konzentrationen in den Mamma-Tumor-Biopsien wurden mit (a) dem uPA-Gehalt und (b) dem PAI-1-Gehalt der Gewebestücke korreliert. In beiden Fällen ergibt sich eine negative Korrelation. Den beiden Graphen liegen zwei unabhängige Messungen jeweils in Doppelbestimmung zugrunde, wobei die Mittelwerte aufgetragen wurden. Mit Hilfe statistischer Berechnungen ergaben sich die folgenden beiden Korrelationskoeffizienten nach Pearson: $r_{\text{uPA}} = -0,257$ mit $p = 0,194$ und $r_{\text{PAI-1}} = -0,195$ mit $p = 0,102$.

4.8.3 Korrelation von MIF mit dem Lymphknotenstatus

Bando *et al.* zeigten, dass die MIF-Konzentration in primären Mamma-Karzinomen invers mit dem Lymphknotenstatus korreliert [167]. Diese Aussage sollte anhand der vorliegenden 30 Proben überprüft werden, zu denen weitere 20 Proben aus früheren Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Bernhagen hinzugezogen wurden. Diese konnten jedoch leider nur für die Korrelation mit dem Lymphknotenstatus verwendet werden, da andere klinisch-pathologische Bestimmungen nicht vorlagen.

Die Ergebnisse bestätigten die inverse Korrelation von MIF-Gehalt und Lymphknotenstatus, wobei nur in der Klasse pN0 und pN1 ausreichend Proben zur Auswertung vorlagen (Abb. 38). Obwohl mit einer Anzahl von 50 Proben relativ wenige Biopsien untersucht wurden,

konnte mit Hilfe des Student's t-Test ein p-Wert von 0,071 zwischen pN0 und pN1 ermittelt werden.

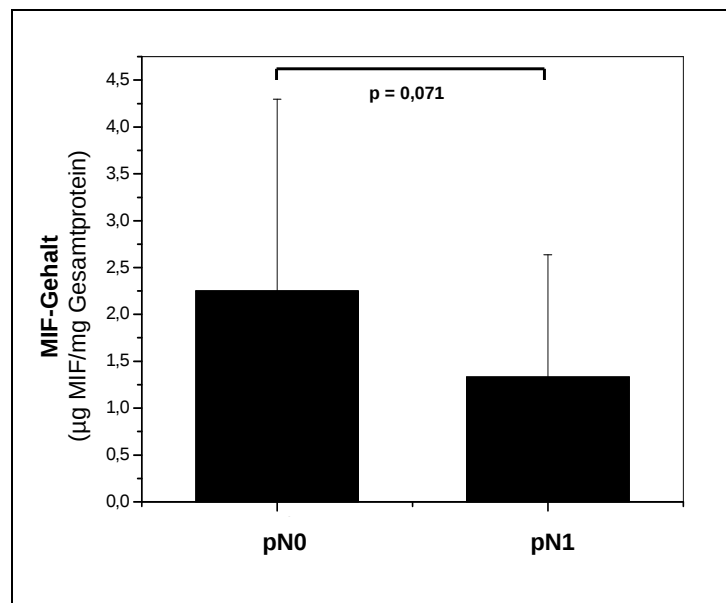


Abb. 38: Der MIF-Gehalt in Mamma-Karzinom-Biopsien nimmt mit Lymphknotenbefall im Stadium pN1 ab. Der zuvor bestimmte MIF-Gehalt wurde mit dem Lymphknotenstatus pN0 und pN1 korreliert. Der Messung lagen 50 Biopsien zugrunde, wobei jede MIF-Konzentration in zwei unabhängigen Experimenten jeweils in Duplikatur bestimmt wurde. Es kann eine Abnahme des MIF-Gehaltes bei zusätzlichem Lymphknotenbefall beobachtet werden. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM und den zugehörigen p-Wert zur Beschreibung der Signifikanz zwischen den beiden Tumorstadien.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der Mamma-Biopsien negative Korrelationen zwischen dem MIF-Gehalt der Gewebeproben und verschiedenen, prognostisch ungünstigen Faktoren aus der klinisch-pathologischen Routinediagnostik. Aufgrund des geringen Probenumfangs kann jedoch in vielen Bereichen nur von ersten Tendenzen gesprochen werden. Doch insgesamt erkennt man deutlich die wichtige Rolle von MIF im Bereich von Mamma-Karzinomen. Das Zytokin scheint in invasiven Tumoren deutlich geringer exprimiert zu werden und vermutlich einen *high-risk*-Faktor darzustellen. Diese Beobachtung passt auch zu den Charakterisierungen der Mamma-Karzinom-Zelllinien (Kap. 4.1.1), bei denen ebenfalls invasive, aggressive Zellen eine geringere MIF-Konzentration aufwiesen, während der MIF-Gehalt in nicht-invasiven Zelllinien deutlich erhöht war gegenüber den epithelialen Kontrollzellen.

5 Diskussion

5.1 Die MIF-Konzentration im Karzinomgewebe korreliert mit dem Tumorgrad

Schon im Jahre 1997 erkannten Bini *et al.* bei der Betrachtung von Protein-Expressions-Profilen in Tumorgewebe von Mastektomien, dass der Makrophagen-migrationsinhibierende-Faktor (MIF) sich in seinem Expressionsmuster signifikant von dem des gesunden Gewebes unterscheidet [177].

Ebenso wurde von Bando *et al.* eine MIF-Überexpression in Mamma-Karzinom-Biopsien gezeigt, wobei keine Differenzierung in Bezug auf die Invasionsrate durchgeführt wurde [167]. Auch konnten Lue *et al.* zeigen, dass die MIF-Konzentrationen in verschiedenen Mamma-Karzinom-Zelllinien differieren [53].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von Mamma-Zelllinien sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass der MIF-Gehalt in nicht-invasiven Tumorzellen (MDA-MB-468 und ZR-75-1) signifikant erhöht war gegenüber normalem Mamma-Epithelgewebe, während invasive Tumoren (MDA-MB-231 und SKBR3 (Daten nicht gezeigt)) eine niedrigere MIF-Konzentration aufwiesen. Somit konnten die Ergebnisse der zuvor genannten Arbeiten, die eine Überexpression in allen Mamma-Karzinomgeweben postulieren, nur teilweise bestätigt werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den verwendeten Gewebe-Biopsien um heterogenes Gewebe handelt, in dem Tumorzellen neben Stromazellen, Makrophagen und weiteren Zelltypen vorliegen. Trotz dieser Tatsache deckten sich die Beobachtungen der Mamma-Karzinom-Biopsien, bei denen der MIF-Gehalt invers mit dem Lymphknotenstatus korrelierte, sehr gut mit den Ergebnissen der vorausgegangenen Untersuchungen an den Mamma-Zelllinien. So wiesen Gewebeproben aus Tumoren des Status pN0 einen höheren MIF-Gehalt auf als solche, die in der prognostisch ungünstigeren pN1-Kategorie einklassifiziert wurden. Um diese Ergebnisse jedoch statistisch weiter absichern zu können, müsste eine größere Anzahl von Biopsien untersucht. Zusätzlich wäre es sicherlich sinnvoll, weitere klinische Daten der operierten Patientinnen zu erhalten, sodass möglicherweise auch Unterschiede in der Bestimmung der MIF-Konzentration abhängig von Alter, Zeit seit der Tumorerstdiagnose, Hormonrezeptorstatus und weiteren klinischen Daten gefunden werden könnten.

Zusätzlich sollten jedoch der PTEN-Status der verwendeten Zelllinien und der damit zusammenhängende Einfluss auf den PI3K-Weg nicht vernachlässigt werden. Während MCF-12A und MDA-MB-231-Zellen PTEN-positiv waren, zeigten die beiden nicht-invasiven Zelllinien wenig bis keine PTEN-Expression bzw. keine Synthese eines funktionsfähigen PTEN-Moleküls. Somit liegt in den MDA-MB-468- und den ZR-75-Zellen eine erhöhte Akt-

Aktivierung vor, da PTEN nicht als inhibierender Faktor wirken kann. Würde nun ein positiver Zusammenhang zwischen intrazellulärer MIF-Konzentration und der Akt-Aktivierung bestehen, so ließen sich die zuvor genannten Unterschiede erklären. Eine erhöhte MIF-Konzentration würde mit einer Erhöhung der p-Akt/Akt-Ratio korrelieren. Jedoch müssten die invasiven MDA-MB-231-Zellen nach dieser Theorie eine leicht erhöhte MIF-Expression gegenüber der gesunden Kontrollzelllinie aufweisen, da sie zwar PTEN-positiv sind, jedoch ein niedrigeres PTEN-Level aufweisen als die Mamma-Epithelzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es neben dem PI3K-Akt-Weg noch weitere Signaltransduktionswege geben muss, die den MIF-Gehalt von Mamma-Karzinom-Zellen bestimmen. Zusätzlich konnte anhand der durchgeführten Western Blot Analysen nicht geklärt werden, ob das gemessene MIF vollständig im Zytosol gespeichert vorliegt oder ob eventuell auch eine intranukleäre Lokalisation möglich wäre. Untersuchungen in diese Richtung könnten neue Informationen über die Bildungs- und Sekretionswege von MIF ergeben und somit seine Funktion im Tumorgeschehen unter Umständen vollständig erklären.

5.2 CD74 und CXCR4 als Signal-übermittelnde Oberflächenmoleküle

Nach dem heutigen Stand der Forschung wird CD74 als Oberflächenrezeptor für MIF betrachtet [46]. Ebenso werden CXCR4 und CD44 als wichtige Komponenten des CD74-Rezeptorkomplexes angenommen, die möglicherweise an der Signaltransduktion beteiligt sind [49].

Die Auswertungen der FACS-Analysen konnten die Hypothese bestätigen, dass CD74 als Oberflächenmolekül auf Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen exprimiert wird. Trotz mehrmaliger Versuchswiederholung konnte jedoch keine eindeutige Aussage über den quantitativen Unterschied in den CD74-Leveln gemacht werden. Diese Problematik lässt sich eventuell mit der ständig ablaufenden Internalisierung erklären, sodass die Zellen in den verschiedenen Experimenten zu unterschiedlichen Internalisierungszeitpunkten des Antikörper-CD74-Komplexes untersucht wurden.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte eindeutig eine markante CD74-Oberflächenexpression auf den invasiven MDA-MB-231-Zellen, bei denen die Negativkontrolle, wie in den anderen Zelllinien, nur eine sehr schwache Färbung aufwies. Zusätzlich konnten auf den meisten Aufnahmen fluoreszierende Ringmuster beschrieben werden, was zumindest für eine teilweise Lokalisation der markierten CD74-Moleküle auf der Oberfläche spricht. Die geringfügige intrazelluläre Färbung lässt sich unter Umständen durch internalisierte Rezeptor-Antikörper-Komplexe erklären.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist in der Literatur nicht bekannt, ob MDA-MB-231-Zellen auch MHC-II-positiver sind als andere Mamma-Karzinom- oder Mamma-Epithel-Zellen und welche neuen Funktionsmöglichkeiten damit verbunden sein könnten. Sicherlich wären Studien in diesem Bereich sehr interessant, auch gekoppelt mit der Aussage der Arbeit von Sheridan *et al.*, die besagt, dass CXCR4 eine negative Regulation der MHC-II-Genexpression bewirkt [178].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MDA-MB-231-Tumorzellen mit niedrigem MIF-Gehalt eine hohe CD74-Oberflächenexpression aufweisen, während diese bei MCF-12A- und MDA-MB-468-Zellen mit normalem und erhöhtem MIF-Gehalt deutlich niedriger liegt. Analog zu den Untersuchungen an Prostatazelllinien von Meyer-Siegler *et al.* kann jedoch postuliert werden, dass die invasiven, östrogenunabhängigen Zelllinien (MDA-MB-231) eine erhöhte CD74-Oberflächenexpression aufweisen [48]. Jedoch bliebe in diesem Zusammenhang die Frage offen, warum nicht-invasive, östrogenunabhängige Zellen (MDA-MB-468) nur geringe CD74-Konzentrationen aufweisen.

5.3 rMIF stimuliert die autokrine MIF-Sekretion

Viele Tumoren benötigen eine eigene Produktion von Wachstumsfaktoren, um ihr Überleben und die notwendige Zelldifferenzierung sichern zu können [179]. So wird auch extrazellulär vorliegendes MIF als pro-tumöröser Faktor angesehen [180, 181]. Zusätzlich ist bekannt, dass MIF in zytosolischer Form vorliegt und beispielsweise nach LPS-Stimulation sezerniert werden kann [10, 182]. Dabei läuft die Sekretion nicht über den klassischen Weg ab, sondern folgt einem Mechanismus über den ABC1-Transporter [182, 183]. In Makrophagen ist die MIF-Ausschüttung nach Stimulation bereits länger nachgewiesen und es ist bekannt, dass über diese Sekretionsprozesse Tumorzellen aktiviert werden können [39].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die MIF-Sekretion der verschiedenen Mamma-Karzinom-Zelllinien schon in unstimuliertem Zustand deutlich variiert. Alle Zellen sezernieren ständig ohne Stimulus MIF, jedoch ist die Konzentration in den Überständen von MDA-MB-468 und ZR-75-1-Zellen deutlich höher als in den nicht-tumörösen MCF-12A-Überständen. Die MDA-MB-231-Zellen zeigen keine signifikante Abweichung ihres Sekretionsverhaltens von der gesunden Epithelzelllinie. In invasiven Mamma-Karzinomen liegt also weniger MIF gespeichert vor und scheinbar wird es in geringeren Konzentrationen als von den nicht-invasiven Tumoren sezerniert.

Nach Stimulation mit rekombinantem MIF zeigte sich überraschenderweise eine starke Hochregulation der MIF-Sekretion in allen Zelllinien. Somit kann festgehalten werden, dass exogenes MIF zu einer Sekretion von MIF aus der Zelle führt, es somit zu einer Verstärkungsschleife im Rahmen des autokrinen *loop* kommt.

Vergleicht man nun die MIF-Sekretion in unstimuliertem und stimuliertem Zustand, so sind besonders die invasiven MDA-MB-231-Zellen in der Lage, eine enorme Hochregulation zu erreichen. Die absoluten MIF-Level in den Überständen sind immer noch geringer als die der nicht-invasiven Zelllinien, jedoch scheint der Hochregulationsfaktor von größerer Bedeutung zu sein. Es könnte vermutet werden, dass sich aus einer schnellen Hochregulation auch schnellere Anpassungsmöglichkeiten ergeben, die dem Tumor bei der Invasion bzw. der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen helfen können. Durch die erhöhte CD74-Oberflächen-Expression wäre zusätzlich eine sensiblere, genauere und unter Umständen auch schnellere Reaktion auf sezerniertes MIF möglich.

5.4 MIF fördert die Zelladhäsion

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich die Verwendung von Matrigel als Ersatz für die physiologischen Basalmembran als sehr geeignet erwiesen, wobei nicht geklärt werden konnte, ob die Membran nur einen initialen Reiz hervorruft, oder ob sie während der gesamten Adhäsionszeit eine wichtige Komponente darstellt [144]. Jedoch muss beachtet werden, dass dieses Protein-Gemisch nicht alle Komponenten der physiologischen Extrazellulär-Matrix enthält; so fehlt beispielsweise Fibronectin, welches bei der Zell-Adhäsion ebenfalls eine große Rolle zu spielen scheint [184].

Die Versuche zur Adhäsion von Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen haben gezeigt, dass die Gabe von rekombinantem MIF die Anhaftung aller Zelltypen signifikant steigert. Während die nicht-tumöröse und die invasive Zelllinie in gleichem Maße beeinflusst wurden, führte die Stimulation bei den MDA-MB-468-Zellen zu einer deutlich gesteigerten Adhäsion. Somit scheinen diese Zellen einerseits besser auf zusätzliches MIF reagieren zu können, jedoch andererseits ihre Adhäsionsfähigkeit in unstimuliertem Zustand nicht vollkommen durch MIF-Sekretion auszuschöpfen. Es könnte vermutet werden, dass die invasiven MDA-MB-231-Zellen mit einer starken Hochregulation der eigenen MIF-Sekretion schon ideal an die Umgebung angepasst sind und somit exogenes, zusätzliches MIF keinen allzu großen Effekt mehr hervorrufen kann. Aufgrund der stärkeren Oberflächenexpression von CD74 wäre somit eine schnellere und gezieltere Reaktion auf autokrin sezerniertes MIF möglich und somit eine darauf folgende stärkere Adhäsion. Zusätzlich könnte es zu einer schnelleren Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen beitragen, die die erhöhte Invasionsfähigkeit erklären würde [185]. Pilotversuche haben außerdem gezeigt, dass die Matrix selber schon einen Stimulus zur MIF-Sekretion darstellt (Ergebnisse nicht gezeigt), sodass in Zukunft auch die beim Tumor unter Umständen veränderten physiologischen Bedingungen genauer betrachtet werden müssten.

Bei der Untersuchung der Adhäsion unter Gabe von Anti-MIF- und Anti-CD74-Antikörpern zeigte sich eine stärkere Hemmung der Zellanhaftung bei Blockade von MIF als bei einer Rezeptorblockierung. Würde sich dieses Ergebnis auch weiterhin bestätigen, so könnte man davon ausgehen, dass die MIF-vermittelte Adhäsion nicht ausschließlich über den CD74-Signalweg abläuft. Da jedoch die Wirkung des CD74-Antikörpers in verschiedenen Experimenten erst in höheren Konzentrationen den erwarteten Effekten entsprach, könnte auch der MIF-Antikörper effektiver blockieren. Somit wäre der gesamte Signalweg ausgeschaltet, während unter Anti-CD74-Gabe nur ein Teil der Rezeptoren gehemmt wird und MIF in geringem Maße weiterhin die Adhäsion aktivieren kann. Erste Pilotversuche mit Anti-CXCR4- und Anti-CXCR2-Antikörpern ergaben keine signifikante Adhäsionshemmung (Daten nicht gezeigt).

Der genaue Signalweg der Adhäsion von Tumorzellen konnte noch nicht geklärt werden, jedoch scheinen sich MDA-MB-231-Zellen Akt-unabhängig an der Matrigel-Matrix festhaften zu können, was bis jetzt nicht in der Literatur beschrieben wurde. Eine Blockade des PI3K-Weges über LY294002 erbrachte keine Änderung der Adhäsionsfähigkeit, jedoch reagierten die Zellen weiterhin auf die Gabe von rMIF. Somit muss postuliert werden, dass MIF in Tumorzellen auch über einen alternativen Weg wirken kann, der ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf die Adhäsion ausübt. Die nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen reagieren sogar unter Inhibition des PI3K-Akt-Weges stärker auf die Gabe von rMIF im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle, sodass ebenfalls, zumindest teilweise, der Ablauf der Adhäsion über einen alternativen Weg, möglicherweise über ERK1/2, angenommen werden kann. Von Mitchell *et al.* war bereits beschrieben worden, dass durch Zelladhäsion sezerniertes MIF den MAPK-ERK-Signalweg aktiviert, sodass auch ein zusätzlicher Einfluss auf die weitere Zellanhaftung denkbar wäre [164]. Möglich wäre jedoch auch eine Hemmung dieses alternativen Weges unter physiologischen Bedingungen und besonders in Tumorzellen eine Enthemmung oder Aktivierung nach Blockade des PI3K-Akt-Weges. Diese Hypothesen zeigen, dass Tumorzellen sich sehr viel besser an veränderte Bedingungen anpassen, um weiterhin adäquat auf veränderte Reize reagieren zu können. Dabei fällt auf, dass diese Anpassungsmechanismen umso besser zu sein scheinen, je invasiver der Tumor wird. Pilotversuche zur Adhäsionshemmung durch Pertussis-Toxine erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass MIF über den Akt-Weg und einen weiteren noch unbekannten Weg die Adhäsion fördert. Dabei wird vermutet, dass die deutlich bessere Adhäsion von invasiven Tumorzellen auf einer besseren Anpassung an die hoch regulierte MIF-Sekretion in Kombination mit einer Überexpression von ICAM-1 beruht, die durch MIF nachgewiesenermaßen zumindest in Monozyten aktiviert werden kann [79, 186]. Vielleicht ist dieser Regulationsmechanismus auch bei Mamma-Karzinomzellen

vorhanden. Diese könnten dadurch mit einer erhöhten ICAM-1-Expression eine deutlich gesteigerte Adhäsion zeigen und möglicherweise auch zu einer erhöhten Invasionsrate fähig sein.

5.5 MIF stimuliert die Proliferation

Sowohl Hagemann *et al.* als auch Ren *et al.* haben nachgewiesen, dass MIF eine proliferative Wirkung beim Tumorwachstum besitzt [87, 165]. Ebenso wurde gezeigt, dass invasive, stark-CD74-positive Zelllinien durch MIF-Stimulation in ihrer Zellvermehrung deutlich stimuliert werden können [48].

Untersuchungen der Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Beobachtungen auch im Bereich von Brust-Tumoren bestätigen. MIF förderte die Proliferation in allen verwendeten Zelllinien, jedoch besonders deutlich in den hoch-invasiven MDA-MB-231-Zellen. Bei der Zellvermehrung scheint der Einfluss von MIF anteilmäßig größer zu sein als bei der Zelladhäsion, denn Inhibitionen der MIF-Wirkung über entsprechende Antikörper führten zu einer starken Verminderung der Proliferationsrate in den Tumorzellen. Diese Beobachtung eignet sich ideal für die Entwicklung neuer Therapieverfahren, da sowohl nicht-invasive als auch invasive Tumorzellen sehr stark auf die MIF-Blockierung nach Antikörpergabe reagierten und die Proliferation bis auf 35 % der ursprünglichen Vermehrungsrate abgesenkt werden konnte. Nicht-tumoröse Mamma-Epithel-Zellen dagegen wurden durch die Antikörpergabe nur sehr geringfügig in ihrem Proliferationsverhalten beeinflusst. Somit können, anders als in den Studien von Meyer-Siegler *et al.*, nicht nur invasive Tumoren mit MIF-Antikörpern behandelt werden, sondern auch nicht-invasive Tumoren der Brust [48]. Es muss jedoch beachtet werden, dass die verwendeten Tumorzelllinien beide Östrogen-unabhängig sind, wohingegen die MCF-12A-Zellen Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche tragen und somit Östrogen-abhängig sind. Im Bereich der Wundheilung ist von Hardman *et al.* eine Abhängigkeit der MIF-Expression vom Östrogenstatus der Zelle beschrieben worden [187]. So führen Östrogene zu einer verminderten MIF-Synthese, was auch in MCF-12A-Zellen zu einer Anpassung an niedrigere MIF-Konzentrationen im Bezug auf die Proliferation erklären könnte. Jedoch kann diese Theorie nicht ganz in Einklang mit dem absoluten MIF-Gehalt in MDA-MB-231-Zellen gebracht werden. Diese Tumorzellen sind Östrogen-unabhängig und weisen trotzdem eine geringere MIF-Konzentration als MCF-12A-Zellen auf. Somit kann nicht die Regulation der MIF-Expression alleine durch Östrogene als regulierender Faktor erklärt werden. Um Klarheit schaffen zu können, müssten weitere Zelllinien untersucht werden, die sich in ihrem Östrogenstatus unterscheiden.

Die stimulierende Wirkung von MIF auf die Proliferation läuft ebenfalls über den CD74-Rezeptor ab. Blockiert man diesen, so kommt es zu einer deutlich verminderten Proliferationsrate, wobei auch eine zusätzliche MIF-Gabe keine Zunahme der Zellvermehrung herbeiführen kann. In diesen Experimenten scheint MIF vollständig über den CD74-Rezeptor zu wirken, denn die Gabe von Anti-MIF- bzw. Anti-CD74-Antikörpern ergibt jeweils die gleiche Reduktion der Proliferationsrate. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Behandlung mit Anti-MIF-Antikörpern eine Therapieoption bei östrogenunabhängigen, invasiven und nicht-invasiven Tumoren darstellt. Die Wirkung bei östrogenabhängigen Tumoren muss in Zukunft weiter untersucht werden.

Der Einfluss von MIF auf die Proliferation ist sehr groß und scheint wiederum CD74-abhängig zu sein, jedoch ist der weitere Signalweg noch ungeklärt. Eine Signalkaskade über den ERK-MAPK-Weg wäre denkbar, denn dieser Weg wird oft in Bezug auf die Proliferation und anti-apoptotische Wirkung bei extrazellulär-wirkenden Signalmolekülen erwähnt [188-190]. MIF könnte über den MAP-Kinase-Signalweg die Gen-Expression beeinflussen und die Zellproliferation fördern und somit in ähnlicher Weise wirken, wie andere Wachstumsfaktoren und Wachstumshormone [190].

5.6 Aktivierung der Invasion durch MIF

Die Zerstörung der Basalmembran steht in direktem Zusammenhang mit Tumorausbreitung und Metastasenbildung. Bei diesem Prozess tritt zunächst die Aktivierung von proteolytischen Enzymen in den Vordergrund, wobei im Bereich von Mamma-Tumoren vor allem die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 als wichtig beschrieben wurden [191, 192]. Weiterhin wurde von Yu *et al.* die Aktivierung von MMP-9 nach Stimulation durch MIF untersucht, während Pakozdi *et al.* die Aktivierung von MMP-2 durch MIF postulierten [153-155].

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass MIF bei 50 ng/ml, also leicht über den physiologischen Konzentrationen im Serum, die stärkste Wirkung als Chemoattraktant zeigt. Diese MIF-Konzentrationen treten vermutlich bei Entzündungsprozessen und in körperlichen Stresssituationen auf, sodass in diesem Zusammenhang wiederum ein Link zwischen Karzinomentstehung und inflammatorischen Abläufen gefunden werden könnte. Durch Verwendung von rMIF als fördernder Faktor in verschiedenen Konzentrationen konnte die Invasion um bis zu 35 % gesteigert werden. Dieser Effekt zeigt, dass MIF direkt oder indirekt an der Einwanderung von Tumorzellen in das umgebende Stroma und dem Durchbruch der Basalmembran beteiligt ist. Dabei kann die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen als recht wahrscheinlich angesehen werden, wobei auch eine indirekte Aktivierung der MMP-2 und MMP-9 über eine Integrinaktivierung bei der Adhäsion möglich wäre [192].

Um diesen Signalweg genauer aufklären zu können, müsste die MMP-Expression unter MIF-Gabe untersucht und quantifiziert werden. Vermutlich handelt es sich jedoch um einen kombinierten Prozess, bei dem Adhäsion, Invasion und Migration einbegriffen sind und ineinander übergehen. Zusätzlich müsste der Anteil der MMP-Aktivierung untersucht werden, der durch Adhäsionssignalwege hervorgerufen wird.

5.7 Maus-Makrophagen-Überstände stimulieren die Tumorzelladhäsion über MIF

Co-Kultur-Versuche von Hagemann *et al.* hatten ergeben, dass Tumorzellen mit Makrophagen wechselwirken und sie besonders in ihrer Invasionsfähigkeit beeinflussen können [137]. Meine Experimente im Rahmen der Adhäsion haben gezeigt, dass rekombinantes MIF eine gute, stimulierende Wirkung auf die nicht-invasiven MDA-MB-468-Zellen ausüben kann. Somit sollten Maus-Makrophagenüberstände mit diesen Mamma-Tumorzellen kultiviert werden. Um nicht nur beurteilen zu können, ob eine adhäsionsfördernde Wirkung durch die Überstände hervorgerufen werden kann, sondern um gleichzeitig diese Wirkung auf sezerniertes MIF zurückführen zu können, wurden Überstände von Wildtyp- und *knockout*-Mäusen im Vergleich verwendet. Somit konnte die Wirkung von endogenem, zelleigenem MIF betrachtet werden. Die im Western Blot bestimmten Konzentrationen lagen zwischen 100 - 200 ng/ml MIF, wobei diese Werte nur Anhaltspunkte sein dürfen, da es sich um eine semiquantitative Bestimmung handelte.

Die Adhäsion konnte durch die Überstände von WT-Maus-Makrophagen signifikant gegenüber den Überständen der KO-Maus-Makrophagen gesteigert werden, sodass eine Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Mamma-Tumorzellen über das Signalmolekül MIF als sehr wahrscheinlich angesehen werden kann. Pilotversuche zeigten, dass Unterschiede beobachtet werden können zwischen mit IL-6 stimulierten und unstimulierten Makrophagen (Daten nicht gezeigt).

Jedoch ergaben sich im Bereich der Maus-Makrophagen-Versuche im Rahmen dieser Arbeit deutliche Probleme, sodass letztendlich nur wenige Experimente durchgeführt werden konnten. Obwohl die Mäuse über den Verdau von Schwanzstücken eindeutig mit Hilfe der PCR jeweils dreimalig als *knockout*- bzw. Wildtyp-Mäuse charakterisiert werden konnten, zeigten auch die Lysate einzelner KO-Maus-Makrophagen im Western Blot schwache MIF-Banden, sodass man eher von heterozygoten Tieren in Bezug auf die MIF-Expression ausgehen musste. Auch die Untersuchung von retroorbital gewonnenem Blut brachte keine Abhilfe, sodass die Mäusepopulation mehrmals komplett überprüft wurde.

Aus diesem Grund kann nicht ganz sicher ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Überstände der *knockout*-Maus-Makrophagen nicht zu einem heterozygoten Tier gehörten, sodass der Unterschied zwischen WT- und KO-Überständen noch etwas deutlicher hervor-

treten könnte. Insgesamt wurde nur mit den Tieren gearbeitet, die in PCR- und Blutbestimmungen zur Population der *knockout*-Mäuse gehörten.

Zusammenfassend kann jedoch bestätigt werden, dass über MIF eine Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Makrophagen besteht. Wahrscheinlich handelt es sich auch hierbei um einen multifaktoriellen Prozess, der erst langsam Schritt für Schritt aufgeklärt werden kann. Jedoch weisen erste Experimente wiederum auf einen Link zwischen Entzündungsprozessen und Tumorbildung hin, da besonders im chronisch-entzündeten Gewebe ortsständige Makrophagen in großen Mengen vorliegen, die sich zu TAMs (*tumor-associated macrophages*) entwickeln und via MIF-Sekretion die Mamma-Karzinom-Zellen beeinflussen können [193, 194].

5.8 Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit dem MIF-Gehalt in Mamma-Biopsaten

Bando *et al.* konnten eine inverse Korrelation zwischen Lymphknotenstatus und MIF-Gehalt in Mamma-Biopsaten finden, die in den vorliegenden Experimenten bestätigt wurde [167]. Obwohl mit 50 Biopsien relativ wenige Proben vorlagen, ist der Unterschied des MIF-Gehaltes im Stadium pN0 und pN1 mit einem p-Wert von $p=0,071$ nahezu signifikant. Sind noch keine Lymphknoten befallen, so ist der MIF-Gehalt in den Gewebeproben höher, während im Lymphknotenstatus pN1 die MIF-Konzentration im Mittelwert deutlich abnimmt. Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen der Western Blot Analysen und der verwendeten Zelllinien bestätigt werden. Um diese Ergebnisse weiter verifizieren zu können, müssten umfangreichere Gewebeuntersuchungen durchgeführt werden. Doch auch an dieser Stelle kann spekuliert werden, dass aggressive Tumoren niedrige MIF-Konzentrationen aufweisen, um durch starke Hochregulationen der MIF-Genexpression sensitivere Anpassungen aufweisen zu können.

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die MIF-Konzentrationen der Biopsien pro mg Gesamtprotein zwischen 10 ng/ml und 1200 ng/ml schwankten und somit in den von Bando *et al.* bestimmten Bereichen lagen.

Weitere Korrelationen des MIF-Gehalts mit klinisch-pathologischen Daten zeigten lediglich Tendenzen, wobei die aggressiveren, schlecht therapierbaren Tumoren stets einen geringeren MIF-Gehalt aufwiesen. PA- und PAI-1-Protein zählen zu prognostisch ungünstigen Markern, sodass bei einem erhöhten Gehalt dieser Proteine eine erniedrigte MIF-Konzentration vorzufinden war. Somit könnte MIF eventuell in Zukunft in Kombination mit weiteren Parametern als therapeutischer und prognostischer Marker bei Mamma-Karzinomen eingesetzt werden. Unter Umständen wären bei großem Probenumfang sogar Rückschlüsse auf den Lymphknotenstatus möglich, wobei darüber zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden kann.

5.9 Gesamtmodell der MIF-Wirkung in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen

Das Zytokin MIF bindet an einen Rezeptorkomplex, dessen Komponenten bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden konnten, wobei jedoch CD74 eine bedeutende Rolle spielt. Je mehr CD74-Oberflächenmoleküle eine Zelle hat, umso sensibler scheint sie auf MIF reagieren zu können. Gerade dieser Mechanismus scheint in invasiven Mamma-Karzinomzellen vorzuliegen. Wie die Abb. 39 zeigt, werden durch MIF-Bindung verschiedenste Signalwege aktiviert, die Proliferation, Invasion, Apoptose und Adhäsion vermitteln. Zusätzlich kommt es über einen bis jetzt noch nicht vollständig erforschten Weg zu einer MIF-Sekretion über einen autokrinen *loop*.

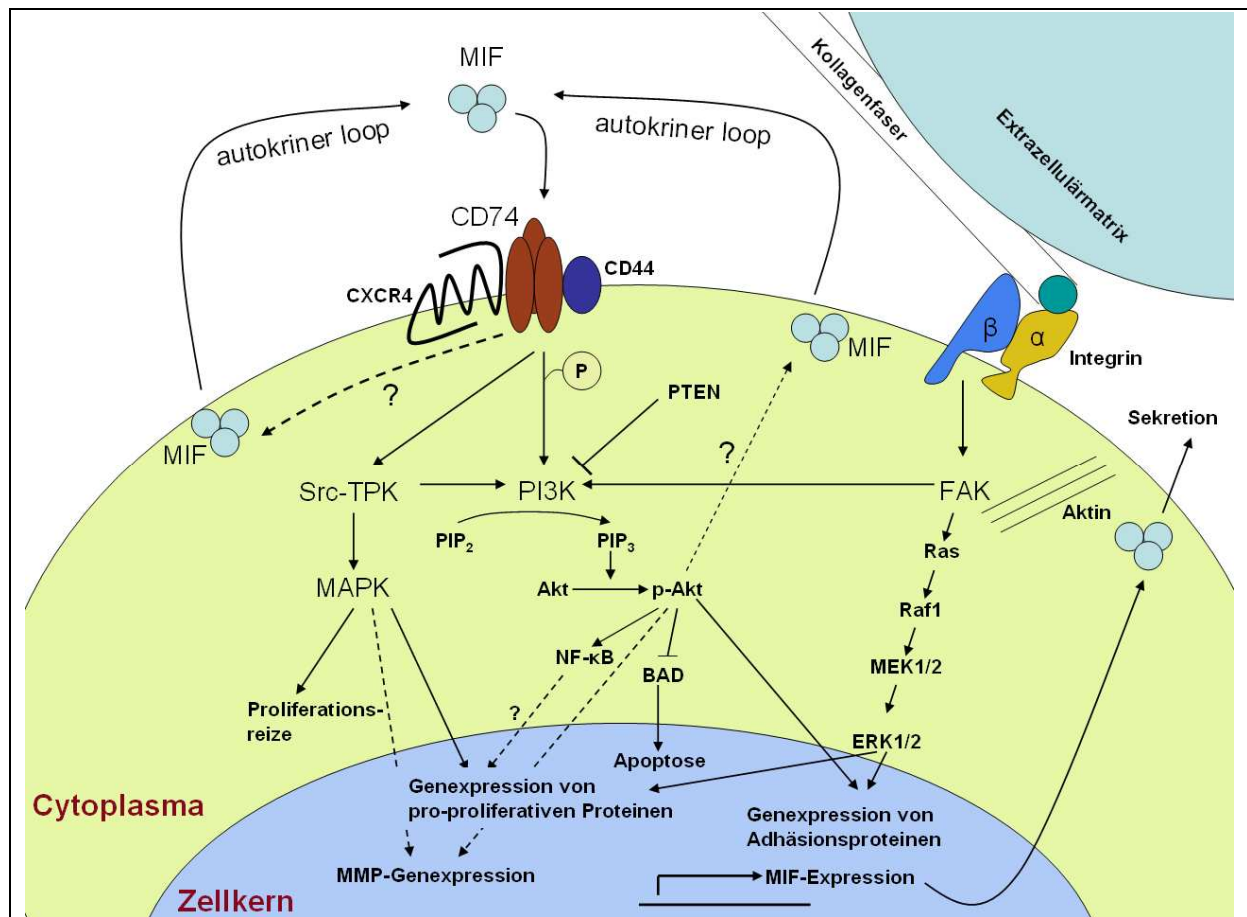


Abb. 39: Gesamtmodell der MIF-Wirkung in Mamma-Epithel- und Mamma-Karzinom-Zellen. MIF bindet an den Rezeptorkomplex und aktiviert eine Signalkaskade über PI3K-Akt und den parallelen MAPK-Weg. Somit stimuliert das Zytokin aktiv die Zellproliferation, Adhäsion und die Apoptose. Zusätzlich kommt es über noch ungeklärte Signaltransduktionsmechanismen zu einer stimulierten MIF-Sekretion über einen autokrinen *loop*. Unabhängig davon führt auch die Adhäsion zu einer MIF-Sekretion über die FAK, jedoch konnte in dieser Arbeit auch der umgekehrte Effekt gezeigt werden, nämlich dass MIF die Adhäsion stimuliert. Um die Übersicht zu erhalten sind in diesem Modell nicht die Wirkungen von MIF auf die Invasion beschrieben, die vermutlich in der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen bestehen. Der genaue Aktivierungsweg ist noch ungeklärt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von MIF bei der Tumorgenese von Mamma-Karzinomen genauer untersucht werden. MIF ist als wichtiges Zytokin in Entzündungsprozessen wie beispielsweise der bakteriellen Sepsis und der Colitis ulcerosa bekannt, scheint jedoch auch bei der Entstehung von Tumoren als wichtiger Mediator beteiligt zu sein.

Bei der ersten Charakterisierung der Mamma-Zelllinien und der Bestimmung von MIF-Konzentrationen in Tumor-Biopsien ergab sich, dass die prognostisch ungünstigeren Tumoren einen erniedrigten MIF-Gehalt aufweisen, während nicht-invasive Tumoren eine deutliche Überexpression zeigen. Der MIF-Gehalt in Mamma-Zellen wird durch eine Akt-Aktivierung und PTEN-Hemmung positiv beeinflusst. Jedoch weisen die invasiven MDA-MB-231-Zellen trotz mittelmäßigem PTEN-Gehalt eine niedrigere MIF-Konzentration auf als die nicht-tumorösen, stark PTEN-positiven MCF-12-A-Zellen. Somit konnte kein direkter Zusammenhang zwischen p-Akt/Akt-Ratio und MIF-Gehalt hergestellt werden.

Die invasiven MDA-MB-231-Zellen reagieren deutlich sensibler auf die Gabe von exogenem, rekombinantem MIF, indem sie die zelleigene MIF-Sekretion innerhalb kurzer Zeit stark hochregulieren. Dies kann auf ihre erhöhte CD74-Oberflächen-Expression zurückgeführt werden.

Interessant war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass exogenes MIF die endogene MIF-Sekretion aller Zelltypen in unterschiedlichem Maße steigert, sodass es zu einer Art Rückkopplungsschleife über einen autokrinen *loop* kommt.

Weitere funktionelle Assays haben gezeigt, dass MIF eine Adhäsionssteigerung herbeiführen kann. Dabei wirkt der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor in den gesunden, nicht-tumorösen Epithelzellen hauptsächlich über den PI3K-Akt-Weg, während in den Tumorzellen ein zusätzlicher, alternativer Signaltransduktionsweg existieren muss. Zusätzlich konnte in MDA-MB-468-Zellen nachgewiesen werden, dass sowohl die Gabe von Anti-MIF-Antikörpern als auch von Anti-CD-74-Antikörpern einen adhäsionshemmenden Effekt bewirken. Dieser wird somit durch das endogene, von den Zellen sezernierte MIF hervorgerufen, welches über CD74 als Oberflächenrezeptor wirkt. In diesem Zusammenhang konnte zusätzlich gezeigt werden, dass MIF aus Maus-Makrophagen-Überständen die Adhäsion fördert und Makrophagen somit mit Tumorzellen wechselwirken.

Bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens unter MIF-Stimulation konnte gezeigt werden, dass rMIF besonders in invasiven Karzinomzellen die Proliferationsrate stark erhöht, während normale Mamma-Epithel-Zellen nur bei 10 ng/ml MIF eine geringe Aktivierung aufweisen. Anti-MIF- und Anti-CD74-Antikörper hemmen die Proliferation in den

verwendeten Tumorzellen, lassen jedoch die gesunden Mamma-Epithelzellen völlig unbeeinflusst, sodass sich daraus eine ideale Therapieform ergeben könnte

Analog zur Proliferationssteigerung wirkt MIF auch pro-invasiv. So kommt es in MDA-MB-231-Zellen unter Gabe von MIF als Chemoattraktant zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, die den Durchbruch der Basalmembran fördern und somit die Invasion steigern. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MIF eine wichtige Rolle im Bereich der Tumorgenese und der Invasionsfähigkeit von Mamma-Karzinomen einnimmt. Die Signalwege scheinen teilweise von den bisher bekannten Mechanismen abzuweichen, wobei vor allem die invasiven Tumorzellen eine deutlich effektivere Anpassung an MIF-Stimulationen aufweisen.

7 Literatur

1. Rich, A.R. and M.R. Lewis, Migration of neutrophils and macrophages. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1932. **50**: 115-131.
2. David, J.R., Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966. **56**: 72-77.
3. Bloom, B. and B. Bennett, Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 1966. **153**: 80-82.
4. Nathan, C.F., M.L. Karnovsky, and J.R. David, Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1971. **133**: 1356-1376.
5. Nathan, C.F., H.G. Remold, and J.R. David, Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage function. *J. Exp. Med.*, 1973. **137**: 275-288.
6. Burmeister, G., L. Tarcsay, and C. Sorg, Generation and characterization of a monoclonal antibody (1C5) to human migration inhibitory factor (MIF). *Immunobiology*, 1986. **171** : 461-474.
7. McInnes, A. and D.M. Rennick, Interleukin-4 induces cultured monocytes /macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.*, 1988. **167**: 598-611.
8. Weiser, W.Y., et al., Molecular cloning of cDNA encoding a human macrophage migration inhibition factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989. **86**: 7522-7526.
9. Bernhagen, J., et al., Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration Inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*, 1994. **33**: 14144-14155.
10. Bernhagen, J., et al., MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 1993. **365**: 756-759.
11. Bernhagen, J., et al., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a neuroendocrine mediator of endotoxemia. *Trends Microbiol.*, 1994. **2**: 198-201.
12. Swope, M., et al., Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J.*, 1998. **1**: 3534-3541.
13. Kato, Y., et al., The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded β -sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**: 3007-3010.
14. Sugimoto, H., et al., Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.*, 1996. **389**: 145-148.
15. Sun, H., et al., Crystal structure at 2.6 Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**: 5191-5196.

16. Mühlhahn, P., et al., NMR characterization of structure, backbone dynamics and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci.*, 1996. **5**: 2095-2103.
17. Mischke, R., et al., Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett.*, 1998. **427**: 85-90.
18. Rosengren, E., et al., The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol. Med.*, 1996. **2**: 143-149.
19. Matsunaga, J., et al., Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**: 3268-3271.
20. Mischke, R., et al., Structure activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus. *FEBS Lett.*, 1997. **414**: 226-232.
21. Kleemann, R., et al., klemm. *J. Mol. Biol.*, 1998. **280**: 85-102.
22. Calandra, T., et al., MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 1995. **377**: 68-71.
23. Calandra, T. and R. Bucala, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) - a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit. Rev. Immunol.*, 1997. **17**: 77-88.
24. Kleemann, R., et al., Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor: Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. *Eur. J. Biochem.*, 2000. **267**: 7183-7193.
25. Calandra, T., et al., Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. **95**: 11383-11388.
26. Bacher, M., et al., An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**: 7849-7854.
27. Thiele, M. and J. Bernhagen, Link between macrophage migration inhibitory factor (MIF) and cellular redox regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**: 1234-1248.
28. Calandra, T., et al., The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.*, 1994. **179**: 1895-1902.
29. Rossi, A.G., et al., Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J. Clin. Invest.*, 1998. **101**: 2869-2874.

30. Takahashi, A., et al., Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol. Immunol.*, 1999. **43**: 61-67.
31. Bacher, M., et al., Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol.*, 1997. **15**: 235-246.
32. Wilson, J.M., et al., Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology*, 2005. **129**: 1485-503.
33. Meyer-Siegler, K., R.A. Fattor, and P.B. Hudson, Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Prostate. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1998. **7**: 44-50.
34. Nishino, T., et al., Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med.*, 1995. **1**: 781-788.
35. Sakaue, S., et al., Regulation of Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol. Med.*, 1999. **5**: 361-371.
36. Waeber, G., et al., Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1997. **94**: 4782-4787.
37. Waeber, G., et al., A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 1999. **15**: 47-54.
38. Fingerle-Rowson, G.R. and R. Bucala, Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Immunol. Cell Biol.*, 2001. **79**: 368-375.
39. Calandra, T., et al., The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.*, 1994. **179**: 1985-1992.
40. Bernhagen, J., T. Calandra, and R. Bucala, Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J. Mol. Med.*, 1998. **76**: 151-161.
41. Morand, E.F., New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med. J.*, 2005. **35**: 419-426.
42. Jüttner, S., et al., Macrophage migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J. Immunol.*, 1998. **161**: 2383-2390.
43. Onodera, S., et al., Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Phagocytosis of Foreign Particles By Macrophages in Autocrine and Paracrine Fashion. *Immunology*, 1997. **92**: 131-137.

44. Kleemann, R., et al., Receptor-binding and cellular uptake studies of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Use of biologically active MIF derivatives. *J. Interf. Cytokine Res.*, 2002. **22**: 351-363.
45. Lue, H., et al., Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Mechanisms of action and role in disease. *Microb. Infect.*, 2002. **4**: 449-460.
46. Bernhagen, J., et al., MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.*, 2007. **13**: 587-596.
47. Leng, L., et al., MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.*, 2003. **197**: 1467-1476.
48. Meyer-Siegler, K.L., et al., Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J. Immunol.*, 2006. **177**: 8730-8739.
49. Shi, X., et al., CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 2006. **25**: 595-606.
50. Morand, E.F., M. Leech, and J. Bernhagen, MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006. **5**: 399-410.
51. Mitchell, R.A., et al., Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**: 18100-18106.
52. Pearson, G., et al., Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 2001. **22**: 153-183.
53. Lue, H., et al., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 2007. **26**: 5046-5059.
54. Datta, S.R., et al., Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev. Cell*, 2002. **3**: 631-643.
55. Chang, F., et al., Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 2003. **17**: 590-603.
56. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito, PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 2004. **9**: 667-676.
57. Hennessy, B.T., et al., Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005. **4**: 988-1004.
58. Blobel, G., Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980. **77**: 1496-500.

59. Flieger, O., et al., Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett.*, 2003. **551**: 78-86.
60. Sakamoto, W., et al., Inhibition of macrophage migration inhibitory factor secretion from macrophages by vitamin E. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998. **1404**: 427-434.
61. Bone, R.C., et al., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992. **101**: 1644-1655.
62. Bozza, M., et al., Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.*, 1999. **189**: 341-346.
63. Calandra, T., et al., Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Nat. Med.*, 2000. **6**: 164-169.
64. Emonts, M., et al., Association between high levels of blood macrophage migration inhibitory factor, inappropriate adrenal response, and early death in patients with severe sepsis. *Clin. Infect. Dis.*, 2007. **44**: 1321-1328.
65. Sakuragi, T., et al., Lung-derived macrophage migration inhibitory factor in sepsis induces cardio-circulatory depression. *Surg. Infect.*, 2007. **8**: 29-40.
66. Wang, F.Z., et al., Role of macrophage migration inhibitory factor in septic shock-induced cardiovascular dysfunction: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007. **87**: 768-773.
67. Chuang, C.C., et al., Increases in serum macrophage migration inhibitory factor in patients with severe sepsis predict early mortality. *Shock*, 2007. **27**: 503-506.
68. Martin, T.R., Cytokines and the acute respiratory distress syndrome (ARDS) - a question of balance. *Nature Medicine*, 1997. **3**: 272-273.
69. Donnelly, S.C. and R. Bucala, Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol. Med. Today*, 1997. **3**: 502-507.
70. Magalhaes, E.S., et al., Macrophage migration inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *Eur. J. Immunol*, 2007. **37**: 1097-1106.
71. de Jong, Y.P., et al., Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**: 1061-1066.
72. Mikulowska, A., et al., Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J. Immunol.*, 1997. **158**: 5514-5517.
73. Leech, M., et al., Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998. **41**: 910-917.

74. Leech, M., et al., Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis - Evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.*, 1999. **42**: 1601-1608.
75. Santos, L., et al., Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001. **123**: 309-314.
76. Santos, L.L., et al., Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor. *J. Rheumatol.*, 2004. **31**: 1038-1043.
77. Burger-Kentischer, A., et al., Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, 2002. **105**: 1561-1566.
78. Lin, S.G., et al., De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ. Res.*, 2000. **87**: 1202-1208.
79. Amin, M.A., et al., Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*, 2006. **107**: 2252-2261.
80. Burger-Kentischer, A., et al., Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*, 2006. **184**: 28-38.
81. Nishihira, J. and A. Ogata, Macrophage migration inhibitory factor as a target molecule in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2001. **2**: 778-782.
82. Denking, C.M., et al., Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2004. **52**: 389-400.
83. Hudson, J.D., et al., A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.*, 1999. **190**: 1375-1382.
84. Takahashi, N., et al., Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol. Med.*, 1998. **4**: 707-714.
85. Meyer-Siegler, K. and P.B. Hudson, Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*, 1996. **48**: 448-452.
86. Meyer-Siegler, K.L., E.C. Leifheit, and P.L. Vera, Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer*, 2004. **4**: 34.
87. Hagemann, T., et al., Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.*, 2007. **6**: 1993-2002.
88. Agarwal, R., et al., Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2007. **196**: 348 1-5.

89. Shimizu, T., et al., High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999. **264**: 751-758.
90. Chesney, J., et al., An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.*, 1999. **5**: 181-191.
91. Yang, Y., et al., Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000. **85**: 4721-4727.
92. Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2005. **55**: 74-108.
93. Giersiepen K., H.C., Janhsen K., Lange C., Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Brustkrebs., Robert-Koch-Institut, 2005..
94. Katalinic A., B.C., M. san., Epidemiologie Mammakarzinom. Institut für Krebs epidemiologie e.V. an der Universität zu Lübeck, 2006.
95. Bowcock, A.M., Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics *Humana Press*, 1999. **1**: 15.
96. Allred, D.C., S.K. Mohsin, and S.A. Fuqua, Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001. **8**: 47-61.
97. Moinfar, F., et al., Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type ("clinging ductal carcinoma in situ"): a simulator of normal mammary epithelium. *Cancer*, 2000. **88**: 2072-81.
98. Leong, A.S., et al., Biologic markers in ductal carcinoma in situ and concurrent infiltrating carcinoma. A comparison of eight contemporary grading systems. *Am J Clin. Pathol.*, 2001. **115**: 709-718.
99. Wirman, J.A., The clinical significance of minimal breast cancer: a pathologist's viewpoint. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1985. **3**: 35-74.
100. Petri, A.L., et al., Alcohol intake, type of beverage, and risk of breast cancer in pre- and postmenopausal women. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2004. **28**: 1084-1090.
101. Santen, R.J., et al., Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr. Relat. Cancer*, 2007. **14**: 169-187.
102. Middleton, L.P., et al., Expression of ERalpha and ERbeta in lobular carcinoma in situ. *Histopathology*, 2007. **50**: 875-880.
103. Bilous, M., et al., Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast*, 2003. **12**: 92-98.

104. Robert, N.J. and A.M. Favret, HER2-positive advanced breast cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2007. **21**: 293-302.
105. Ryden, L., et al., HER2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007.
106. Diehl, K.M., et al., p38MAPK-Activated AKT in HER-2 Overexpressing Human Breast Cancer Cells Acts as an EGF-Independent Survival Signal. *J. Surg. Res.*, 2007.
107. Meryet-Figuières, M., et al., Inhibition of PAI-1 expression in breast cancer carcinoma cells by siRNA at nanomolar range. *Biochimie*, 2007.
108. Lee, A.H., et al., Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J. Pathol.*, 1998. **185**: 394-401.
109. Gisterek, I., et al., Evaluation of prognostic value of VEGF-C and VEGF-D in breast cancer--10 years follow-up analysis. *Anticancer. Res.*, 2007. **27**: 2797-2802.
110. Herold, G.D.m., Innere Medizin. 2006.
111. Riede, U.S.H., Allgemeine und spezielle Pathologie. *Urban und Schwarzenberg*. 1995.
112. Mieog, J.S., J.A. van der Hage, and C.J. van de Velde, Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br. J. Surg.*, 2007.
113. Dienstmann, R. and J. Bines, Evidence-based neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 2006. **7**: 315-320.
114. Sakorafas, G.H. and G. Peros, Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical practice. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*, 2007. **16**: 318-321.
115. Lamichhane, N., et al., Initial experience in a cancer hospital in Nepal with sentinel lymph node mapping and biopsy for evaluation of axillary lymph node status in palpable invasive breast cancer. *Nepal Med. Coll. J.*, 2007. **9**: 22-26.
116. Kim, H.J., et al., Sentinel node biopsy in patients with multiple breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007.
117. Mabry, H. and A.E. Giuliano, Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 2007. **16**: 55-70.
118. Killander, F., et al., Radiotherapy and tamoxifen after mastectomy in postmenopausal women - 20 year follow-up of the South Sweden Breast Cancer group randomised trial SSB CG II:I. *Eur. J. Cancer*, 2007.
119. Lee, M.C. and R. Jagsi, Postmastectomy radiation therapy: indications and controversies. *Surg. Clin. North. Am.*, 2007. **87**: 511-526.

120. Ismael, G., et al., Trastuzumab (herceptin) for early-stage breast cancer. *Hematol Oncol. Clin. North. Am.*, 2007. **21**: 239-256.
121. Yamashiro, H. and M. Toi, Herceptin (trastuzumab). *Gan. To Kagaku Ryoho*, 2007. **34**: 1173-1176.
122. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 2005. **7**: 211-217.
123. de Visser, K.E. and L.M. Coussens, The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib. Microbiol.*, 2006. **13**: 118-137.
124. Coussens, L.M. and Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature*, 2002. **420**: 860-7.
125. Nicolini, A., A. Carpi, and G. Rossi, Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2006. **17**: 325-337.
126. McHeyzer-Williams, M.G., B cells as effectors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003. **15**: 354-61.
127. Whitford, P., W.D. George, and A.M. Campbell, Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocyte activation and tumour cell MHC class I and II expression in breast cancer patients. *Cancer Lett.*, 1992. **61**: 157-164.
128. Shimokawara, I., et al., Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer*, 1982. **49**: 1456-1464.
129. Tan, E.M. and F.D. Shi, Relative paradigms between autoantibodies in lupus and autoantibodies in cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003. **134**: 169-177.
130. Tomer, Y., Y. Sherer, and Y. Shoenfeld, Autoantibodies, autoimmunity and cancer (review). *Oncol. Rep.*, 1998. **5**: 753-761.
131. Wong, P.Y., et al., Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J. Surg. Res.*, 1998. **76**: 95-103.
132. Kohrt, H.E., et al., Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLOS Med.*, 2005. **2**: 284.
133. Tan, T.T. and L.M. Coussens, Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007. **19**: 209-216.
134. Prueitt, R.L., et al., Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2007. **120**: 796-805.
135. Johansson, M., et al., Immune cells as anti-cancer therapeutic targets and tools. *J Cell Biochem.*, 2007. **101**: 918-926.
136. Lewis, C.E. and R. Hughes, Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. *Breast Cancer Res.*, 2007. **9**: 209.

137. Hagemann, T., et al., Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J. Immunol.*, 2005. **175**: 1197-1205.
138. Leek, R.D., et al., Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, 1996. **56**: 4625-4629.
139. Bingle, L., et al., Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer*, 2006. **94**: 101-107.
140. O'Sullivan, C., et al., Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *Lancet*, 1993. **342**: 148-149.
141. Lin, E.Y., et al., Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.*, 2006. **66**: 11238-11246.
142. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer*, 2002. **2**: 91-100.
143. Hehlhans, S., M. Haase, and N. Cordes, Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007. **1775**: 163-180.
144. Mullen, P., et al., Effect of Matrigel on the tumorigenicity of human breast and ovarian carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 1996. **67**: 816-820.
145. Oktay, M.H., et al., Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas. *Hum. Pathol.*, 2003. **34**: 240-245.
146. Slack-Davis, J.K., et al., Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**: 14845-14852.
147. Liao, H., R. Bucala, and R.A. Mitchell, Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**: 76-81.
148. Liu, W., J. Bagaitkar, and K. Watabe, Roles of AKT signal in breast cancer. *Front. Biosci.*, 2007. **12**: 4011-4019.
149. Zhao, M., et al., Akt plays an important role in breast cancer cell chemotaxis to CXCL12. *Breast Cancer Res. Treat*, 2007.
150. Toker, A. and M. Yoeli-Lerner, Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.*, 2006. **66**: 3963-3966.
151. Wyszomierski, S.L. and D. Yu, A knotty turnabout?: Akt1 as a metastasis suppressor. *Cancer Cell*, 2005. **8**: 437-439.
152. Li, Z., S.X. Lin, and Y.J. Liang, Increased cell migration of nasopharyngeal carcinoma cell lines in vitro by macrophage migration inhibitory factor. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2004. **33**: 57-61.
153. Yu, X., et al., Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2007. **27**: 103-109.

154. Pakozdi, A., et al., Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2006. **8**: 132.
155. Kong, Y.Z., et al., Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 2005. **178**: 207-215.
156. Pfaffl, M.W., et al., Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2002. **22**: 91-102.
157. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2002. **30**: 36.
158. Koseoglu, S., et al., AKT1, AKT2 and AKT3-Dependent Cell Survival is Cell Line-specific and Knockdown of All Three Isoforms Selectively Induces Apoptosis in 20 Human Tumor Cell Lines. *Cancer Biol. Ther.*, 2007. **6**.
159. Bose, S., et al., Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum. Pathol.*, 2002. **33**: 405-409.
160. He, L., et al., Co-existence of high levels of the PTEN protein with enhanced Akt activation in renal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007.
161. Leng, L., et al., MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.*, 2003. **197**: 1467-1476.
162. Moldenhauer, G., et al., Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology*, 1999. **96**: 473-484.
163. Graf, J., et al., A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. *Biochemistry*, 1987. **26**: 6896-6900.
164. Liao, H., R. Bucala, and R.A. Mitchell, Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**: 76-81.
165. Ren, Y., et al., Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma. *Oncogene*, 2006. **25**: 3501-3508.
166. Hagemann, T., et al., Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 2004. **25**: 1543-1549.

167. Bando, H., et al., Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002. **93**: 389-396.
168. Engel, R.H. and V.G. Kaklamani, HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. *Drugs*, 2007. **67**: 1329-1341.
169. Lin, A. and H.S. Rugo, The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2007. **8**: 47-60.
170. Viani, G.A., et al., Adjuvant trastuzumab in the treatment of HER-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*, 2007. **7**: 153.
171. Urban, P., et al., Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2006. **24**: 4245-4253.
172. Stillfried, G.E., D.N. Saunders, and M. Ranson, Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. *Breast Cancer Res.*, 2007. **9**: 14.
173. Minisini, A.M., et al., Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2007. **128**: 112-117.
174. Sternlicht, M.D., et al., Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006. **15**: 2107-2114.
175. Offersen, B.V., et al., Lack of association between level of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and estimates of tumor angiogenesis in early breast cancer. *Acta. Oncol.*, 2007. **46**: 782-791.
176. Castello, R., et al., Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer. *Thromb. Res.*, 2007.
177. Bini, L., et al., Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, 1997. **18**: 2832-2841.
178. Sheridan, C., et al., Negative regulation of MHC class II gene expression by CXCR4. *Exp. Hematol.*, 2006. **34**: 1085-1092.
179. Franklin, W.A., et al., Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin. Oncol.*, 2002. **29**: 3-14.
180. Mitchell, R.A. and R. Bucala, Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor. *Semin. Cancer Biol.*, 2000. **10**: 359-366.
181. Mitchell, R.A., Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumorigenesis. *Cell Signal.*, 2004. **16**: 13-19.

182. Flieger, O., H. Brunner, and J. Bernhagen. *A novel secretory pathway for the cytokine MIF*. in *Fall Conference of the German Society for Immunology (DGfI)*. 2000.
183. Flieger, O., et al., Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett.*, 2003. **551**: 78-86.
184. Jones, J., et al., CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 2007.
185. Onodera, S., et al., Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**: 7865-7874.
186. Rosette, C., et al., Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2005. **26**: 943-50.
187. Hardman, M.J., et al., Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing. *Am. J. Pathol.*, 2005. **167**: 1561-1574.
188. Aguirre-Ghiso, J.A., et al., ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res.*, 2003. **63**: 1684-1695.
189. McCubrey, J.A., et al., Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv. Enzyme Regul.*, 2006. **46**: 249-279.
190. Santen, R.J., et al., The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2002. **80**: 239-256.
191. Lee, H.S., et al., [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J. Nutr. Biochem.*, 2007.
192. Baum, O., et al., Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the beta3 integrin subunit. *Int. J. Oncol.*, 2007. **30**: 325-332.
193. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol.*, 2005. **26**: 318-325.
194. Lin, E.Y. and J.W. Pollard, Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found. Symp.*, 2004. **256**: 158-168; discussion 168-72, 259-269.

8 Anhang

Auflistung der eigenen Publikationen

Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer.

Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J.

BMC Cancer. 2009 Jul 14;9:230.

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen, der mir die Möglichkeit zur Durchführung meiner Arbeit in der Abteilung Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Institut für Biochemie gegeben hat und der mich stets mit neuen Ideen und Anregungen unterstützen und ermutigen konnte.

Danken möchte ich auch Dr. med. Hongqi Lue für seine wertvollen, wissenschaftlichen und methodentechnischen Ratschläge und Hilfestellungen im gesamten Verlauf der Arbeit.

Für die immerwährende Unterstützung möchte ich mich bei den naturwissenschaftlichen Doktorandinnen Sandra Kraemer und Anke Schütz und bei der Diplomandin Verena Scharz bedanken, ohne die viele Ideen in einer einmaligen Atmosphäre der Arbeitsgruppe nicht entstanden wären.

Besonders bei der Durchführung der *real-time*-PCRs und der Untersuchung der Mamma-Karzinom-Biopsien erhielt ich Hilfestellungen aus dem Institut der Pathologie, wobei ich besonders PD Dr. Edgar Dahl und Erik Noetzel danken möchte.

Mein Dank gilt auch der chemisch-technischen Assistentin Birgitt Lennartz, durch deren Hilfe ich viele Methoden erlernen konnte und die mir in frustrierten Situationen stets aufmunternd zur Seite stand.

Ohne die Unterstützung der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber wäre mir die Durchführung von Messungen am Spectra-Fluor im Rahmen der Adhäsionsassays nicht ermöglicht worden. Die Gruppe hat mich auch bei der Makrophagen-Isolierung aus B57BL/6-Mäusen zusätzlich unterstützt.

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern und meinem Freund Alexander für ihre Unterstützung und Geduld in der zurückliegenden Zeit von Herzen danken.

Erklärung zur Datenaufbewahrung (§ 5 Abs. 1)

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer, **Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Jürgen Bernhagen, Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Aachen**, hinterlegt sind.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name, Vorname: Verjans, Eva Maria

Adresse: Weidenweg 10
52074 Aachen

Geburtsdatum: 6. Februar 1984

Geburtsort: Mönchengladbach

Familienstand: Ledig

Nationalität: Deutsch

Bildungsweg

1990 – 2003 Schulausbildung

2003 Allgemeine Hochschulreife am Franz-Meyers-Gymnasium

2003-2009 Studium der Humanmedizin, Modellstudiengang, RWTH Aachen

2009 Ärztliche Prüfung und Approbation als Ärztin

Stipendien

2004-2009 Stipendiatin der Bischöflichen Studienstiftung Cusanuswerk

2008-2009 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Promotion

2006-2009 Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie
(Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen):
*Molekulare Steuerung des Mamma-Karzinom-Verhaltens durch das
inflammatorische Zytokin MIF*

Juli 2009 Veröffentlichung in BMC Cancer (Vol. 9, 230):
*Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human
breast cancer*

Wettbewerbsteilnahmen

1997-2003 Siebenmalige Teilnahme am Wettbewerb „Jugend forscht“ mit
zahlreichen Auszeichnungen und Sonderpreisen auf Regional-,
Landes- und Bundesebene

2003 Bundessiegerin des Bundesumweltwettbewerbs mit der Arbeit
„Nichts als Lärm!“

2008 Teilnahme am Benjamin-Franklin-Contest an der Charité Berlin

Aachen, den 06.01.2010