

Aus dem Med. Zentrum für Hygiene der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Klenk  
Institut für Immunologie, Leiter Prof. Dr. Gemsa  
Arbeitsgruppe PD Dr. Michael Bacher

# **Expression und Funktion von Makrophagen Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) in humanen Glioblastomzelllinien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

**Jörg Schrader**

aus Minden

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
am 15. Juni 2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch  
Referent: PD Dr. rer. nat. M. Bacher  
Korreferent: Prof. Dr. med. N. Sommer  
2. Korreferent: Prof Dr. med. G. Bein

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Makrophagen Migrations-Inhibitions-Faktor . . . . .	2
1.1.1	Überblick über die Geschichte der MIF-Erforschung . . . . .	2
1.1.2	Eigenschaften des Proteins MIF . . . . .	3
1.1.3	Funktion von MIF im Immunsystem . . . . .	5
1.1.4	Expression und Funktion von MIF in Tumoren . . . . .	7
1.2	Der Gehirntumor:	
	Glioblastoma multiforme . . . . .	10
1.2.1	Molekulare Pathologie der Glioblastome . . . . .	10
1.2.2	Klinische Merkmale und Therapieoptionen der Glioblastome .	12
1.3	MIF und Glioblastome:	
	Ausgangsbefunde und Formulierung der Arbeitshypothese . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
	<b>Basistechniken</b>	<b>16</b>
2.1	Zellkultur . . . . .	17
2.1.1	Zelllinien . . . . .	17
2.1.2	Kulturbedingungen . . . . .	17
2.1.3	Passagierung . . . . .	18
2.1.4	Einfrieren und Auftauen der Zellen . . . . .	19
2.1.5	Mycoplasmentest . . . . .	20
2.2	Probenaufbereitung . . . . .	22
2.2.1	RNA-Präparation . . . . .	22



2.2.2	Präparation intrazellulärer Proteine . . . . .	23
2.2.3	Aufbereitung der Überstände . . . . .	23
2.3	Northern Blot . . . . .	24
2.3.1	Sondenherstellung . . . . .	24
2.3.2	Gelaufreinigung und Blotting . . . . .	25
2.3.3	Hybridisierung und Detektion . . . . .	27
2.4	Western Blot . . . . .	28
2.4.1	Gellauf und Blotting . . . . .	28
2.4.2	MIF-Detektion . . . . .	29
2.4.3	Phospho-Akt-Detektion . . . . .	29
2.5	ELISA - Techniken . . . . .	30
2.5.1	MIF-ELISA . . . . .	30
2.5.2	VEGF-ELISA . . . . .	31
2.5.3	LDH - Assay . . . . .	32
2.6	Wachstumsassays . . . . .	32
2.6.1	BrdU-Assay . . . . .	33
2.6.2	Amidoblack-Assay . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	
	<b>Experimente</b>	<b>36</b>
3.1	Zellstress . . . . .	37
3.1.1	Vorversuch . . . . .	37
3.1.2	Hypoxie und Hypoglykämie . . . . .	38
3.1.3	Kontrollen . . . . .	38
3.2	Antisense-Klone . . . . .	39
3.2.1	Vektorherstellung . . . . .	39
3.2.2	Transfektion . . . . .	39
3.2.3	Selektion und Klonierung . . . . .	42
3.2.4	Molekulare Charakterisierung . . . . .	43
3.2.5	Funktionelle Charakterisierung . . . . .	44
3.2.6	Morphologie . . . . .	44

3.3	Proliferationsanalysen . . . . .	45
3.3.1	Monoklonale Anti-MIF Antikörper . . . . .	45
3.3.2	MIF-Inhibitor . . . . .	46
3.3.3	Rekombinanter MIF . . . . .	46
3.4	Zelldichte . . . . .	47
3.5	AKT-Aktivierung . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1	Zellstress . . . . .	49
4.2	Antisense-Klone . . . . .	55
4.2.1	Selektion und Klonierung . . . . .	55
4.2.2	Molekulare Charakterisierung . . . . .	55
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung . . . . .	60
4.2.4	Morphologie . . . . .	62
4.3	Proliferationsanalysen . . . . .	64
4.3.1	Monoklonale Antikörper . . . . .	64
4.3.2	MIF-Inhibitor . . . . .	67
4.3.3	Rekombinanter MIF . . . . .	69
4.4	Zelldichte . . . . .	72
4.5	AKT-Aktivierung . . . . .	76
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
5.1	MIF als Angiogenesefaktor . . . . .	79
5.2	MIF als Wachstumsfaktor . . . . .	81
5.3	Modell der MIF-Wirkung in Tumoren . . . . .	85
5.4	MIF Blockierung als Therapieoption bei Tumoren . . . . .	86
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>A</b>	<b>Materialien</b>	<b>105</b>
A.1	Lösungen . . . . .	105
A.2	Chemikalien und Einwegartikel . . . . .	107

<b>B Abkürzungen und Einheiten</b>	<b>108</b>
B.1 Abkürzungen . . . . .	108
B.2 Einheiten . . . . .	110
<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>113</b>
<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>117</b>
<b>Danksagung</b>	<b>119</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>121</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

## 1.1 Der Makrophagen Migrations-Inhibitions-Faktor

### 1.1.1 Überblick über die Geschichte der MIF-Erforschung

Die erste Beschreibung des Makrophagen Migrations-Inhibitions-Faktors [MIF] erfolgte 1962 über seine Eigenschaft, die ungerichtete Migration von Peritonealmakrophagen zu inhibieren [43]. Zu diesem Zeitpunkt war man weit davon entfernt, das Protein identifizieren und molekularbiologisch charakterisieren zu können. Weitere Arbeiten folgten 1966, die diese „MIF-Aktivität“ mit einem von Lymphozyten produzierten Faktor in Verbindung brachten [22, 51]. Alle drei Arbeiten untersuchten zu diesem Zeitpunkt Zellkultursysteme, die die Vorgänge bei der Immunreaktion vom verzögerten Typ („Delayed Type Hypersensitivity Reaction [DTH]“) zu simulieren versuchten. Dieser neu entdeckte Botenstoff zwischen Zellen war somit de facto das erste beschriebene Zytokin - obwohl zu diesem Zeitpunkt der Begriff „Zytokin“ noch nicht geprägt war.

In den folgenden Jahren wurde in verschiedensten Zellsystemen eine „MIF-Aktivität“ beschrieben. In den 80er Jahren wurde dann mit den von T-Zellen produzierten Zytokinen IFN-gamma und Interleukin-4 ebenfalls eine MIF-Aktivität nachgewiesen [77, 114]. Somit erschien es für kurze Zeit, dass die Versuchsergebnisse aus den 60er Jahren auf diese Zytokine zurückzuführen und die Suche nach einer weiteren MIF-Aktivität nicht weiter aussichtsreich sei. Kurze Zeit später gelang allerdings der Gruppe von John David die Klonierung der Gensequenz des heute als MIF bekannten Proteins aus einer humanen T-Zelllinie [117]. Eine Gruppe am Picower Institut in New York klonierte erfolgreich die murine cDNA für MIF und stellte kurze Zeit später auch das rekombinante Protein und spezifische Antikörpern her [20]. Nun konnte der Nachweis erbracht werden, dass die initial beschriebene MIF-Aktivität wirklich mit dem danach benannten MIF-Protein in direktem Zusammenhang steht [18].

### 1.1.2 Eigenschaften des Proteins MIF

Die Klonierung der cDNA für humanes MIF ergab, dass es sich um ein 115 Aminosäuren langes Peptid mit einer mRNA-Größe von ungefähr 800 Basenpaaren handelt [117]. Das MIF-Gen findet sich beim Menschen auf dem Chromosom 22 (22q11.2) in Nachbarschaft von den Genen für Matrix-Metallo-Proteinase 11 und Gluthathion S-Transferase [24]. Ausserdem findet sich auf dem gleichen Chromosomenarm das Gen für die D-Dopachrome Tautomerase, die eine große Strukturähnlichkeit mit MIF aufweist [38]. Das humane MIF-Gen selbst besteht aus drei Exonen (107, 172 und 66 Basenpaare) und zwei Intronen (188 und 94 Basenpaare) [91]. Im Promoterbereich des Gens finden sich unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Ap1, NF-kappaB und CREB [29].

Das murine MIF-Gen lässt sich auf dem Chromosom 10 lokalisieren und hat fast 100% Homologie zum Ratten-MIF; darüber hinaus gibt es aber auch noch 9 weitere - sogenannte - Pseudogene auf dem gleichen Chromosom, die aber keine funktionsfähige mRNA liefern [79]. Die Genstruktur ist zwischen Mensch und Maus sehr ähnlich, mit einer gleichen Anzahl von Exonen und Intronen und gleichartigen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der Promoterregion. Insgesamt zeigt sich eine Homologie beider Gene von etwa 70% bei einer Proteinsequenzhomologie von nahezu 90% [20].

Das MIF-Protein hat eine Größe von 12,5 kDa im SDS-Page-Western Blot und zeigt keine weitere posttranslationale Modifikation in Immunzellen [117]. Dahingegen wurden sowohl in der Leber als auch im Gehirn verschiedene Isoformen gefunden [44, 74]. Dem Primärtranskript fehlt eine Signalsequenz für das endoplasmatische Retikulum, so dass davon ausgegangen wird, dass MIF auf einem nicht-klassischen Wege gespeichert und sezerniert wird [40]. Der klassische MIF, der von Immunzellen oder Epithelzellen produziert wird, ist ein Homotrimer, der in der Strukturanalyse eine sogenannte „Barrel“-Struktur zeigt [111]. In der dreidimensionalen Struktur besteht eine große Homologie zu der humanen D-Dopachrome Tautomerase [110]. In Bezug auf die Proteinstruktur finden sich verwandte Enzyme in Vögeln, Fischen, Würmern, Bakterien und sogar Pflanzen [49, 92, 104, 122]. Die hohe Konservierung

dieses Enzyms ist ein Hinweis auf die zentrale Rolle, die MIF in der Funktion von Zellen spielen kann.

Die erste Beschreibung einer Enzymaktivität von MIF erfolgte 1996 bei einer Studie zu D-Dopachrome Tautomerasen [102]. Neben diesem unphysiologischen Substrat wurden weitere physiologische Substrate der Enzymaktivität von MIF gefunden. Von diesen scheinen Hydroxypyruvatsäure und deren Derivate zwar an MIF zu binden und umgesetzt zu werden, allerdings legt eine hohe Michaeliskonstante für diese Reaktion ebenfalls eine unphysiologische Wirkung nahe [101]. In Bezug auf die Relevanz dieser enzymatischen Aktivität des MIFs für seine biologische Funktion wurden viele kontroverse Ergebnisse publiziert [16, 58, 112]. Diese verwirrenden Resultate legen aber doch nahe, dass der N-terminale katalytische Bereich des MIFs eine zentrale Rolle in der biologischen Wirkung spielen muss - sei es nun über eine enzymatische Reaktion oder über eine konservierte Bindungsstelle an einen putativen Rezeptor. Die Entwicklung eines chemischen Inhibitors der enzymatischen D-Dopachrome-Tautomerase-Reaktion zeigte nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* eine reduzierte biologische Aktivität von MIF [5, 72] - allerdings ist weiter ungeklärt, ob diese Inhibition über einen Block der Enzymaktivität, Maskierung potentieller Rezeptorbindungsstellen oder Konformationsänderungen erreicht wird.

Eine große Wissenslücke in der MIF-Forschung ist bis heute die Frage nach dem wesentlichen Rezeptor für MIF. Nachdem in den 90er Jahren eine Bindungsaffinität des MIFs an eine Unterfraktion des Albumins - das so genannte Sarcolectin - beschrieben wurde, wurde lange Zeit ergebnislos nach einem Rezeptor geforscht. Die Bindung an Sarcolectin wurde nur auf der chemischen Ebene untersucht, ohne eine Korrelation mit der biologischen Funktion zu testen [126, 127].

Im Jahr 2000 wurde ein intrazellulärer Bindungspartner - Jab-1 - beschrieben und mit einer bis zu diesem Zeitpunkt ungewöhnlichen Eigenschaft, der Wachstumshemmung durch MIF, in Zusammenhang gebracht. Es wurde gezeigt, dass extrazellulärer MIF von Zellen aufgenommen werden kann um dann über eine Bindung an Jab-1 dessen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 und somit die Proliferation zu hemmen [57].

Der erste Report über einen Zellmembranrezeptor erfolgte 2003. Es wurde gezeigt, dass MIF an das Membranmolekül CD74 - auch bekannt als MHC II-assoziierte invariante Kette - bindet, und über die Interaktion mit diesem Protein eine Signaltransduktionskaskade aktiviert wird [69]. Allerdings konnten die Autoren nicht ausschliessen, dass CD74 „nur“ als Interim-Bindungspartner fungiert und nicht direkt die Signalkaskade startet, da an CD74 gebundener MIF schnell von den Zellen internalisiert wird. Das CD74-Molekül wird nicht nur von Immunzellen, sondern auch von vielen anderen Zellen, inklusive verschiedenen Tumorzelllinien, exprimiert [87].

Die bisher bekannte intrazelluläre Signaltransduktion von MIF erfolgt über drei verschiedene Wege. Als klassische Proteinkinase-Kaskaden sind der Erk1/2 MAPK- und der PI3/Akt-Weg zu finden. Während die Signaltransduktion über die Erk1/2 Kinase in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden konnte [3, 42, 69, 81, 89], ist der PI3/Akt-Weg bisher nur in humanen dermalen, mikrovaskulären Endothel-Zellen [HMVECS] beschrieben worden [3]. Als so genannter „second messenger“-Weg ist die Calcium-Freisetzung durch MIF zu nennen [119]. Dies wurde allerdings nur in peritubulären Zellen des Hodens untersucht, so dass über die physiologische Relevanz dieses Signalweges in anderen Gewebe noch Unklarheit herrscht.

### 1.1.3 Funktion von MIF im Immunsystem

Die ersten Beschreibungen von MIF erfolgten 1965 bei der Analyse der Mechanismen der verzögerten Hypersensitivitätsreaktion (Delayed Type Hypersensitivity [DTH]). Hier konnte gezeigt werden, dass von aktivierten Lymphozyten ein Faktor produziert wird, der die ungerichtete Migration von Makrophagen hemmt [22, 51, 43]. Einige Jahre später konnte auch nachgewiesen werden, dass durch diesen bis dahin molekular unbekanntem Faktor auch die Aktivität der Makrophagen gegenüber Bakterien verstärkt werden kann [84]. Fast dreißig Jahre später wurden diese beiden Untersuchungen auf molekularer Ebene und die Produktion von MIF durch T-Lymphozyten bestätigt [10, 18]. Abweichend von diesem „klaren“ Modell einer Sekretionszelle und einer Zielzelle ist heutzutage in vielen Immunzellen MIF nachgewiesen worden: Makrophagen [26], Granulozyten und B-Zellen [73]. Im Gegenzug sind auch neben den



Makrophagen weitere Zielzellen gefunden worden. So wirkt MIF in einem autokrinen Mechanismus auf die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen [10]. In neutrophilen Granulozyten wird die Zytotoxizität erhöht und die Apoptoserate gesenkt [13].

Die Expression von MIF in Immunzellen wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Am besten untersucht ist die Induktion von MIF durch Lipopolysaccharid [LPS], einem Zellwandbestandteil von gramnegativen Bakterien. In Makrophagen und T-Zellen - aber auch in vielen anderen Körpergeweben - lässt sich durch LPS eine deutliche Induktion von mRNA und Protein erzielen [10, 9, 26]. Für die Bestandteile von grampositiven Bakterien wurden ähnliche Effekte gezeigt [30]. Auch verschiedene proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha und Interferon-gamma erzeugen eine MIF-Induktion in Makrophagen [26]. Auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheint die Induktion von MIF durch Glukokortikoide [25]. Zusammen mit der MIF-Expression in der Hypophyse scheint dieses Zusammenspiel zwischen MIF und Glukokortikoiden eine hormonelle Regulationsinstanz im Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalen zu sein [27].

Die Wirkungen von MIF im Immunsystem sind vielfältiger Art. Als Überbegriff zeichnen sie sich durch einen stark entzündungsverstärkenden Charakter aus. Durch MIF werden die Expression und Produktion von diversen anderen Zytokinen (TNF-alpha, Interleukine, Interferon gamma), Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid gesteuert [20, 25, 81]. Als Antagonist zu Glukokortikoiden wird durch MIF die vermehrte Bildung von  $\kappa$ B verhindert und somit die Zytokinproduktion über NF- $\kappa$ B gefördert [32]. Weiterhin wird die Zellproliferation von Immunzellen gefördert und die Apoptose inhibiert [10, 13]. Darüberhinaus wird durch MIF auch die Expression verschiedener Proteine in Immunzellen reguliert; so findet sich eine Induktion der mRNA für Matrix-Metallo-Proteinase [MMP] [89] und eine Regulation des Toll-like-Rezeptors 4 [100]. Gerade die Regulation des letztgenannten Proteins legt eine Rolle für MIF im Bezug auf die angeborene Immunität als Abwehr von eingedrungenen Pathogenen nahe [29].

Die Relevanz von MIF für das Immunsystem wurde zuerst am Modell der Sepsis in Mäusen studiert [19]. Es konnte hier gezeigt werden, dass MIF zwar im Ge-

gensatz zu Interleukin-1 oder TNF-alpha selbst keine Sepsis auslösen, aber eine bereits bestehende Sepsis verstärken kann. Mit Hilfe von neutralisierenden MIF-Antikörpern konnte die Endotoxin-vermittelte Letalität in Mäusen deutlich reduziert werden [28]. Bei bakteriellen Infektion werden durch MIF die Fähigkeiten von Makrophagen zur Endozytose und zur Abtötung von aufgenommenen Bakterien verstärkt [52, 88]. Die Studien mit den bisher generierten MIF-Knockout Mäusen zeigen widersprüchliche Ergebnisse: Bozza et al. fanden eine reduzierte Letalität im septischen Schock, während Honma et al. keine verminderte Letalität in LPS-behandelten MIF-defizienten Mäusen feststellen konnten [23, 45]. Bei Infektionen mit Salmonellen zeigte sich in den knock-out-Mäusen von Bozza et al., dass MIF ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche Bekämpfung intrazellulärer Bakterien sein kann [60]. Auch in viralen Infektionsmodellen konnte eine MIF-Induktion nachgewiesen werden, wobei bisher jedoch noch keine Korrelation zur biologischen Funktion hergestellt wurde [5, 7]. Auch bei der Infektion durch Würmer und andere Parasiten scheint MIF eine zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion und der Klärung der Infektion zu spielen [76, 105].

Neben den Funktionen von MIF in der Abwehr von Mikroorganismen findet sich eine Expression und Funktion von MIF in anderen entzündlichen Prozessen. Als erste wurden hier die akute Respiratorische Insuffizienz (Acute respiratory distress syndrom [ARDS]) und die Glomerulonephritis beschrieben [36, 64, 124]. Auch in autoimmunologisch bedingten Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und ulzerativer Colitis zeigte sich eine vermehrte MIF-Produktion [66, 83]. Die wichtige Funktion von MIF in diesen beiden Erkrankungen wurde in Blockadeversuchen im Tiermodell bestätigt [33, 67]. Bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis fand sich darüberhinaus eine klinische Korrelation des Schweregrades der Erkrankung mit verschiedenen Allelen der MIF-Promoterregion [12, 35].

#### **1.1.4 Expression und Funktion von MIF in Tumoren**

Die erste Beschreibung von MIF in Tumoren erfolgte 1996 bei einer Studie bei Prostataadenometastasen [78]. Es wurde hier gezeigt, dass das metastatische Gewe-

be eine höhere mRNA für MIF aufweist als gesundes Prostatagewebe. Mittlerweile ist für eine Vielzahl von Tumortypen eine erhöhte MIF-Expression nachgewiesen worden. Dies betraf Tumoren aus allen drei embryonalen Keimblättern: endodermal (Kolonkarzinom [68], Hepatocelluläres Karzinom [98]), mesenchymal (Lymphom [63]) und ektodermal (Neuroblastoma [21], Melanom [107]). Des Weiteren ist in fast allen untersuchten Zelllinien eine Expression von MIF nachgewiesen worden. In einigen Tumoren konnte sogar eine positive Korrelation zwischen der MIF-Expression und der klinischen Malignität der Tumoren hergestellt werden [53, 68, 121].

Die Expression von MIF in Tumoren wird durch verschiedene Einflüsse gesteuert. Als wichtigster Faktor ist die Induktion der MIF mRNA durch Wachstumsfaktoren zu nennen. Dieses wurde zunächst für PDGF, FGF und Serum in einer Fibroblastenzelllinie beschrieben. Hier zeigte sich eine Expressionssteigerung eines zu MIF homologen Gens innerhalb der verzögerten frühen Genantwort auf Wachstumssignale [65]. Gleiches konnte auch in einer Kolonkarzinomlinie durch Stimulation mit TGF-beta, PDGF und b-FGF beschrieben werden [113]. Die Sekretion von MIF aus Zellen wird ebenfalls durch Wachstumsstimuli kontrolliert; so führte einerseits die Zugabe von Serum zum Kulturmedium und andererseits die Adhäsion an eine Unterlage zu einer MIF-Sekretion [71, 81].

Die Produktion von MIF wirkt wahrscheinlich in einer autokrinen Weise auf die Genexpression in der Zelle zurück. Durch Zugabe von rekombinantem MIF lässt sich in Tumorzellen die Expression von Matrix-Metallo-Proteinasen steigern, welches zur gesteigerten Tumorinvasivität beitragen könnte [70]. Weiterhin finden sich eine Induktion von VEGF und Interleukin-8 - zwei wichtigen Angiogenesefaktoren - in Hepatoma-Zelllinien durch MIF [98]. In Neuroblastomzellen wurde außerdem eine Induktion eines klassischen wachstumsassoziierten Transkriptionsfaktors, N-myc, durch Zugabe von MIF beschrieben [97].

Nach der Identifikation von MIF als Wachstumsfaktor für T-Zellen *in vitro*, wurde auch erstmals 1998 eine Rolle für MIF in der Proliferation von Tumoren beschrieben [113]. Durch eine stabile MIF-Antisense-Transfektion wurde in murinen Kolonkarzinomzellen das MIF-Protein negativ reguliert und dadurch eine 30%ige

Wachstumsreduktion erzielt. Ähnliche Versuche wurden auch erfolgreich mit Melanomzellen durchgeführt [107]. Durch Verwendung eines neutralisierenden anti-MIF-Antikörpers konnte ebenfalls eine deutliche Wachstumsreduktion in verschiedenen Zelllinien *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [31, 86]. Ein direkter wachstumsstimulierender Effekt für rekombinantes MIF wurde allerdings für Tumorzellen bisher nicht gefunden. In nicht-entarteten Zellen, wie ruhenden Fibroblasten und humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene [HUVECs], lässt sich allerdings durch MIF eine Proliferationssteigerung induzieren [46, 81, 86]. Im experimentellen Modell der MIF-Knockout Maus ließen sich Fibroblasten durch viralen Gentransfer weniger gut zu einer malignen Entartung bringen und zeigten eine reduzierte Wachstumsantwort auf klassische Wachstumsreize wie Serumzugabe und Zelladhärenz [39, 93]. Diese Effekte waren in dem beschriebenen Modell vom Tumorsuppressor-Gen p53 abhängig.

Neben einer wachstumsstimulierenden Rolle für MIF in Zellen wurde 1999 erstmals eine Apoptose-Inhibition entdeckt [46]. Durch die Inaktivierung von p53 durch MIF in Fibroblasten und Makrophagen führten apoptoseinduzierende Agenzien zu einem reduzierten Zelltod. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen erzielt [3, 13]. Es wurde gezeigt, dass der MIF-Effekt in Endothelzellen von einer Aktivierung des PI3/Akt-Signalweges vermittelt wird [3].

Ein anderer Effekt von MIF bezieht sich auf die immunologische Attacke von Tumorzellen: Nachdem zuerst 1998 gezeigt wurde, dass MIF die Aktivität von NK-Zellen im Auge hemmen kann, wurde diese Inhibition auch für die NK-Zell-vermittelte Lyse von Melanomzellen gefunden [4, 99]. Ungewöhnlich an diesen Beobachtungen ist die Diskrepanz zu den sonst beschriebenen immunstimulatorischen Eigenschaften von MIF. Eine weitere Beobachtung, die im Gegensatz zu bisher beschriebenen Eigenschaften des MIFs steht, ist die migrationsfördernde Wirkung auf manche Tumorzellen. So wurde in Hepatom- und Melanomzellen eine gesteigerte Migration durch MIF ausgelöst, was im Hinblick auf eine verstärkte Metastasenbildung interpretiert wurde [98, 107].

Im ersten Bericht über einen Einfluss von MIF auf das Tumorwachs-

tum wurde gezeigt, dass nicht die Tumorzellen, sondern die Endothelzell-Proliferation das eigentliche Ereignis der Tumorprogressionshemmung durch anti-MIF-Antikörper ist [31]. MIF ist mittlerweile als Wachstumsfaktor für endotheliale Zellen wie HUVECs und HEMVECs etabliert [3, 107]. Dabei ist auffällig, dass MIF nicht nur einen direkt proliferativen Effekt hat, sondern auch als Mediator der VEGF-induzierten Proliferation wirkt [86]. Die Wirkung von MIF beschränkt sich aber nicht nur auf das Wachstum von Endothelzellen, sondern induziert auch die Migration und Ausdifferenzierung zu reifen Blutgefäßen *in vitro* und *in vivo* [3].

## 1.2 Der Gehirntumor:

### Glioblastoma multiforme

#### 1.2.1 Molekulare Pathologie der Glioblastome

Der Gehirntumor größter Malignität - das Glioblastoma multiforme - ist zugleich auch der häufigste aller primären Hirntumoren. Er gehört histologisch zu den Astrozytomen, die nach der WHO-Klassifikation in vier Grade eingeteilt werden [50]. Die Grade I und II stehen für niedrig maligne Gliome, während der Grad III dem anaplastischen Astrozytom und Grad IV dem Glioblastom entspricht [59]. Das Glioblastom stellt mit 22,6 % aller Hirntumore den häufigsten von Hirngewebe ausgehenden Tumor. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 62 Jahren [118].

Der Name Glioblastoma multiforme für die Glioblastome erklärt sich aus dem „bunten“ Bild, welches die Glioblastome in der Histologie zeigen. So finden sich nebeneinander mehrkernige Tumorriesenellen, kleinzellige Anteile, glomerulusähnliche Endothelzellproliferate und zahlreiche Nekrosen sowie fokale Einblutungen. Der Nachweis von Gefäßproliferationen und Nekrosen wird auch in der pathologischen Diagnosestellung gefordert. Der Tumor wächst diffus infiltrierend in das umliegende Gewebe ein und bildet somit keine scharf begrenzte Raumforderung. Darüber hinaus findet sich ein ausgeprägtes perifokales Tumorödem. Der Hauptlokalisationsort im

Gehirn sind die Großhirnhemisphären und das Marklager. In seltenen Fällen kann der Tumor auch multifokal auftreten [120].

Auf molekulargenetischer Ebene finden sich Mutationen, Deletionen und Amplifikationen in vielen Genen, die Proliferation und Progression beeinflussen [56]. Mutationen lassen sich vornehmlich in zwei Tumorsuppressor-Genen nachweisen: Zum einen finden sich (wie in vielen anderen Tumoren auch) Mutationen im p53-Gen, welches quasi als Genomwächter über die Integrität der Gene wacht und bei Schäden einen Zellzyklusarrest auslöst [90]. Zum anderen finden sich Alterationen im Gen für die „Phosphatase and tensin homolog-mutated in multiple advanced cancers“ [PTEN], welches für die Apoptoseregulation und Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren wichtig ist [123]. Deletionen finden sich auf den Chromosomen 10, 17 und 19, woraus ein Verlust der Heterogenität für Proteine auf diesen Chromosomenteilen resultiert („loss of heterozygosity“) [14]. Als sehr häufige Amplifikation findet sich das Gen für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor [EGFR] und in etwas geringerer Zahl der Rezeptor für den Plättchen-abhängigen Wachstumsfaktor [PDGFR].

Ein wichtiger Aspekt in der Pathogenese der Glioblastome ist die ausreichende Blutversorgung des schnell wachsenden Tumorgewebes. Ein zentraler Faktor der Angiogenese in Glioblastomen ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor [VEGF]. Dieser Faktor wird in nahezu allen Glioblastomen überexprimiert und durch hypoxische Reize reguliert [17, 108, 109]. Neben VEGF sind weitere Angiogenesefaktoren wie der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor [bFGF], PDGF und Angiogenin beschrieben worden, die zum Teil aber nur über eine Induktion von VEGF wirken [37, 115].

Bei den Glioblastomen wird zwischen primären und sekundären Tumoren unterschieden. Die primären Glioblastome treten - wie der Name nahe legt - de novo auf und haben keinen nachweislichen Vorgängertumor. Die sekundären Glioblastome treten als maligne Progression bei vorhergegangenem Astrozytom auf. Sie treten im Gegensatz zu den primären Glioblastomen in jüngerem Alter auf. Es hat sich gezeigt, dass die Strahlentherapie zu einem geringen Prozentsatz an der malignen Progres-

sion eines Astrozytoms beteiligt sein kann. Außerdem finden sich bei primären und sekundären Glioblastomen unterschiedliche Sequenzen der genetischen Veränderungen. So sind in primären Tumoren häufiger Veränderungen in den Genen für PTEN und EGFR und in sekundären häufiger für p53 und PDGFR nachweisbar [56].

### 1.2.2 Klinische Merkmale und Therapieoptionen der Glioblastome

Die Symptomkonstellation des Glioblastoms bei Diagnosestellung ergibt sich zum einen aus der Lokalisation des Tumors und zum anderen durch den gesteigerten Hirndruck infolge der Raumforderung des Tumorgewebes. Die Hauptlokalisierung des Glioblastoms findet sich in den Marklagerräumen der Großhirnhemisphären; demzufolge können sich als direkte Tumorsymptome Ausfälle im Bereich der Sprache, der Motorik und der Sensorik, so genannte fokale neurologische Ausfälle, sowie Persönlichkeitsveränderungen finden. Bei einem Teil der Patienten kommt es des Weiteren zu erstmals auftretenden epileptischen Krampfanfällen.

Der gesteigerte Hirndruck führt als Erstsymptom oft zu Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen. Im weiteren Verlauf folgen Konzentrationschwierigkeiten, Bewusstseinsstörungen und schließlich die Symptome der Hirnstammeinklemmung, die über einen Atemstillstand auch zum Tode führen können. Daneben finden sich auch die allgemeinen Symptome eines Tumorleidens wie Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Müdigkeit [118, 120].

Die Diagnose eines Glioblastoms erfolgt nach sorgfältiger Anamnese und körperlicher Untersuchung über bildgebende Verfahren. Sowohl das Computertomogramm [CT] als auch das Magnetresonanztomogramm [MRT] sind die bildgebenden Verfahren der Wahl. Es findet sich eine schlecht demarkierte Raumforderung, die von einem großen vasogenen Ödem umgeben ist. In der CT-Kontrastmittelsequenz findet sich eine irreguläre ringförmige Anreicherung, die durch zentrale Nekrosen und Zystenformationen bedingt ist. Die Sicherung der Diagnose erfolgt über die pathologische Untersuchung des Operationspräparates oder einer stereotaktisch gewonnenen Biopsie.

Das Glioblastoma multiforme ist bis heute eine unheilbare Krankheit mit einer

mittleren Überlebensdauer von etwa neun Monaten nach Diagnosestellung. Somit kommt der Therapie im allgemeinen nur eine adjuvante, das heißt symptommildernde Funktion zu. Eine primäre Operation des Tumors ist nicht nur zur Diagnose-sicherung, sondern auch zur Volumenminderung des Tumors indiziert. Allerdings hat eine Operation keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Dagegen kann die Strahlentherapie das Überleben der Patienten im Schnitt um ca. drei Monate verlängern. Die momentan untersuchten Chemotherapieprotokolle haben ebenfalls keine nennenswerten Auswirkungen auf das Überleben der Patienten. Einen entscheidenden Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten hat die Gabe von Cortison zur Ödemreduktion und die Gabe von Antikonvulsiva bei neu aufgetretenen epileptischen Krampfanfällen. Die medikamentöse Therapie sollte durch intensive Physiotherapie und sozialpsychologische Unterstützung unter Einbeziehung der Angehörigen komplettiert werden [14]. Neuere Therapieformen - insbesondere gentechnischer Art - konnten noch keine Erfolge bei Glioblastomen zeigen [96]. Eine verbesserte Kenntnis der Biologie dieser Tumoren und Fortschritte in der Genvektortechnologie lassen aber diesen Ansatz in der Zukunft als mögliche Option offen [54].

### **1.3 MIF und Glioblastome:**

#### **Ausgangsbefunde und Formulierung der Arbeitshypothese**

Schon 1998 wurde erstmals eine Expression von MIF-mRNA und MIF-Protein im Rattengehirn beschrieben [8]. Hier zeigte sich eine deutliche positive Färbung in der Immunhistochemie in Neuronen. Ausgehend hiervon wurden nachfolgend auch Gewebeschnitte menschlicher Glioblastome in der Immunhistochemie untersucht. Zur Überraschenderweise fand man nun auch in den Tumorzellen - die glialen Ursprungs sind - hohe Mengen an MIF (Abb. 1.1). Gerade in der Nähe von Blutgefäßen und an der Grenze zu nekrotischen Tumoranteilen fanden sich stark MIF-exprimierende Zellen. Zeitgleich wurde die erste Studie zu MIF als eines möglichen Angiogenesefaktors in Tumoren veröffentlicht [31].



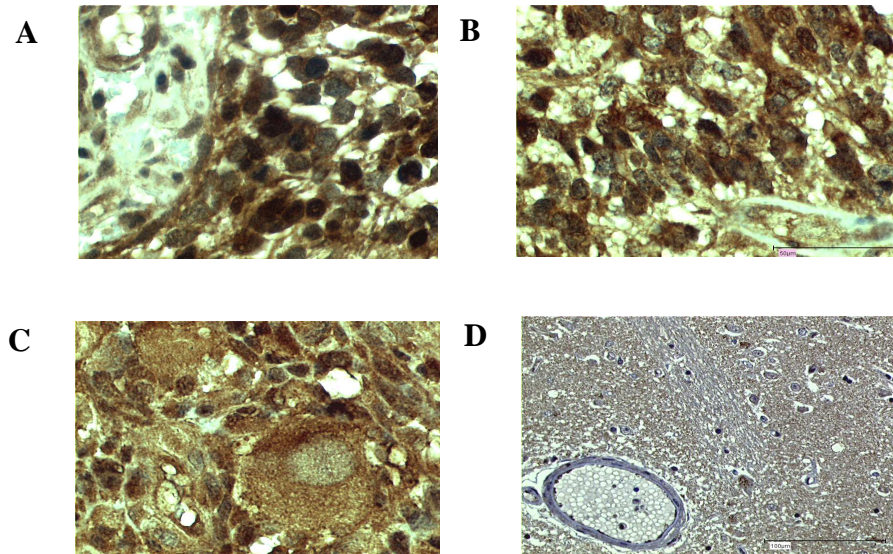


Abbildung 1.1: MIF Immunohistochemie (braun). A-C Glioblastomgewebeschnitte, D normales Hirngewebe.

Diese Befunde bildeten die Grundlage zur Formulierung der folgenden zwei Arbeitshypothesen dieser Doktorarbeit:

1. MIF fungiert in Glioblastomen als Angiogenesefaktor
2. MIF ist ein direkter Wachstumsfaktor für die Glioblastomzellen

Als Modell für die Experimente wurden zwei verschiedene Glioblastomzelllinien humanen Ursprungs ausgewählt, um *in vitro* die Expression und Funktion von MIF in diesen Tumoren zu untersuchen. Um der These von MIF als Angiogenesefaktor nachzugehen, sollten in der Zellkultur Bedingungen simuliert werden, die klassischen Angiogenesestimulationsreizen *in vivo* ähneln. So sollten die Zellen bei reduziertem Sauerstoffgehalt (Hypoxie) und bei reduziertem Glukosegehalt (Hypoglykämie) kultiviert und der Einfluss auf die MIF-Expression und Sekretion analysiert werden.

Um die Frage nach einem direkten proliferativen Effekt von MIF auf die Tu-

moren zu untersuchen, sollten auf verschiedene Weise die MIF-Proteinmengen in den Zellkulturen reduziert werden. Hierzu sollten neben dem Einsatz von neutralisierenden Anti-MIF-Antikörpern auch gentechnisch veränderte Zellklone mit einem MIF-Antisense-Konstrukt generiert werden. Der Einfluss auf die Proliferation sollte in zwei verschiedenen Wachstumsassays studiert werden: Zum einen im BrdU-Inkorporationassay als Maß für die DNA-Syntheseleistung (Kurzzeitwachstum) und zum anderen im Amidoblack-Assay als Färbung der Gesamtproteinmenge in der Zellkultur (Langzeitwachstum).

## **Kapitel 2**

### **Material und Methoden**

### **Basistechniken**

## 2.1 Zellkultur

### 2.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden zwei humane Glioblastomzelllinien und eine humane primäre Fibroblastenkultur verwendet. Die Glioblastomzellkulturen sind mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Schlegel (ehemals Institut für Pathologie Abteilung Neuropathologie, Universität Marburg) überlassen worden. Die primären Fibroblasten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Heiske (Institut für Virologie, Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

Die beiden Glioblastomzelllinien sind in Lausanne, Schweiz, vor mehr als 20 Jahren etabliert worden. Beide Zelllinien sind aus Primärkulturen von Operationspräparaten generiert worden. Bei den resezierten Tumoren handelte es sich um Glioblastome mit der pathologischen Einstufung Astrocytoma Grad IV. Bei der LN18 Linie handelt es sich um einen 65-jährigen männlichen Patienten, bei LN-229 um eine 60-jährige weibliche Patientin [48, 34].

Die humanen Fibroblasten wurden als Primärkultur im Institut für Virologie, Universität Marburg, aus männlichen Vorhautgewebestücken eines jungen Patienten angelegt. Diese Zellen wurden als normale, also nicht-entartete Kontrollzellen eingesetzt. Es sollte hierbei die Frage untersucht werden, ob es sich bei den beschriebenen Phänomenen um Tumorcharakteristika oder um physiologische Reaktionen der Zellkulturen handelte. Wenn nicht in den Experimentbeschreibungen anderweitig angegeben, wurden Zellen der Passagen 15-22 für die Experimente benutzt.

### 2.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden in Inkubatoren (Heraeus, Hanau) bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> wasserdampfgesättigter-Atmosphäre kultiviert. Als Standardmedium wurde Dubecos Modified Eagle Medium [DMEM] (Gibco, Paisley, GB) mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz, A) und 1% L-Glutamat (Gibco, Paisley, GB) verwendet. Als weiterer Zusatz wurde hitzeinaktiviertes (30 min, 65°C) fötales Kälberserum [FCS] (Seromed, Berlin) hinzugefügt; wobei die Glioblastomzellen standardmäßig

mit 5% und die Fibroblasten mit 10% FCS-Zusatz kultiviert wurden. Die Zusätze wurden jeweils frisch aufgetaut, und das frisch angesetzte Medium wurde maximal 14 Tage bei 4°C aufbewahrt. Bei manchen Experimenten wurde die Serumkonzentration des Mediums variiert. Als Standardkulturgefäße wurden die Zellkulturflaschen der Firma Costar eingesetzt (Anhang A). Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen und sterilen Einmal-Arbeitsmaterialien durchgeführt.

### 2.1.3 Passagierung

In der Standardzellkultur wurden die Zellen zweimal pro Woche subkultiviert und dabei zwei- bis vierfach aufgesplittet. Das Ziel hierbei war eine ungefähr konstante semikonfluente Zelldichte.

Als erster Schritt wurde das Zellkulturmedium abgegossen und die Zellen mit angewärmten Phosphate Buffered Saline [PBS] w/o Mg,Ca (Gibco, Paisley, GB) gewaschen. Anschließend wurde zu den Kulturen vorgewärmtes (37°C) Trypsin/EDTA (Gibco, Paisley, GB) zugegeben und die Zellen für einige Minuten im Brutschrank zwischeninkubiert. Die Inkubation wurde so lange fortgesetzt, bis unter dem Mikroskop ein Abkugeln und Ablösen der Zellen sichtbar wurde. Nun wurden die Zellen mit Kulturmedium aus der Flasche gewaschen und in einem 50 ml Falconröhrchen (B&D, Franklin Lanes, USA) gesammelt. Diese Zellsuspension wurde in einer Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) für 6 min bei 200xg\* (800 U/min) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand im Falconröhrchen wurde abgegossen und das so gewonnene Zellpellet in frischem, warmen Kulturmedium resuspendiert und in die mit Medium vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt. Die Fibroblastenkulturen wurden mit Passagennummerierung geführt; bei den Glioblastomzellen wurde keine Passagennummer geführt, da sie bereits ohne Nummer übernommen wurden. Allerdings wurde bei den Experimenten darauf geachtet, für die einzelnen Versuchsreihen möglichst Zellen einer Subkultivierungsstufe zu verwenden.

Falls eine genaue Einstellung der Zellzahl für die Experimente erforderlich war, wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden 100

$\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung angefertigt und davon einige Mikroliter in die vorbereitete Zählkammer gegeben. Anschließend wurden in vier Feldern die lebenden Zellen ausgezählt, der Mittelwert davon gebildet und dann mit dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor (10000) multipliziert, um auf die Zellzahl/ml zu gelangen.

Für die unterschiedlichen Kulturflaschen wurden folgende Mengen Medium und Arbeitslösungen eingesetzt:

96-well Platte	200 $\mu\text{l}$
12-well Platte	1 ml
6-well Platte	2 ml
10er Petrischale	10 ml
kl. Flasche	7 ml
mit. Flasche	20ml
gr. Flasche	50 ml

#### 2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Möglichkeit, Zellen in flüssigem Stickstoff für längere Zeiträume einzufrieren, wurde dazu genutzt, einzelne Experimente mit gleichen Zellpassagen wiederholen zu können; gleichzeitig war so auch die Sicherheit gegeben, jederzeit auf genügend Zellen zurückgreifen zu können, was gerade im Hinblick auf die Klonierung der MIF-Antisense-exprimierenden Zellen sehr wichtig war.

Zum Einfrieren der Zellen, wurde eine Zellsuspension durch Trypsinierung der Zellkultur, wie unter Passagierung (s.o.) beschrieben, gewonnen. Das nach Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde dann in vollem Serum (FCS) mit einem 5% DMSO-Zusatz resuspendiert. Jeweils 1ml dieser Zellsuspension wurde dann in ein Einfrierröhrchen überführt. Der Einfrierprozeß lief in zwei Stufen ab; zuerst wurden die Zellen in einem speziellen Einfrierbehältnis (Stratacooler, Stratagen, La Jolla, USA ) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht aufbewahrt. Die Einfrierbox garantierte dabei ein kon-

stantes, langsames Absinken der Temperatur beim Einfrieren. Anschließend wurden die Zellen bei  $-180^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei dieser Temperatur können die Zellen ohne Einfluß auf ihre Überlebensfähigkeit für Jahre aufbewahrt werden.

### 2.1.5 Mycoplasmentest

Ein stetiges Problem der Zellkultur ist die Infektion der Zellen mit Mycoplasmen. Da diese Infektion weder zu einer Trübung des Kulturmediums noch zu einer Veränderung der Zellmorphologie führt, ist der sichere Nachweis von Mycoplasmen nur über Antigentest mittels ELISA oder DNA-Detektion mit der Polymerase-Kettenreaktion [PCR] möglich. Im folgenden ist der standardmäßig verwandte Mycoplasmen PCR Primer Set (Stratagene, La Jolla, USA) beschrieben. Die Zellen wurden initial und nach Tetracyclinbehandlung (BM Cyclin, Boehringer, Mannheim) getestet. Von den behandelten, mycoplasmenfreien Zellen wurden mehrere Aliquots eingefroren, so dass alle vier Wochen frische, nicht verseuchte Zellen aufgetaut werden konnten; so entfiel die Notwendigkeit einer wiederholten Testung auf Mycoplasmen.

Als Ausgangsmaterial für den Test wurden aus den Zellkulturen jeweils  $100\ \mu\text{l}$  in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Diese Probe wurde für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend mit  $10\ \mu\text{l}$  StratageneCleanResin versetzt. Nach gutem Durchmischen wurde der Harz abzentrifugiert und der Überstand mit Wasser 1:10 verdünnt.

Die so gewonnene Probe wurde dann in folgendem PCR-Ansatz weiterverarbeitet:

$5,00\ \mu\text{l}$  Pufferlösung,  $1,60\ \mu\text{l}$  dNTPs,  $2,00\ \mu\text{l}$  Primer,  $2,00\ \mu\text{l}$  Internal Control,  $1,00\ \mu\text{l}$  Taq Polymerase (Amplitaq, Roche, Branchburg, USA) +  $10\ \mu\text{l}$  Probe

Ansatz 2: identisch mit Ansatz 1, nur die Internal Control ist durch  $2\ \mu\text{l}$  Wasser ersetzt.

Die DNA wurde dann mit folgendem PCR-Programm in einem PCR-Gerät (Hybaid, Heidelberg) amplifiziert:

Zyklus 1 (1x), 94°C, 5 min; 55°C, 1:45 min

Zyklus 2 (3x), 72°C, 3 min; 94°C, 0:45 min; 55°C, 1:45 min

Zyklus 3 (40x), 72°C, 3 min; 94°C, 0:45 min; 55°C, 0:45 min

Zyklus 4 (1x), 72°C, 10 min

Von der durch die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigten DNA wurden dann 10 µl mit 2 µl eines Probenpuffer (Anhang A) vermischt und in einem 3% Agarosegel bei einer Spannung von 110 Volt über 2 Stunden nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Licht Schirm betrachtet und photographiert. Die Banden wurden anhand des mitlaufenden 100-Basenpaarmarkers (Boehringer, Mannheim) analysiert und mit den charakteristischen Bandenmustern für die einzelnen Mycoplasmensubtypen in der Mycoplasmen Primer KIT-Beschreibung verglichen [Abb. 2.1].

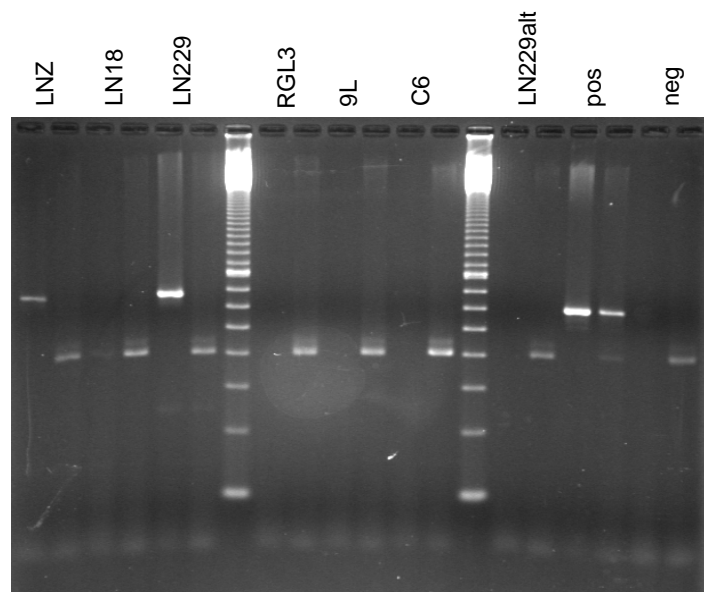


Abbildung 2.1: Mycoplasmentest der Zelllinien



## 2.2 Probenaufbereitung

Für die Auswertung der einzelnen Zellkulturexperimente war eine Aufbereitung der gewonnenen Proben notwendig, um gezielt RNA, intrazelluläre Proteine und Proteine aus den Überständen isolieren zu können. Diese Präparationen wurden später mit den verschiedenen spezifischen Nachweistechniken wie Northern Blot, Western Blot und ELISA weiter analysiert. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anderweitig angegeben, bei Raumtemperatur [RT] durchgeführt. Die aufbereiteten Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und es wurde versucht, ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.

### 2.2.1 RNA-Präparation

Als Standardverfahren zur Isolation von RNA aus der Zellkultur wurde das TRIZOL-Protokoll benutzt. Als erster Schritt wurde hierbei der Zellmonolayer nach Abnahme des Überstandes mit 1 ml TRIZOL-Reagenz (Gibco, Paisley, GB) versetzt. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurden restliche Zelltrümmer mit einem autoklavierten Schaber aus der Kulturschale abgelöst und die Suspension abpipettiert. An dieser Stelle konnte das Protokoll optional unterbrochen werden, indem die Proben nun bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden.

Die eigentliche Extraktion der RNA erfolgte im nächsten Schritt durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Nach gutem Durchmischen und 3 min Inkubation wurde die Probe bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $1200\times g^*$  für 15 min zentrifugiert. Danach wurde die klare Oberphase abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde die RNA über 10 min gefällt und anschließend wieder bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $1200\times g^*$  für 10 min zentrifugiert. Es folgte noch ein Waschschrift mit 75% Ethanol bevor das RNA-Pellet dann bei RT getrocknet wurde.

Als letzter Schritt wurde das gewonnene Pellet in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 10 min gelöst. Die gewonnene RNA Menge wurde mit einem Absorbtionspektrometer (Gilford, Oberlin, USA) gemessen. Dazu wurden 2  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung in 998  $\mu\text{l}$  Wasser verdünnt und die Absorbtion bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Konzentration errechnet sich nun nach folgender Formel:

$$c = A_{260} \times 20 \text{ (in } \mu\text{g}/\mu\text{l) }$$

Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Proteinverunreinigung und Integrität der Nukleinsäure-Probe ziehen. Es wurde im allgemeinen ein Quotient von größer 1,5 als Standard angestrebt.

### 2.2.2 Präparation intrazellulärer Proteine

Um intrazelluläres Protein für die Analyse im Western Blot zu gewinnen, müssen die Zellen lysiert werden. Hierfür wurde eine 1% Triton X 100-Lösung in PBS verwendet. Die Zellen wurden zuerst in eiskaltem PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 1 ml dieser Lösung lysiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und dem Abschaben restlicher Zelltrümmer wurden die so gewonnen Proben für 5 min bei 4°C mit 1200xg\* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und mit Proteinaseinhibitor (Boehringer, Mannheim) versetzt.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein KIT (Pierce, Rockford, USA). Hierzu wurden die Proben 1:5 in PBS verdünnt und jeweils 25  $\mu\text{l}$  in eine 96-well Platte pipettiert und schließlich mit 200  $\mu\text{l}$  der fertigen Arbeitslösung aus dem Kit versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde dann die Absorption der Proben bei 562 nm in einem Microplate Reader (Dynatech, Denzendorf) gemessen. Die Konzentrationen wurden anhand einer mitlaufenden Albumin-Standardkurve errechnet.

### 2.2.3 Aufbereitung der Überstände

Um die Sekretionsaktivität der Zellen zu untersuchen wurden die Überstände der Zellkulturen gewonnen. Initial wurden dazu 2 ml des Überstandes mit Proteinaseinhibitor (Boehringer, Mannheim) versetzt und bei -80°C eingefroren. Für die Auswertung im ELISA wurden die Überstände so direkt eingesetzt; für die Western Blot Analyse mussten die Proben, wie im Folgenden beschrieben, ankonzentriert werden.

Die Vorbereitung der Proben für den Western Blot verlief in zwei Schritten. Zuerst wurde ein 100 kD Filter (Vivascience, Lincoln, GB) eingesetzt, um einen Teil der störenden FCS-Proteine zu entfernen, und anschließend wurde die Probe über

einen 10 kD Filter (Vivasience, Lincoln, GB) ungefähr 20-fach konzentriert. Das MIF-Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 12,5 kD (Monomer) und 36 kD (Trimer) liegt im passenden Bereich um mit diesen Filtern arbeiten zu können. Die Überstände wurden direkt in die Filter gegeben und dann für 1h bei 4°C und zentrifugiert.

Für die Bestimmung des Lactatdehydrogenase[LDH]-Gehaltes der Überstände durften diese nicht eingefroren werden, da die LDH kälteinstabil ist. Die Proben hierfür wurden bei RT aufbewahrt und innerhalb von zwei Tagen ausgewertet.

## 2.3 Northern Blot

Der Northern Blot ist ein sehr spezifisches und semiquantitatives Verfahren zur Analyse der mRNA-Expression in Zellen. Grundlage des Verfahrens ist die Hybridisierung der im Gel aufgetrennten mRNA mit einer sequenzspezifischen RNA- oder DNA-Sonde, die über eine Markierung nachgewiesen kann. Eine Schwierigkeit des Northern Blots liegt in der Empfindlichkeit der RNA gegenüber RNasen. Zur Vermeidung dieses Problems wurden alle Arbeitsschritte nur mit autoklavierten oder anderweitig adäquat gereinigten Arbeitsmaterialien und -lösungen durchgeführt.

### 2.3.1 Sondenherstellung

Die spezifischen Sonden für den Northern Blot wurden mit dem DIG RNA Labelling Kit (Boehringer, Mannheim) hergestellt. Falls nicht anderweitig vermerkt, stammten alle Chemikalien aus diesem Kit. Als Ausgangsmaterial diente die klonierte MIF-Sequenz in dem Plasmidvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Paisley, GB). Es lagen zwei verschiedene Plasmide mit unterschiedlicher Orientierung (sense und antisense) der MIF-Sequenz vor.

Bevor mit der eigentlichen Transkription der Sonde begonnen werden konnte, mußte das Plasmid vorbereitet werden. Zuerst wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI (Boehringer, Mannheim) gemacht. Hierfür wurden 5 µg Plasmid DNA mit 10 U Restriktionsenzym (mit Puffer) für 2h bei 37°C geschnitten. Nach einer Hitzeinaktivierung der Enzyme für 20 min bei 80°C wurde in einem

DNA-Testgel die korrekte und vollständige Linearisierung des Plasmids überprüft. In einem zweiten Schritt wurde mit ProteinaseK (Boehringer, Mannheim) restliche RNase in der Plasmid-Lösung verdaut. Hierzu wurde die DNA mit 100 µg /ml ProteinaseK (mit Puffer) in 2% SDS Lösung angesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. In einem letzten Schritt wurde die DNA über den Quiaquick PCR-Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt und anschließend die DNA Konzentration durch photometrische Messung bestimmt.

Die Herstellung der Sonde erfolgte durch *in vitro* Transkription der Plasmid DNA in RNA mit der T7-Polymerase. Eine Markierung der Sonde wurde durch Zugabe von DIG-UTP zu dem Nukleotidmix erreicht.

Transkriptionsansatz:

5µl Plasmid DNA (Konzentration 200ng/µl), 1 µl RNase Inhibitor (Promega, Madison, USA), 2µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl 10xNNTP + DIG-UTP (RNA Labeling Mix), 2 µl T7-Polymerase (40U), 8 µl H<sub>2</sub>O

Nach einer Inkubation für 2h bei 37°C wurde die DNA-Matrize durch DNaseI (20U) Behandlung für 15 min bei 37°C verdaut. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung gestoppt.

Die transkribierte RNA wurde anschließend unter Zugabe von 2,5 µl LiCl und 75 µl 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach zweimaligem Waschen in 70% Ethanol (zentrifugieren bei 4°C für 15 min mit 10000xg\*) wurde die RNA luftgetrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O plus 1µl RNase-Inhibitor aufgenommen. Die gewonnene RNA-Menge wurde schließlich photometrisch bestimmt. Zur Kontrolle der Markierung wurde ein Dot-Blot der RNA in absteigender 10-fach Verdünnung auf die NorthernBlot-Membran vorgenommen und wie unten beschrieben detektiert [Abb. 2.2].

### 2.3.2 Gelauf-trennung und Blotting

Vor Beginn des Gellaufes wurde die Gelkammer für mindestens 1h mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingeweicht und anschließend mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O gespült. Das Gel wurde als 1% Agarosegel in MOPS-Puffer (Anhang A) angesetzt. Nach dem Abkühlen auf

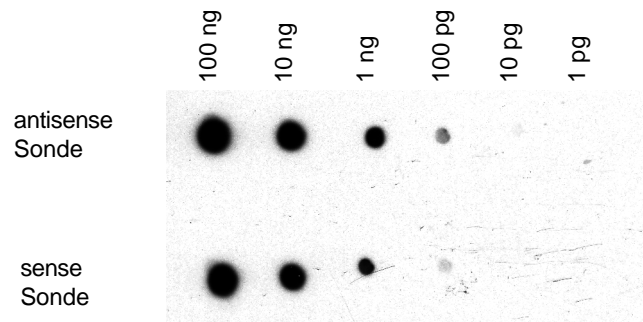


Abbildung 2.2: Dotblot der MIF RNA-Sonden

65°C wurde noch 5% Formaldehyd zugegeben, bevor das Gel in die vorbereiteten Kammern gegossen wurde. Für den Gellauf wurde pro RNA-Probe ein doppelter Ansatz mit jeweils 5 µg RNA in 15 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Probenscocktail (Anhang A) vorbereitet. Diese Mischung wurde für 10 min bei 65°C denaturiert. Es wurden immer zwei Gele pro Experiment angefertigt; eins für den eigentlichen Northern Blot und eins für die Ladekontrolle der RNA. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 90 Volt über 1h.

Die beiden Gele wurden vier Mal für 5 min in H<sub>2</sub>O gespült, um restliches Formaldehyd auszuwaschen. Anschließend wurden die Gele in (10x)SSC äquilibriert. Parallel dazu wurden die Northern Blot-Membranen vorbereitet, indem sie erst in H<sub>2</sub>O und dann ebenfalls in (10x)SSC äquilibriert wurden. Für den Northern Blot wurde eine doppelt positive Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) verwendet; für die Kontrollfärbung wurde eine Nitrocellulosemembran vom Typ Optitran BA-S 83 (Schleicher & Schuell, Dassel) eingesetzt. Das Übertragen der RNA aus den Gelen auf die Membranen erfolgte mit dem Turboblotter System (Schleicher & Schuell, Dassel) über 3h mit einem neutralen (10x)SSC Transfer Puffer. Nach dem Blotting wurde die Membran an der Luft getrocknet und die RNA durch 1,25J/cm<sup>2</sup> UV-Licht mit der Membran vernetzt.

### 2.3.3 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung der RNA mit der Northern-Sonde lief über Nacht in einem speziellen Hybridisierungs-ofen (Hybaid, Heidelberg), der eine konstante Temperatur von 68°C bei kontinuierlicher Bewegung der Lösungen in den Hybridisierungsflaschen ermöglicht. Zur Vorbereitung wurde die geblotete Northern-Membran in den Hybridisierungsflaschen mit Prähybridmix (Anhang A) für mindestens 2h im geheizten Ofen inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde zu dem Prähybridmix noch 10mg/ml denaturierte Salm-DNA (Boehringer, Mannheim) hinzugegeben. Von der RNA-Sonde wurden 5 µl zu dem Prähybridmix hinzugegeben und in vorgewärmten Zustand gegen den Prähybridmix in der Hybridisierungsflasche ausgetauscht. Sowohl der Prähybridmix als auch die Sonde konnten mehrere Male wiederverwendet werden und wurden bei -20°C gelagert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran im Ofen drei Mal (10 min) mit Waschpuffer I (Anhang A) und zwei Mal (15 min) mit Waschpuffer II (Anhang A) gewaschen. Die Membran wurde nun wieder bei RT für 5 min in Maleinsäurepuffer (Anhang A) äquilibriert um danach in 2% Blockingpuffer (Anhang A) zu inkubieren. Nach 60 min wurde zu dieser Lösung 0,7 µl anti-DIG-AP Fab Fragment (Boehringer, Mannheim) pipettiert und für weitere 30 min inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween wurde die Membran für die Detektion mit Reaktionspuffer (Anhang A) äquilibriert. Die feuchte Membran wurde anschließend mit 2 ml gefiltertem CPD-Star (Tropix, Bedford, USA) benetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Membran wurde nun in Plastikfolie eingeschweißt und in einer vorgewärmten Röntgenfilmkammer für 15 min im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Das entstandene Chemilumineszenzsignal wurde mit einem Röntgenfilm BioMax MR (Kodak, Rochester, USA) aufgenommen und in einer automatischen Filmentwicklermaschine (Optimax, MS Laborgeräte, Heidelberg) mit Kodak-Photochemikalien (Kodak, Rochester, USA) entwickelt.

Die Färbung der ribosomalen RNA auf der Kontrollmembran erfolgte mit Methylblau-Lösung. Hierzu wurde die Membran nach dem Trocknen für 15 min

in 5% Essigsäure vorinkubiert und dann 5-10 min in Methylenblaufärbelösung (Anhang A) geschwenkt. Überschüssiges Methylenblau wurde nach dem Färben unter fließendem Leitungswasser entfernt und die Membran im feuchten Zustand photographiert.

## 2.4 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren ermöglicht die Analyse der Proteinexpression in Zellen und Zellkulturüberständen. Durch eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe und durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen die Zielproteine erreicht man eine sehr hohe Genauigkeit in der Auswertung. Im folgenden werden zuerst der Gellauf und der Transfer der Proteine auf eine Membran und dann die zwei angewandten Detektionsverfahren für MIF und Phospho-Akt beschrieben.

### 2.4.1 Gellauf und Blotting

Für die Auftrennung der Proteine wurde das NuPage-System (Invitrogen, Paisley, GB) verwendet. Die Proteinkonzentration wurde hierfür so eingestellt, dass pro Spur 10 µg gelaufen sind, bzw. es wurden die ankonzentrierten Überstände direkt eingesetzt. Zu 65 µl der Proteinlösung wurden 25 µl 4x Probenpuffer (Invitrogen, Paisley, GB) und 10 µl 10x Reduktionsmittel (Invitrogen, Paisley, GB) hinzugegeben. Diese Mischung wurde bei 70°C für 10 min inkubiert, bevor die Proben in die Geltaschen pipettiert wurden. In jedem Gel wurde ein Größenmarker (Invitrogen, Paisley, GB) verwendet, um die korrekte Größe des später detektierten Proteins überprüfen zu können. Für den MIF-Western Blot wurde zusätzlich noch in einer Spur 10 ng rekombinantes humanes MIF (eigene Herstellung) als Standard aufgetragen.

Die Gelauf-trennung erfolgte mit einem NuPage MES Laufpuffer (Invitrogen, Paisley, GB) bei einer Spannung von 200 Volt über 35 min. Die Gele wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83 (Schleicher & Schuell, Dassel) durch Elektrotransfer übertragen. Dazu wurde der NuPage Transfer-Puffer (Invitrogen, Paisley, GB) mit 10% Methanol versetzt um die Transfereffizienz zu erhöhen. Der Transfer fand bei 30 Volt über 60 min in der für den Transfer umge-

bauten Gelkammer statt. Um eine stärkere Bindung der Proteine an die Membran zu erhalten, wurden die fertig geblotteten Gele an der Luft getrocknet, bevor sie für die Detektion weiter verarbeitet wurden.

### 2.4.2 MIF-Detektion

Zu Beginn der Detektion mußten unspezifische Bindungsstellen der Proteine und der Membran blockiert werden. Hierzu wurde die Membran über Nacht in Rotiblock (Roth, Karlsruhe) bei 4°C aufbewahrt. Nach einmaligem Waschen mit PBS plus 0,05 % Tween20 wurde die Membran mit dem Erstantikörper inkubiert. Dazu wurde eine 1:10000 Verdünnung des Antikörperserums in Rotiblock vorgenommen. Das verwendete Antikörperserum wurde im Kaninchen durch mehrmaliges Immunisieren mit rekombinantem humanen MIF generiert. Nach 1h Inkubation unter ständiger Bewegung wurde vier Mal für 5 min gewaschen, bevor der Zweitantikörper hinzugegeben wurde. Zum Einsatz kam ein Meerrettich-Peroxidase [HRP] konjugierter Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (Pierce, Rockford, USA) in einer Verdünnung von 1:100000 in Blockpuffer. Wieder wurde für eine Stunde inkubiert und anschließend ebenfalls vier Mal gewaschen. Die gut abgetropften Membranen wurden dann in Super Signal - Detektionslösung (Pierce, Rockford, USA) gegeben und für weitere 5 min inkubiert. Das entstandene Chemilumineszenzsignal wurde in einem letzten Schritt mit BioMax MR Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, USA) aufgenommen und in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Optimax, MS Laborgeräte, Heidelberg) sichtbar gemacht.

### 2.4.3 Phospho-Akt-Detektion

Der Nachweis des phosphorylierten und damit aktivierten Akt wurde mittels eines phospho(Ser473)-Akt spezifischen Antikörpers geführt (New England Biolabs, Beverly, USA). Die fertig geblottete und trockene Membran wurde hierfür in einem ersten Schritt für 1h in einem Trockenmilch-Blockpuffer inkubiert. Der Puffer wurde mit 0,1% Tween20 und 5% Trockenmilch in Tris Buffered Saline [TBS] angesetzt. Nach dreimaligen Waschen mit 0,1%



Tween20 in TBS erfolgte die Erstantikörperinkubation über Nacht bei 4°C . Der Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung in 0,1% Tween und 10% BSA in TBS eingesetzt. Nach wiederum drei Waschsritten wurde ein HRP-konjugierter Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (Pierce, Rockford, USA) als Zweitantikörper in einer 1:10000 Verdünnung im Blockpuffer für 1h bei RT mit der Membran inkubiert. Es folgten drei Waschsritte und der oben beschriebene Chemilumineszenznachweis (siehe MIF-Detektion).

## 2.5 ELISA - Techniken

Die Analyse der Proteine in Zellkulturüberständen erfolgte mithilfe der „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays“ [ELISA]. Ein spezifischer Proteinnachweis gelingt hierbei über den Einsatz von Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein. In einem ersten Schritt wird das gesuchte Protein über monoklonale Antikörper an die Mikrowellplatte gebunden und in einem zweiten Schritt mit markiertem polyklonalen Antikörper über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen.

Bei dem ebenfalls unter diesem Punkt beschriebenen Nachweis der Laktatdehydrogenase [LDH] in Zellkulturüberständen handelt es sich nicht um einen ELISA-Test, sondern der Nachweis geschieht direkt über die enzymatische Aktivität der LDH.

### 2.5.1 MIF-ELISA

Als Vorbereitung auf die Versuchsdurchführung wurde eine F96 Maxisorb NUNC-Immuno Plate (NalgeNUNC, Rochester, USA) mit dem monoklonalen Anti-human MIF Erstantikörper (R&D Systems, Wiesbaden) beschichtet. Hierzu wurde der Antikörper aus einer Stammlösung(500 µg/ml) 1:500 in PBS verdünnt und je 100µl pro well in die Platte pipettiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Platte dreimal mit PBS plus 0,05 % Tween gewaschen und anschließend mit 300µl Superblock Puffer in TBS (Pierce, Rockford, USA) pro well für 1h bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneutem Waschen wurden je 100µl Probe (Vorbereitung s.o.) bzw. je 100µl einer Standardreihe im Doppelansatz in die Wells gegeben. Der als

Standard verwendete rekombinante humane MIF (R&D Systems, Wiesbaden) wurde in dem entsprechenden Zellkulturmedium des Versuches verdünnt. Es wurden folgende Konzentrationen eingestellt:

0,39 - 0,78 - 1,56 - 3,13 - 6,25 - 12,5 - 25 ng/ml

Nach zweistündiger Inkubation und erneutem Waschschrift wurden 100µl des polyklonalen biotinylierten Anti-human MIF Zweitantikörpers (R&D Systems, Wiesbaden) in einer 1:500 Verdünnung (Stocklösung 50µg/ml) im Blockpuffer auf die Platte gegeben und für weitere zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder gewaschen und nun der - an eine enzymatische Farbreaktion gekoppelte - Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers begonnen. Hierzu wurde zuerst eine POD-konjugierte Streptavidinlösung (Boehringer, Mannheim) in einer 1:5000 Verdünnung in Blockpuffer für 30 Minuten auf der Platte inkubiert. Nach einem zwischengeschalteten Waschschrift wurde dann als zweites eine Substratlösung für die Peroxidasereaktion hinzugegeben. Diese bestand aus 10 mg o-Phenylenediamine (Sigma, Saint Louis, USA) aufgelöst in OPD-Substratpuffer (Anhang A) unter Zugabe von 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Nach einer Inkubation von weiteren 20 min bei RT im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25µl 2,5-normaler Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroplattenlesegerät (Dynatech, Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 490 nm gegen eine Referenz von 630 nm. Die resultierenden MIF-Spiegel in den Überständen wurden dann anhand der Standardkurve automatisch berechnet. Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

### 2.5.2 VEGF-ELISA

Die Durchführung des ELISAs für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor [VEGF] erfolgte mit einigen kleinen Modifikationen analog zu dem oben beschriebenen MIF-ELISA. Als Blockpuffer wurde 1% BSA-Lösung in PBS eingesetzt. Für die spezifische VEGF-Detektion wurde folgendes Antikörperpaar benutzt: ein polyklonaler Anti-human VEGF Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden) in einer 1:250

Verdünnung (Stocklösung 0,1 mg/ml) als Erstantikörper und ein polyklonaler biotinierter Anti-human VEGF Antikörper (R& D Systems, Wiesbaden) als Detektionsantikörper. Als Standard diente rekombinantes humanes VEGF (R& D Systems, Wiesbaden). Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

### 2.5.3 LDH - Assay

Die Messung der LDH-Enzymaktivität in den Zellkulturüberständen dient als Indikator für die Viabilität der Zellkultur; dies wurde ausgenutzt, um den zytotoxischen Effekt der Versuchsbedingungen abzuschätzen. Die Überstandsproben wurden nach dem Zentrifugieren nicht - wie sonst üblich - bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren, sondern bei RT gelagert, um die kälteempfindliche LDH nicht zu zerstören.

Der Nachweis der LDH-Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe des Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison USA). Auf einer 96-well Platte wurden 50µl der Überstände mit 50µl der Substratlösung vermischt. Anschließend wurde die Platte bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 50µl Stopplösung zu jedem well wurde die Absorption bei 490nm im Mikroplattenlesegerät (s.o.) gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

## 2.6 Wachstumsassays

Zur Analyse des Zellwachstums habe ich mich zweier verschiedener Techniken bedient. Für die Untersuchung kurzfristiger Wachstumsveränderungen kam der BrdU-Assay zum Einsatz, der anhand von markierten Nukleinsäurebausteinen eine Aussage über die DNA-Synthese zulässt. Für Langzeitwachstumsanalysen habe ich den Amidoblack-Assay verwendet, der über eine Färbung der Zellproteine eine Bestimmung der Zellzahl ermöglicht [106].

### 2.6.1 BrdU-Assay

Als Vorbereitung für die Durchführung dieses Assays, wurden die zu untersuchenden Zellen 24h vor Versuchsbeginn auf eine 96-well Platte (Costar Corporation, Cambridge, USA) ausplattiert; normalerweise in einer Dichte zwischen 5000 und 80000 Zellen pro well. Nach Stimulation bzw. Inhibition der Zellen mit verschiedenen Faktoren wurde für einen bestimmten Zeitraum - meist zwischen 2h und 6h - eine Bromdesoxy-Uridin[BrdU]-haltige Lösung zugegeben. Diese markierten DNA-Bausteine wurden dann von den Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus in ihre DNA inkorporiert. Durch den weiter unten beschriebenen Nachweis dieser BrdU-DNA konnte somit eine Aussage über die im Markierungszeitraum proliferierenden Zellen getroffen werden. Die detektierte Menge an BrdU-DNA korreliert dann mit dem Proliferationspool der Zellen in der S-Phase.

Zum Nachweis der BrdU-DNA-Synthese wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU Chemiluminescence (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet. In einem ersten Schritt wurde von den BrdU-markierten Zellkulturen das Kulturmedium abgesaugt, und die Zellen für 30 min mit der FixDenat Lösung in der 96-well Platte fixiert und denaturiert. Als nächstes wurde ein POD-gekoppelter anti-BrdU-Antikörper in Blockpuffer auf der Platte für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Platte im Lumistargerät (bmg, Offenburg) mit 100µl Chemilumineszenzlösung pro well versetzt. Nach einer 5-sekündigen Rüttelphase wurde dann die Lumineszenz der einzelnen wells in vier Zyklen gemessen und ein Mittelwert aus dem 2. und 3. Zyklus als relative light units [rlu] als Messwert weiter verwandt. In der Regel wurden alle Experimente in einem mindestens vierfachen Ansatz pro Stimulations-/Inhibitionsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

### 2.6.2 Amidoblack-Assay

In einem ersten Schritt wurde die Linearität des Zusammenhanges zwischen Zellzahl und Proteinfärbung mit dem Amidoblack-Assay geprüft. Hierzu wurden auf einer

96-well Platte die zu untersuchenden Zelllinien in ansteigender Zellzahl in den einzelnen wells ausgesät. Nach 24h Inkubation im Brutschrank wurde dann der Assay wie unten beschrieben durchgeführt. Für alle verwandten Zelllinien zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Färbekoeffizient [Abb. 2.3][Abb. 2.4], so dass im weiteren die Proteinfärbung als Mass für die Zellzahl verwandt wurde.

Für die Langzeitwachstumskinetiken wurden die Zellen in gleicher Zellzahl auf mehreren 96-well Platten ausgesät und dann alle 24h eine dieser Platten ausgewertet, so dass sich eine Kinetik mit einem 24h-Intervall ergab. Als erster Schritt wurde von den Platten das Kulturmedium abgesaugt und diese nach Zugabe von 100 $\mu$ l Fixierlösung (Anhang A) für 15 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Absaugen wurden je well 100 $\mu$ l Färbelösung (Anhang A) zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der sauren Waschlösung (Anhang A) wurde die Platte über 24h bei RT getrocknet. In einem letzten Schritt wurde das an Zellprotein gebundene Amidoblack mit 200 $\mu$ l 50mM NaOH [Natriumhydroxid] für 1h gelöst und anschließend im Mikroplattenlesegerät bei 620 nm die Absorbtion gegen eine Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen. Alle Bestimmungen wurden in einem achtfachen Ansatz pro Versuchsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

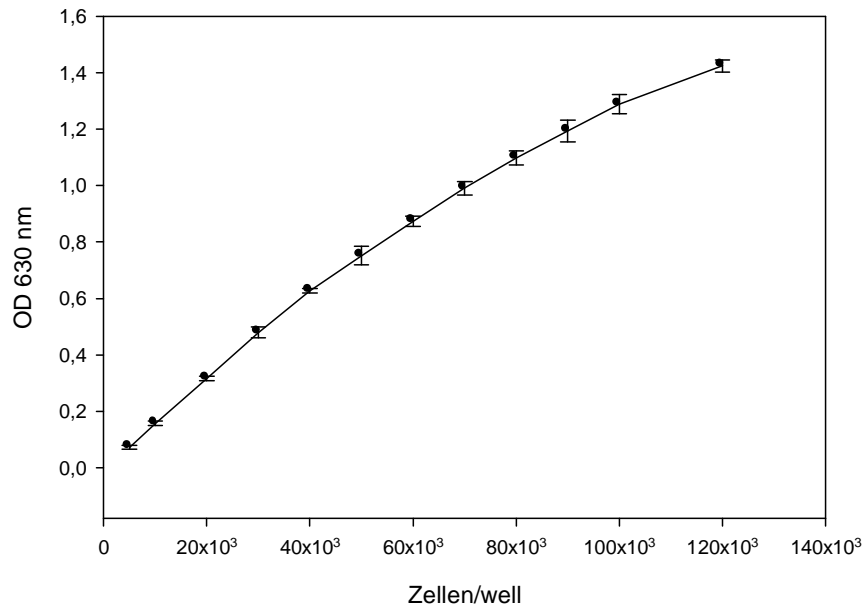


Abbildung 2.3: Amidoblack Standardreihe LN18

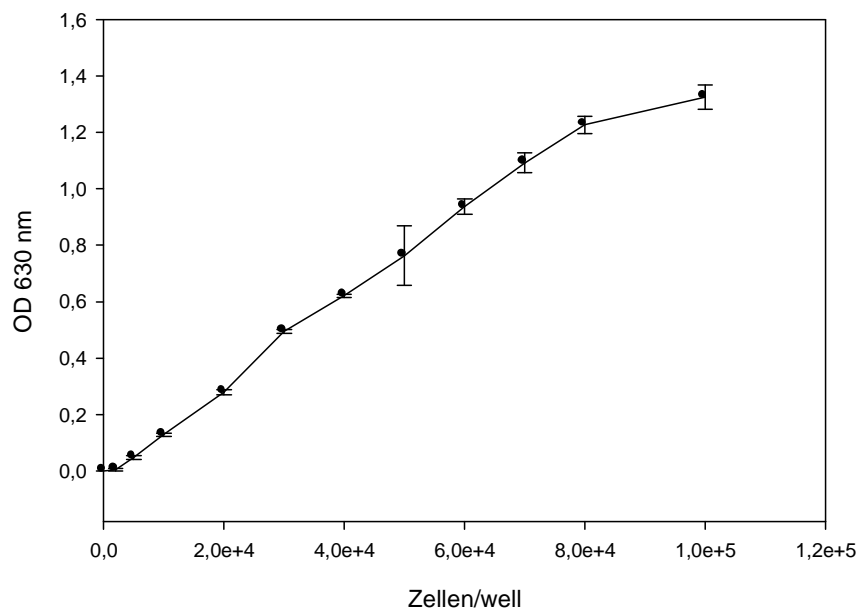


Abbildung 2.4: Amidoblack Standardreihe HF

## **Kapitel 3**

### **Material und Methoden**

### **Experimente**

## 3.1 Zellstress

### 3.1.1 Vorversuch

Als Vorversuch für die Zellstressexperimente wurde untersucht, welches die niedrigste Serumkonzentration ist, die von den Zellen noch toleriert wird. Eine niedrige Konzentration war wünschenswert, um die Auswertung der Versuche im Hinblick auf die MIF-Bestimmung in den Überständen nicht zu stören. Um dieses zu prüfen, wurden LN18 Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf Petrischalen ausgesät und bei 0%, 0,5%, 1% und 5% FCS-Konzentration im Kulturmedium für insgesamt 48h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 4h, 8h, 12h, 24h, 36h und 48h wurden je Schale 100 $\mu$ l abgenommen und anschließend im LDH-Assay analysiert. Das intrazelluläre Enzym LDH diente hierbei als Nachweis für eine Zellschädigung im Sinne einer Nekrose.

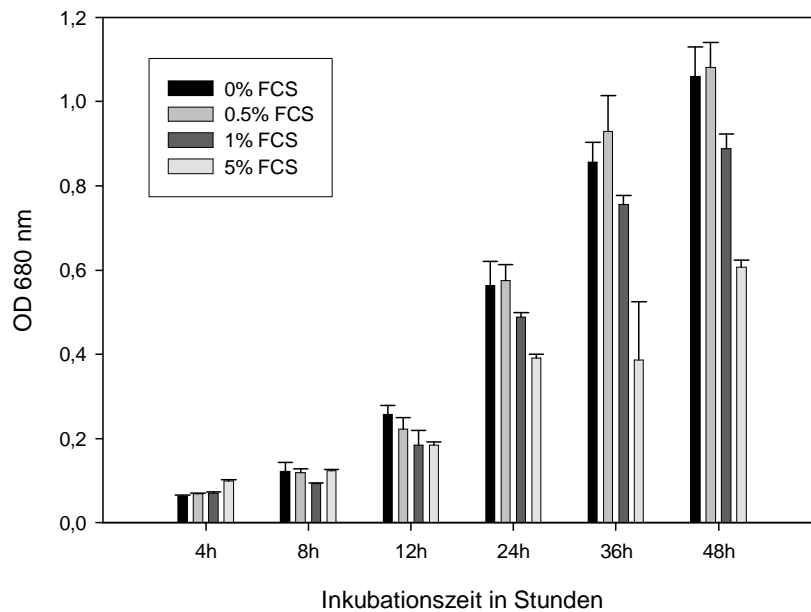


Abbildung 3.1: Serumkinetik LN 18

Die Auswertung dieses Vorversuches [Abb. 3.1] zeigt, daß für einen Zeitraum bis 24h die Werte für 1% und 5% nahezu identisch sind. Somit wurde für die weiteren Hypoxie- und Hypoglykämieexperimente mit einer FCS-Konzentration von 1% ge-



arbeitet. Bei dieser Konzentration lassen sich sowohl der MIF-ELISA als auch der Überstands-Western Blot problemlos durchführen.

### 3.1.2 Hypoxie und Hypoglykämie

Um zu analysieren, wie die Glioblastomzellen auf hypoxischen Stress reagieren, wurde der Zellkultur in geschlossenen Behältern der Sauerstoff entzogen. Hierzu wurden die Zellen 24h vor Versuchsbeginn mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  pro Petrischale ausgesät. Direkt vor Versuchsbeginn wurde in allen Schalen das Kulturmedium gewechselt. Die Kontrollzellen wurden unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen, die hypoxischem Stress ausgesetzt werden sollten, wurden in einen gasdichten Behälter überführt, der mit Hilfe des Gas Pak Plus Systems (BBL BectonDickinson, Sparks, USA) auf chemischem Wege von Sauerstoff befreit wurde. Die entstandenen sauerstofffreien Kulturbedingungen wurden mit einem Indikator-teststreifen Dry Anaerobic Indicator Strips (BBL BectonDickinson, Sparks, USA) überprüft. Hypoglykämische Kulturbedingungen wurden durch die Verwendung eines glukosefreien DMEM-Mediums (Gibco, Paisley, GB) erreicht. Der gesamte Versuch einschließlich Vorinkubation fand in 1% FCS Medium statt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden - jeweils in Doppelbestimmung - Zellen und Überstände aus Kontroll-, Hypoxie- und Hypoglykämiegruppe gewonnen. Die Zellen wurden entweder im Trizolprotokoll zur RNA-Präparation und anschließendem Northern-Blot bzw. im Triton-Lysis Protokoll und anschließendem Western-Blot weiterverarbeitet. Die Überstände wurden einerseits im ELISA analysiert, andererseits erst ankonzentriert und dann über einen Western-Blot untersucht. Gleichzeitig wurden die Überstände auch auf ihren LDH-Gehalt mit dem LDH-Assay überprüft.

### 3.1.3 Kontrollen

Bei den Hypoxieversuchen wurden neben den eigentlichen Kontrollgruppen (ohne Zellstress, s.o.) zwei weitere Kontrollebenen eingeführt. Als erstes wurden die Überstände nicht nur auf ihren MIF-Gehalt hin untersucht, sondern es wurde auch

an einem Beispiel der VEGF-Gehalt analysiert, um die Wirksamkeit des hypoxischen Stresses zu überprüfen. Als zweites wurden auch primäre Fibroblastenzellkulturen hypoxischem Stress ausgesetzt, um einen möglichen Unterschied zwischen Tumor- und Normalzellen zu erkennen.

## 3.2 Antisense-Klone

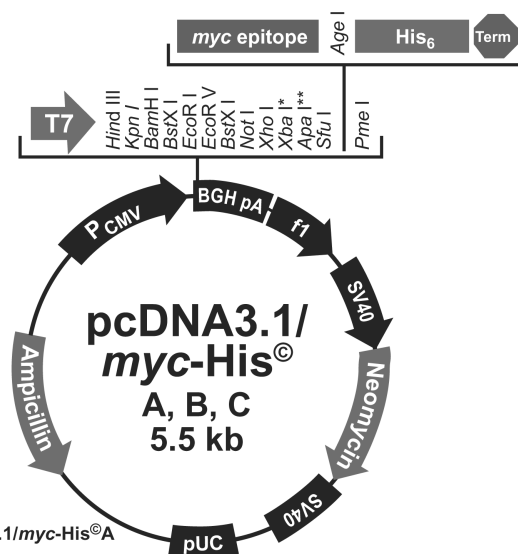
### 3.2.1 Vektorherstellung

Als Ausgangspunkt für die Generierung von stabilen MIF-Antisense-Klonen stand ein - in unserer Arbeitsgruppe von Gerald Ponath hergestelltes - Plasmid mit einklonierter MIF-Gensequenz in antisense[as]-Orientierung. Dieses Plasmid basiert auf dem pcDNA3.1/Myc-His A Vektor (Invitrogen, Leek NL), dessen Genkarte in Abb. 3.2 dargestellt ist. Unter der Kontrolle eines starken Cytomegalievirus[CMV]-Promotors wurde die MIF-antisense-Sequenz über die Schnittstellen BamH1 und EcoRV einkloniert [95].

Vor der eigentlichen Transfektion wurde das Plasmid über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym Xba 1 (Boehringer, Mannheim) linearisiert. Dazu wurden 50 µg DNA mit 50 U Restriktionsenzym und passendem Puffer versetzt. Das ganze wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und dann bei 37°C für 2h inkubiert. Anschließend wurde bei 70°C für 10 min das Restriktionsenzym deaktiviert. Die erfolgreiche Linearisierung des klonierten Plasmides und eines leeren Kontrollplasmides wurde mit einem Agarosegel überprüft [Abb. 3.3].

### 3.2.2 Transfektion

Als Vorversuch für die stabile Transfektion der Zelllinie LN18 wurde eine Probetransfektion der Zellen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von Transfektionsagens und DNA durchgeführt. Hierzu wurde ein Plasmid mit einkloniertem „Enhanced Green Fluorescent Protein“ [EGFP] als Indikator für die Transfektion verwendet. Die erfolgreiche (temporäre) Transfektion wurde nach 2 Tagen am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Es wurden folgende Mischungen der DNA mit den Transfektions-



Comments for pcDNA3.1/myc-His<sup>®</sup>A  
5494 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 Multiple cloning site: bases 902-999  
 myc epitope: bases 997-1026  
 Polyhistidine tag: bases 1042-1059  
 BGH reverse priming site: bases 1082-1099  
 BGH polyadenylation signal: bases 1081-1295  
 f1 origin of replication: bases 1358-1771  
 SV40 promoter and origin: bases 1836-2161  
 Neomycin resistance gene: bases 2197-2991  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3007-3246  
 pUC origin: bases 3678-4351  
 Ampicillin resistance gene: bases 4496-5357

\* There is a unique *BstE* II site, but no *Xba* I or *Apa* I sites in version C.

\*\* There is a unique *Sac* II site between the *Apa* I site and the *Sfu* I site in version B only.

Abbildung 3.2: Genkarte des Plasmides pcDNA3.1/Myc-His A

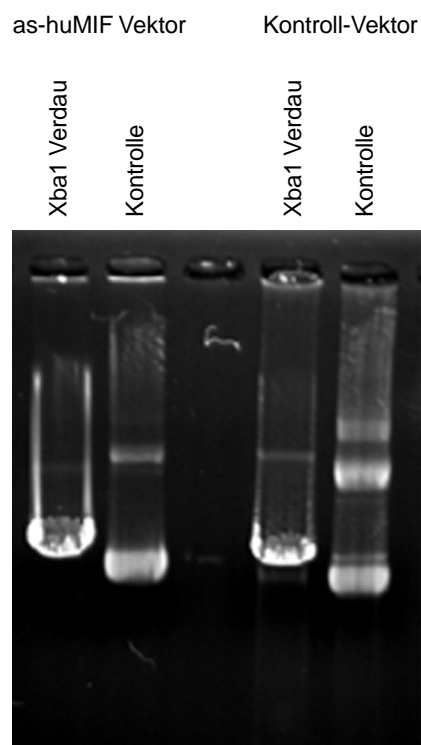


Abbildung 3.3: Plasmidverdau mit dem Restriktionsenzym Xba 1 des Vektors pcDNA3.1 +/- anti-sense MIF

agenzien Lipofectamin [LA](Gibco, Paisley, GB) und Lipofectin [LF](Gibco, Paisley, GB) erprobt:

1µg DNA + 5µg LA, 1µg DNA + 10 µg LA

1µg DNA + 5µg LF, 1µg DNA + 10 µg LF

Die Transfektion erfolgte unter den unten angegebenen Bedingungen mit einer semikonfluenten Zellkultur. Die besten Transfektionsergebnisse wurden mit Lipofectamin in einem Mischungsverhältnis von 5:1 mit DNA erzielt.

Die endgültige Transfektion der LN18 Zellen erfolgte in kleinen Kulturflaschen bei einer semikonfluenten Zelldichte. Das Transfektionsreagenz wurde unter sterilen Bedingungen mit 35µl in 700µl Kulturmedium ohne FCS- und Antibiotikazusatz angesetzt und auf gleiche Weise wie die 7µg in 700µl DNA-Lösung (gleiches Medium) für 30 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die beiden Proben vermischt und für weitere 15 min zusammen inkubiert. Die Zellen wurden währenddessen im Transfektionsmedium (ohne FCS/Antibiotika) 2x gewaschen. Danach wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben (ca 1,4 ml) und mit Transfektionsmedium auf 7ml aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 6h im Brutschrank wurde der Transfektionsmix von der Zellkultur abgenommen und die Zellen auf Standardkulturmedium umgesetzt. Es wurden folgende 3 Ansätze gemacht:

1. Negativkontrolle ohne Plasmid-DNA
2. Plasmid ohne MIF antisense-Insert
3. Plasmid mit MIF antisense-Insert

### 3.2.3 Selektion und Klonierung

Die Selektion stabil transfizierter Klone wurde 2 Tage später begonnen. Hierzu wurden die Zellen in 6-well Platten überführt und mit dem Selektionsmedium versetzt. Dieses Medium enthielt neben dem Standardkulturmedium Neomycin G418 (Invitrogen, Leek, NL) in einer Konzentration von 1mg/ml. Die Neomycinresistenz auf dem Plasmid führte dazu, dass die erfolgreich transfizierten Zellen überleben konnten,

während die nicht-transfizierten Zellen abgetötet wurden. Als Kontrolle für zytotoxische Kulturbedingungen diente der Transfektionsansatz ohne Plasmid; diese Zellen waren nach 8 Tagen vollständig abgestorben. Das Selektionsmedium wurde 2x pro Woche erneuert. Nach 14 Tagen Selektionierung wurde davon ausgegangen, dass nun alle nur transient transfizierten Zellen das Plasmid und die damit verbundene Resistenz verloren hatten. Die überlebenden Zellen waren nun also stabil transfiziert, was einer Integration der Plasmid-DNA ins eigene Erbgut entspricht.

Die Klonierung erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Die erste Methode war eine serielle Verdünnung transfizierter Zellen in 96-well Platten in der Absicht, bei genügend hoher Verdünnung der Zellsuspension einzelne Zellen in einem well zu haben. Der Erfolg wurde am Mikroskop kontrolliert und wells mit einzelnen Zellen markiert. Die zweite Vorgehensweise zur Klonierung war die Ausplattierung der stabil transfizierten Zellen in Verdünnung auf 10er Petrischalen. Auch hier wurden einzelne Zellen markiert und die sich entwickelnden Zellhaufen unter Mikroskopsicht mit trypsinetränkten Filterpapierstückchen abgelöst und in getrennte Kulturschalen überführt. Die so gewonnenen Klone wurden in Selektionsmedium weiterkultiviert, bis genügend Zellen für die molekulare Charakterisierung und die Asservation in flüssigem Stickstoff zur Verfügung standen. Zu Beginn wurden insgesamt 24 Antisense[as]-Klone und 7 Kontroll-Klone generiert. Zwei weitere as-Klone kamen auf Grund ihres langsamen Wachstums erst zu einem späteren Zeitpunkt dazu.

### 3.2.4 Molekulare Charakterisierung

Für die Charakterisierung der generierten as-Klone wurde die mRNA und das intrazelluläre Protein der einzelnen Klone im Vergleich zu den Wildtyp [wt] LN18 Zellen analysiert. Hierzu wurde nach Standardmethoden mRNA und Protein aus den Zellen isoliert und im Northern bzw. Western Blot weiterverarbeitet. Im Northern Blot kam neben der Standard antisense RNA-Sonde auch eine sense RNA-Sonde zum Einsatz, um die inklonierte antisense mRNA darzustellen. Die beiden langsam wachsenden Klone as1 und as2 wurden in einem zweiten Schritt noch einmal genauer untersucht. Der Northern Blot wurde in Doppelbestimmung bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zel-

len wiederholt, und die Proteinanalyse in einer fortlaufenden Kinetik mit jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen zum Startzeitpunkt durchgeführt.

### 3.2.5 Funktionelle Charakterisierung

Das Proliferationsverhalten der Klone as1 und as2 wurden im Vergleich zu den LN18 wt und Kontrollzellen untersucht. Als Kontrollzellen wurde Klon 3-1 ausgewählt. Zum einen wurde die Kurzzeitproliferation mit dem BrdU-Assay, zum anderen das Langzeitverhalten mit dem Amidoblack-Assay analysiert.

Im BrdU-Assay wurde das Wachstum der Zellen im Achtfach-Ansatz mit den Zelldichten 5000, 20000 und 80000 Zellen/well bestimmt. Die Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in die 96-well Platte ausgesät. Die Markierung erfolgte dann über eine BrdU-Zugabe, welches von den proliferierenden Zellen in die neu synthetisierte DNA eingebaut wurde. Als Markierungszeitraum wurden 2,5h gewählt. Parallel wurde durch Zugabe von 10 und 50 ng/ml rekombinantem MIF die Frage untersucht, ob eine Stimulation des Wachstums durch extrazelluläres MIF möglich ist.

Das Langzeitwachstum der Zellen wurde im Amidoblackversuch dargestellt. Hierzu wurden die Zellen in achtfachem Ansatz in einer Zelldichte von 5000 Zellen/well in 96-well Platten ausplattiert. Es wurden insgesamt acht Platten vorbereitet, von denen jeden Tag eine der weiteren Auswertung zugeführt wurde; bei den restlichen Platten erfolgte jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel.

### 3.2.6 Morphologie

Die antisense-Klone wiesen auch morphologisch Unterschiede zu den wildtyp- und Kontroll-Zellen auf. Um dieses zu demonstrieren, wurden jeweils von einer semi-konfluenten und von einer konfluenten Zellkultur der Klone und Kontrollen Photos gemacht. Dies geschah auf Kunstlichtdiafilme (Kodak, Rochester, USA) mit einem Durchlichtmikroskop (Leica, Wetzlar) bei verschiedenen Vergrößerungen.

### 3.3 Proliferationsanalysen

Die Untersuchung des Zellwachstums im Zusammenhang mit MIF erfolgte mit dem BrdU-Assay System. Die Zellkulturen wurden - wenn nicht anderweitig beschrieben - so angelegt, dass die Zellen 24h vor Versuchsbeginn ausplattiert wurden und direkt vor dem Start des Experimentes ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Der Einfluss von MIF auf das Zellwachstum wurde in den Glioblastomzellen immer in drei verschiedenen Zelldichten untersucht; wobei 5000 Zellen/well einer 25% konfluenten, 20000 Zellen/well einer fast konfluenten und 80000 Zellen/well einer überkonfluenten Kultur entsprach.

#### 3.3.1 Monoklonale Anti-MIF Antikörper

Durch die extrazelluläre Blockade von MIF durch spezifische monoklonale Anti-MIF Antikörper sollte die Frage untersucht werden, ob MIF ein möglicher auto-/parakriner Wachstumsfaktor für die Glioblastomzellen ist.

Der eingesetzte Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit einem Labor in Litauen hergestellt. Hierzu wurden Mäuse mit rekombinantem humanen MIF immunisiert und durch Fusion der isolierten Plasmazellen mit immortalisierten Myeloma Zellen antikörperproduzierende Hybridomaklone generiert. Der im Kulturüberstand gewonnene Antikörper gehörte in der Analyse zur IgM-Klasse und wurde über Affinitätsbindung in Kaptiv-M Säulen (Technogen, Piana di Monte Verna, I) aufgereinigt.

In einem ersten Schritt wurden drei der generierten Antikörper in einem „Screeningtest“ in den beiden untersuchten Zelllinien LN18 und LN229 eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen - wie oben beschrieben - vorbereitet, und die Antikörper in einer Konzentration von 100µg/ml für 6h inkubiert und anschliessend die Zellen für 2h mit BrdU markiert. Die Antikörper 6F12 und 12A4 wurden in einem zweiten Experiment mit LN229 Zellen in Konzentrationen von 100 und 200µg/ml für 8h vorinkubiert, bevor für 4h mit BrdU markiert wurde. In einem weiteren Experiment wurde das Versuchssystem auf unspezifische Einflüsse der Antikörper auf die Zellen



untersucht, indem ein unspezifischer monoklonaler IgM-Antikörper aus der Maus (Sigma, Saint Louis, USA) als Kontrolle diente.

### 3.3.2 MIF-Inhibitor

Die Frage nach der Wirkung von MIF auf die Zellen im Bezug auf die intrinsische enzymatische Aktivität von MIF wurde durch gezielte Blockade dieser Aktivität untersucht. Zum Einsatz kam ein spezifischer Inhibitor ISO-1, der unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Yusef Al-Abbed (Laboratory of Medical Chemistry North Shore Long Island Jewish Research Institute, New York, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

Die LN229 Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und dann mit dem Inhibitor in Konzentrationen von 100, 500 und 1000 $\mu$ mol bei gleichzeitiger Zugabe von BrdU für 6h inkubiert. Da der Inhibitor in DMSO gelöst war, wurde eine weitere Kontrolle mit 1% DMSO (entspricht der Lösungsmittelmenge in der höchsten eingesetzten Konzentration) durchgeführt.

### 3.3.3 Rekombinanter MIF

Durch Zugabe von rekombinantem humanem MIF zu den Zellkulturen sollte untersucht werden, ob durch Erhöhung des extrazellulären MIF-Spiegels eine Proliferationssteigerung zu erzielen ist. Diese Experimente wurden im Kurz-(BrdU-Assay) und Langzeittest (Amidoblack-Assay) mit den LN18 und HF Zellen durchgeführt.

Nach standardmäßiger Vorbereitung der LN18 Zellen wurden diese mit 0, 50 und 100 ng/ml MIF für 16h stimuliert und für 2h mit BrdU markiert. Die HF Zellen wurden in einer Dichte von 5000, 10000 und 20000 Zellen/well vorinkubiert, und dann mit 100ng/ml MIF für 4h stimuliert. In einem weiteren Experiment wurden die humanen Fibroblasten in den 96-well Platten so lange vorinkubiert, bis sie konfluent waren. Dann erfolgte ohne Mediumwechsel eine Stimulation mit 0, 5, 10, 50, 100 und 500 ng/ml MIF für 8h (bei gleichzeitiger BrdU Markierung).

Im Langzeitwachstum wurden die LN18 Zellen sowie die Fibroblasten im Standardkulturmedium mit 0 und 50 ng/ml MIF stimuliert und im Amidoblacktest über

mehrere Tage ausgewertet. Hierbei wurde alle 2 Tage das Medium erneuert und rekombinantes MIF zugesetzt.

### 3.4 Zelldichte

Die beiden Glioblastomzelllinien LN18 und LN229 sowie eine primäre humane Fibroblastenkultur (Passage 10) wurden in Bezug auf die Regulation, Expression und Sekretion von MIF bei verschiedenen Zelldichten untersucht. Die Zellen wurden hierzu in vier unterschiedlichen Zelldichten auf 10er Petrischalen ausgesät und für 24h inkubiert. Anschliessend wurden RNA, intrazelluläres Protein und Überstände aus der Zellkultur gewonnen und in Northern Blot und Western Blot analysiert. Bei den Glioblastomzellen entsprachen  $0,5 \times 10^6$  Zellen einer 25%-konfluenten Kultur,  $1 \times 10^6$  Zellen einer semikonfluenten,  $5 \times 10^6$  Zellen einer konfluenten und  $10 \times 10^6$  Zellen einer überkonfluenten Kultur. Für die Fibroblastenzellen galt eine ähnliche Einteilung für die Zelldichten 0,5 , 1 , 2,5 und  $5 \times 10^6$  Zellen.

### 3.5 AKT-Aktivierung

Um die möglichen Signalwege der MIF Wirkung auf die Zellen näher zu untersuchen, wurden LN229 Zellen und primäre Fibroblasten mit rekombinantem MIF stimuliert. Anschliessend wurde das Zelllysate auf die aktivierte - entspricht der phosphorylierten - Form der Proteinkinase B [PKB] im Western Blot getestet. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 6-well Platten in 0,5% FCS Medium ausgesät. Nach 24h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel auf 0% FCS Medium, welches direkt vor der Stimulation noch ein weiteres Mal gewechselt wurde. Die Zellen wurden dann mit 0, 0,5, 5, 25 und 50 ng/ml MIF für 15 und 60 min stimuliert. Für die LN229 Zellen wurde ein zweites Experiment mit einer höheren FCS-Konzentration durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 0,1% und 5% FCS Medium für 24h vorinkubiert, bevor die Stimulation mit 0, 5, 10, 50, 100 und 500 ng/ml MIF ohne Mediumwechsel gestartet wurde. Nach 30 min wurden die Zellen lysiert und im Western Blot analysiert.

## Kapitel 4

# Ergebnisse

## 4.1 Zellstress

Für viele Tumore ist das Wachstum trotz suboptimaler Nährstoffversorgung eines der Charakteristika und Rätsel der Tumorbiologie. Eine Reaktion auf diese Art von Zellstress (Hypoxie, Hypoglykämie) ist dennoch vorhanden und scheint über eine Stimulierung der Angiogenese im Tumor selbst zu einer Verbesserung der Nährstoffversorgung zu führen [94]. In der Literatur wurde MIF als Angiogenesefaktor in Tumoren beschrieben [3]. Um diese These weiter zu untermauern, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob MIF unter oben aufgeführten Zellstressbedingungen vermehrt exprimiert bzw. sezerniert wird. Hierzu wurden die Zellen der Linien LN18 und LN229 hypoxischen (Sauerstoffentzug) und hypoglykämischen (Nährstoffentzug) Kulturbedingungen ausgesetzt.

Die Analyse der MIF mRNA im Northern Blot (Abb. 4.1 und 4.2) zeigt bei beiden Zelllinien eine deutliche mRNA-Induktion nach 12h unter hypoxischem Stress. Eine leichte Erhöhung der MIF mRNA fand sich für die LN18 Zellen auch unter hypoglykämischen Bedingungen, diese war bereits schon nach 3h vorhanden und war bis 12h weiter nachweisbar.

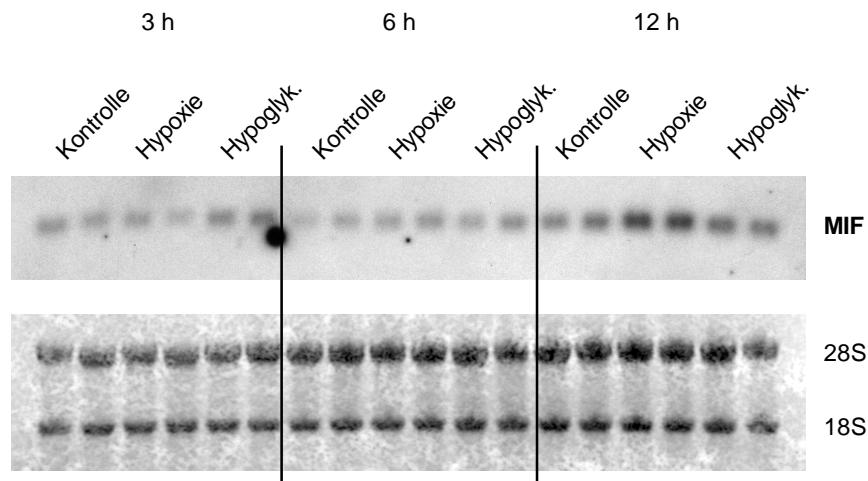


Abbildung 4.1: MIF Northern Blot der Zelllinie LN18

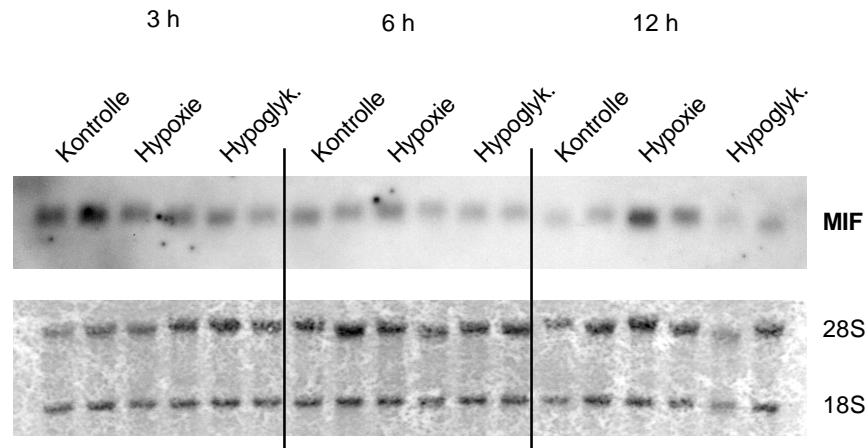


Abbildung 4.2: MIF Northern Blot der Zelllinie LN229

Eine Freisetzung von MIF in den Zellkulturüberstand unter Zellstress fand sich nur bei den LN18 Zellen (Abb. 4.3); die LN229 Zellen zeigten keine vermehrten MIF-Spiegel im Zellstressexperiment (Daten nicht gezeigt). Für die LN18 Linie fand sich hierbei eine Zunahme der MIF-Konzentration im Kulturmedium um den Faktor 4 nach 48h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.4). Der Anstieg war schon nach 12h Inkubation messbar und stieg unter hypoglykämischen Bedingungen steiler an. Da die Zellen unter dem Lichtmikroskop nach 48h Inkubationszeit Anzeichen von Zellyse zeigten, wurde parallel zum MIF die LDH-Menge im Überstand bestimmt als Nachweis von stattgefundenem Zelltod. Man sah, dass sowohl hypoxische als auch hypoglykämische Stressbedingungen zu einer vermehrten LDH Konzentration im Medium führten. Dies mag ein Hinweis auf eine mögliche MIF-Freisetzung durch Freiwerden von intrazellulär gespeicherten MIF durch nekrotische Prozesse sein [5].

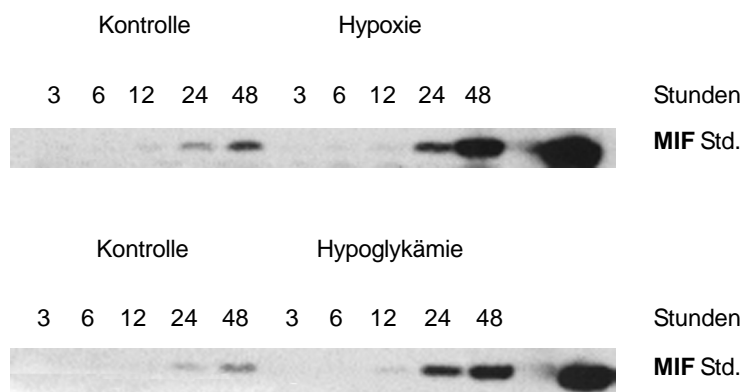


Abbildung 4.3: MIF Western Blot der Zellkulturüberstände der Zelllinie LN18

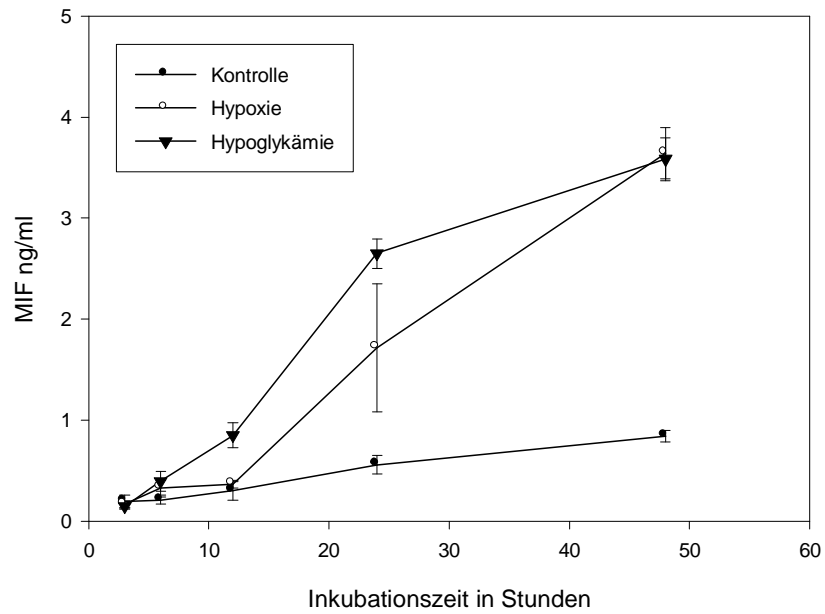


Abbildung 4.4: MIF-ELISA der Zelllinie LN18

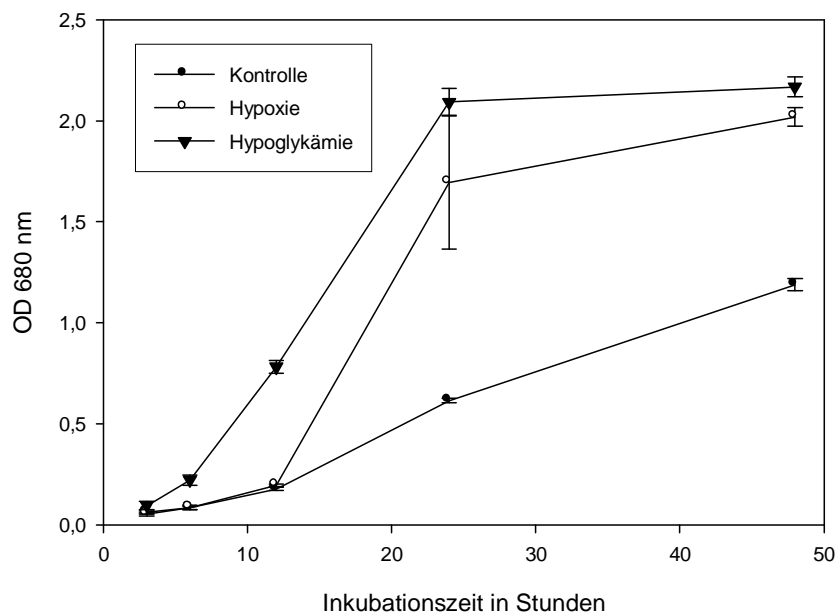


Abbildung 4.5: LDH-Assay der Zelllinie LN18

Als Kontrolle für das Erreichen von hypoxischen Kulturbedingungen wurde neben der Verwendung von Teststreifen auch die VEGF-Sekretion der Zellen unter Hypoxie untersucht (Abb. 4.6). Es fand sich eine erhöhte VEGF-Konzentration im Überstand unter Hypoxie nach 8h, die im Verlauf noch weiter anstieg.

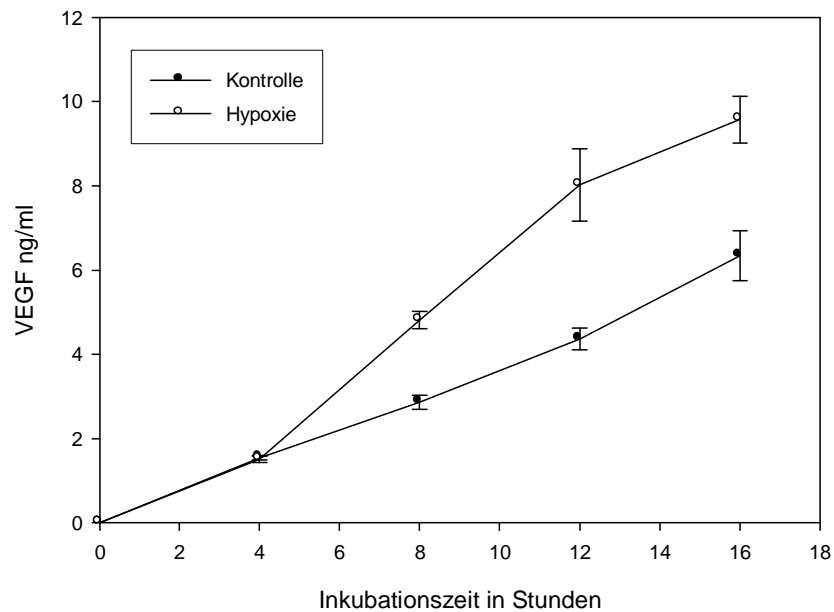


Abbildung 4.6: VEGF-ELISA der Zelllinie LN18

Zur Unterscheidung von allgemeinen Zellreaktionsweisen von tumorspezifischen auf hypoxischen Stress wurde in einem weiteren Kontrollexperiment die MIF- und VEGF-Freisetzung in primären humanen Fibroblasten untersucht. Eine Erhöhung des extrazellulären MIFs war weder unter hypoxischen noch unter hypoglykämischen Bedingungen nachweisbar (Abb. 4.7). Dahingegen fand sich eine deutliche Freisetzung von VEGF unter hypoxischem Stress (Abb. 4.8 - kein VEGF in der Kontrollgruppe nachweisbar).



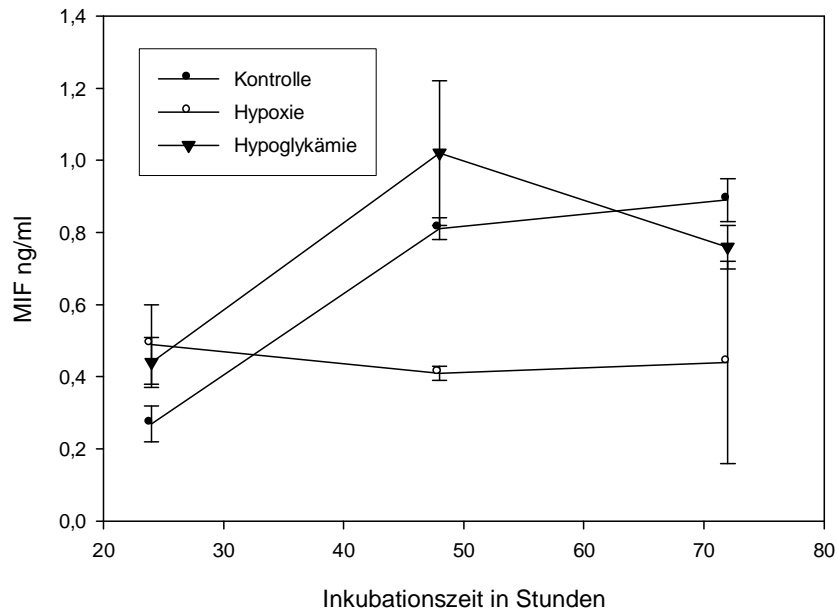


Abbildung 4.7: MIF-ELISA der primären Fibroblasten

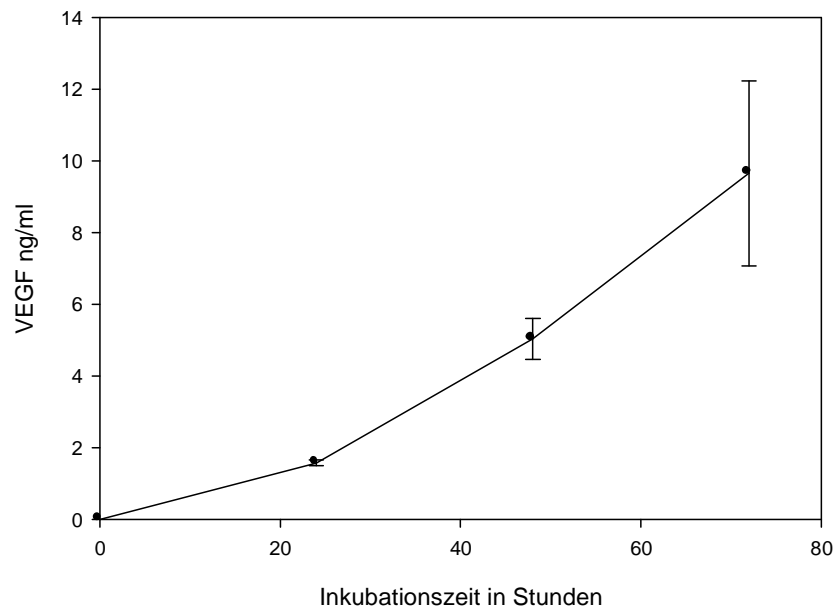


Abbildung 4.8: VEGF-ELISA der primären Fibroblasten

## 4.2 Antisense-Klone

### 4.2.1 Selektion und Klonierung

Die Generierung von stabilen antisense-MIF transfizierten Zellen erfolgte - nach vorausgegangener Transfektion - durch Zugabe eines Selektionsmediums mit Neomycin (G418). Die nicht-infizierten Kontrollzellen starben nach 7 Tagen unter einer G418 Konzentration von 1000 $\mu$ g/ml. Bei den transfizierten Zellen fanden sich einzelne Zellen, die zunächst expandiert und anschliessend kloniert wurden. Es wurden schliesslich 26 antisense Klone und 7 Kontrollklone („leeres Plasmid“) isoliert.

### 4.2.2 Molekulare Charakterisierung

Um den Erfolg der stabilen Transfektion in den gepickten Klonen zu analysieren, wurde zunächst ein Northern Blot mit einer sense-MIF und einer antisense-MIF Sonde durchgeführt (Abb. 4.9 und 4.10). Hier fand sich die transfizierte antisense RNA bei Hybridisierung mit der sense-MIF Sonde in allen antisense Klonen; in den Kontrollklonen und in den Wildtypzellen[wt] war kein Signal nachweisbar. Interessanterweise sah man in den antisense Klonen auch eine Erhöhung der sense-MIF mRNA, was auf einen Gegenregulationsmechanismus der Zellen hindeutet, um die MIF Proteinproduktion aufrechtzuerhalten. So konnte im Western Blot (Abb. 4.11) nicht in allen antisense Zellen eine Verringerung der MIF Proteinmenge nachgewiesen werden.

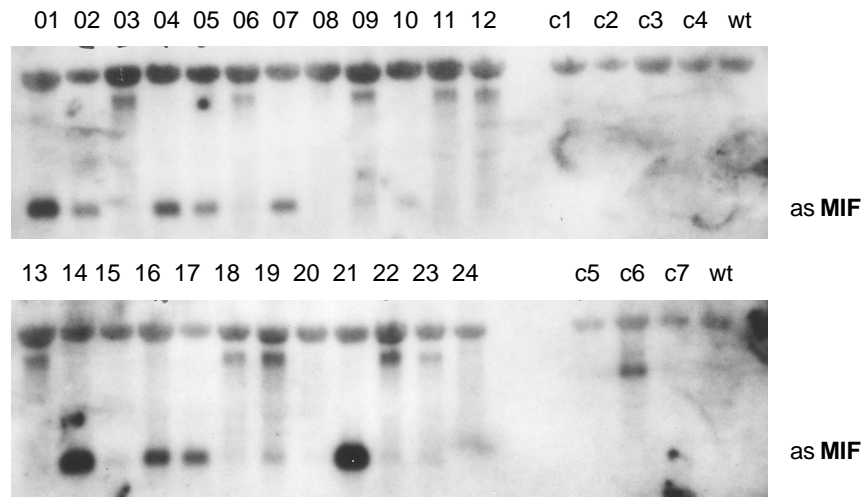


Abbildung 4.9: sense-MIF Northern Blot der stabil transfizierten Klone LN18

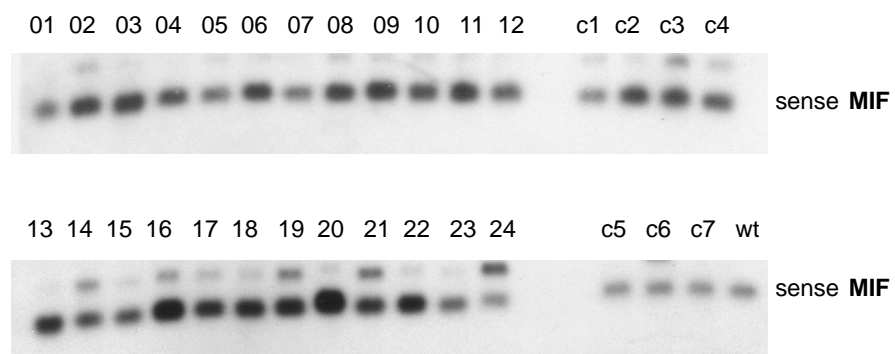


Abbildung 4.10: antisense-MIF Northern Blot der stabil transfizierten Klone LN18

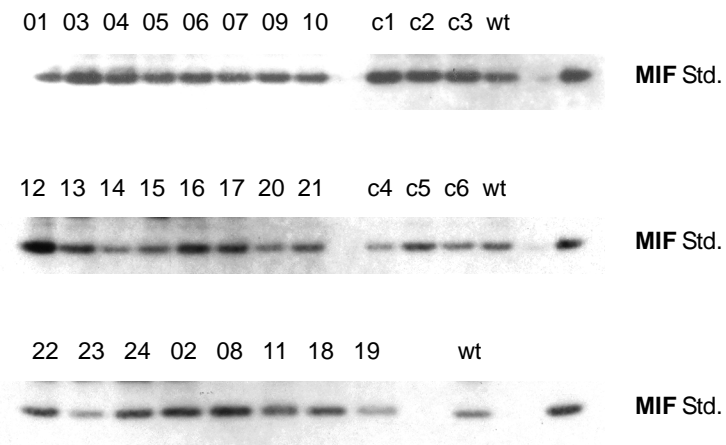


Abbildung 4.11: MIF Western Blot der stabil transfizierten Klone LN18

Zwei weitere antisense-Klone standen erst zu einem späteren Zeitpunkt in einer ausreichenden Menge zur Verfügung. Im Northern Blot (Abb. 4.12) fand sich eine starke antisense-MIF Produktion, bei gleichzeitiger Erhöhung des zelleigenen sense-MIF-Transkripts. Im Western Blot (Abb. 4.13) zeigte sich eine deutliche Reduktion des intrazellulären MIF Proteingehaltes, welche sich auch bei einem Wachstum über einige Tage noch nachweisen liess. Aufgrund dieser Charakteristik wurden diese beiden Klone und der Kontrollklon c1 für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt.

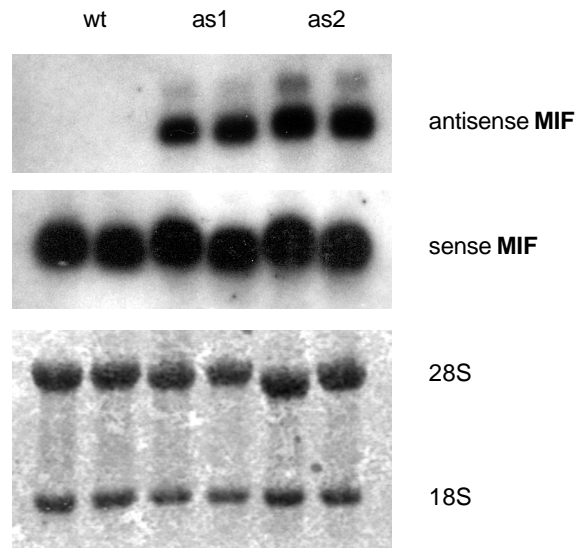


Abbildung 4.12: MIF Northern Blot der ausgewählten antisense Klone LN18

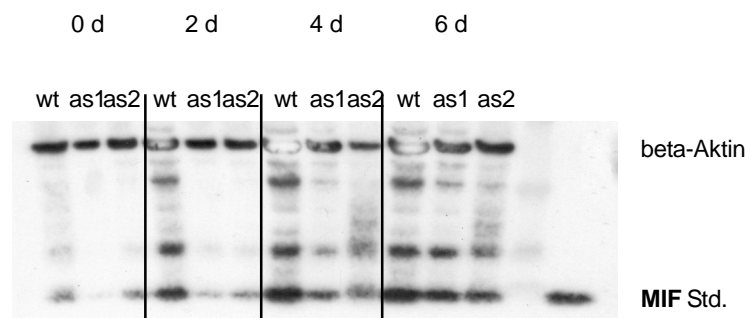


Abbildung 4.13: MIF Western Blot der ausgewählten antisense Klone LN18

### 4.2.3 Funktionelle Charakterisierung

Um die Frage zu beantworten, ob MIF einen Einfluss auf das Wachstum von Glioblastomzelllinien hat, wurden die generierten antisense Klone auf ihr Wachstum im Vergleich zu den Kontroll- und wt-Zellen untersucht. Im BrdU-Assay gibt die Einbaurrate von markierten Nukleotiden eine Aussage über die Proliferationsaktivität der Zellen über einen kurzen Zeitraum. Es fanden sich hier unter wenig konfluenten Kulturbedingungen („10000“) nahezu identische Wachstumsraten für die Klone und Kontrollen (Abb. 4.14). Unter konfluenten und überkonfluenten Wachstumsbedingungen („80000“) zeigte sich jedoch ein um den Faktor 2 reduzierte Proliferationsaktivität in den as-Klonen.

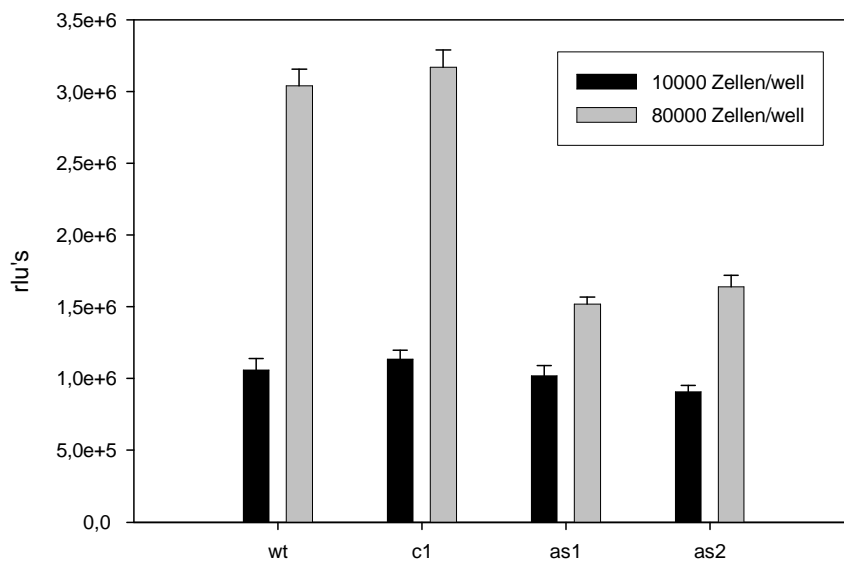


Abbildung 4.14: BrdU-Proliferationsassay der Klone LN18

Betrachtet man das Wachstum der Zellen über einen Zeitraum von Tagen mit dem Amidoblack-Assay, der über eine Anfärbung der Gesamtproteinmenge eine Messung der Zellzahl und damit indirekt des stattgefundenen Wachstums gibt, so fanden sich deutliche Unterschiede zwischen Kontrollen und as-Klonen (Abb. 4.15). Man erhält weiterhin den Eindruck, dass sich die as-Klone auf einer viel geringe-

ren Zelldichte als die Kontrollen einer stabilen ruhenden Kultur annähern. Wenn man dem Kulturmedium der Zellen über 8 Tagen an jedem zweiten Tag 10ng/ml rekombinantes MIF zusetzte, so sah man eine leichte Erhöhung der Wachstumsrate in den as-Klonen und nahezu keine weitere Wachstumsstimulation der Kontrollen (Abb. 4.16).

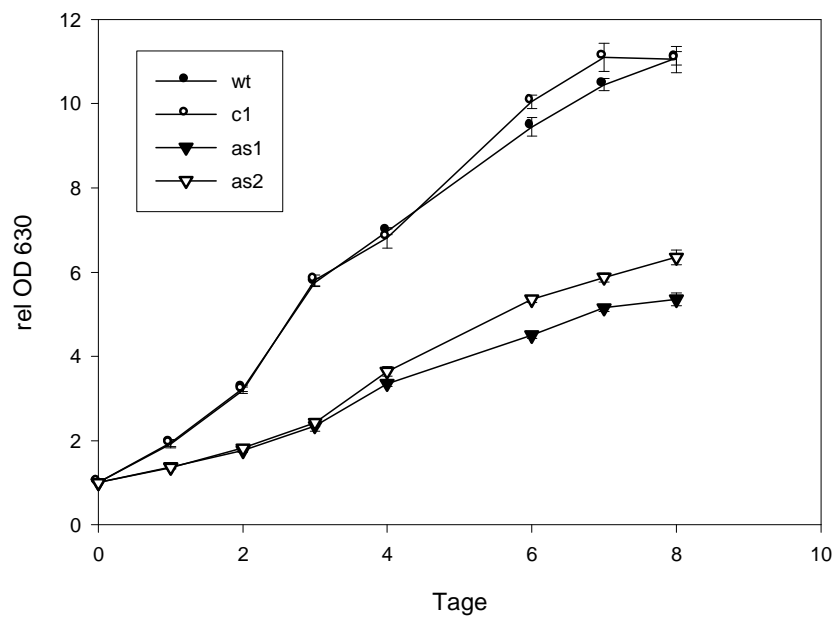


Abbildung 4.15: Amidoblack-Assay der Klone LN18



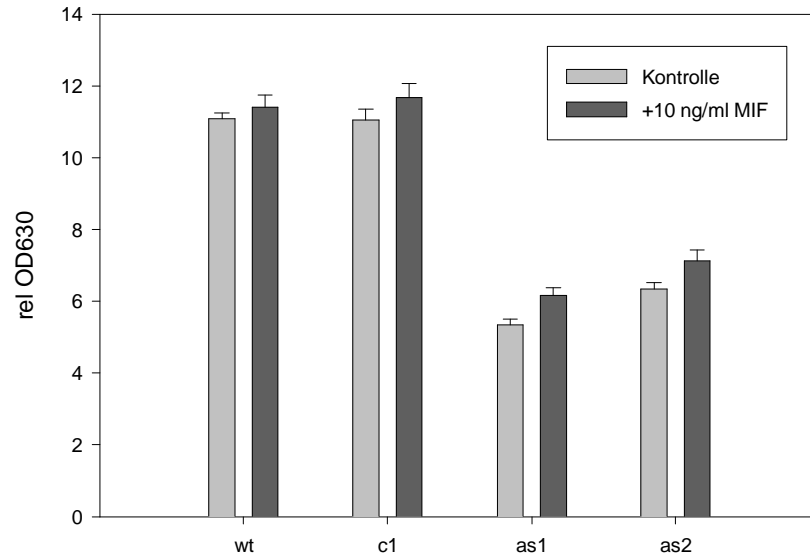


Abbildung 4.16: Amidoblack-Assay der Klone LN18 unter rec. MIF Stimulation

#### 4.2.4 Morphologie

Die as-Klone weisen auch unter normalen Zellkulturbedingungen eine andere Morphologie als die Kontrollen auf. Bei geringer Zelldichte (Abb. 4.17) fanden sich in den as-Klonen nur wenige Zellen, die in dichten Clustern wuchsen und insgesamt ein eher breiteres langgestrecktes Zellbild. Unter konfluenten Bedingungen (Abb. 4.18) waren die Unterschiede noch stärker zu erkennen: Die as-Klone behielten ihren breiteren länglichen Zelltypus bei, während die Kontrollen ein runderes kompakteres Erscheinungsbild zeigten. Darüberhinaus fanden sich im Zellüberstand auch vermehrt Zelltrümmer in den as-Klonen, was auf verstärkten Zelluntergang dieser Zellen bei hoher Konfluenz hindeuten könnte.

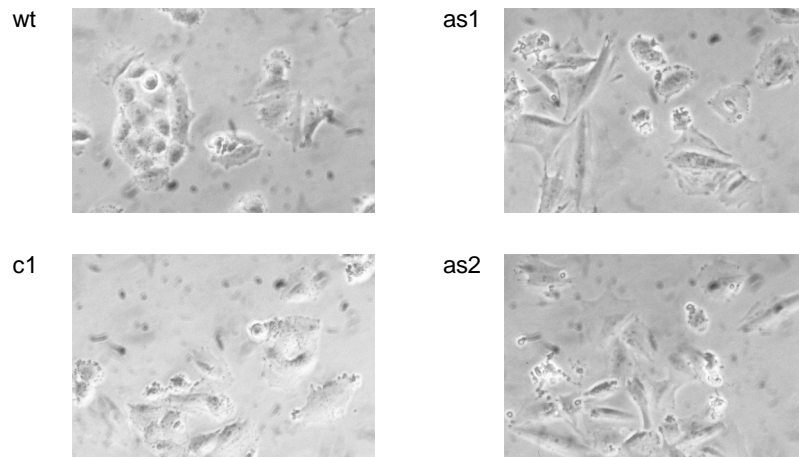


Abbildung 4.17: Zellkultur-Fotographie der Klone LN18 - niedrig konfluent

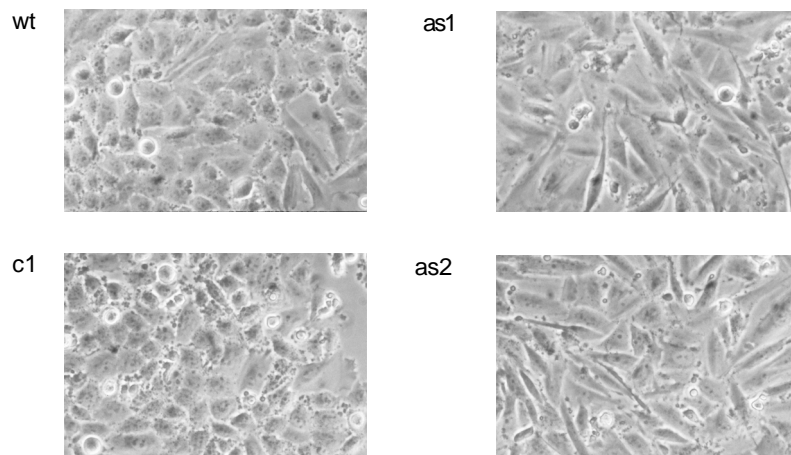


Abbildung 4.18: Zellkultur-Fotographie der Klone LN18 - hoch konfluent

## 4.3 Proliferationsanalysen

### 4.3.1 Monoklonale Antikörper

Die Blockade von endogen produziertem extrazellulärem MIF durch monoklonale anti-MIF Antikörper ermöglicht die Untersuchung von MIF-Effekten auch unter den Gegebenheiten einer hohen basalen MIF-Produktion von Zellen. Um den Einfluss von MIF auf das Wachstum der untersuchten Glioblastomzelllinien zu untersuchen, wurden verschiedene Antikörper ausgetestet (Abb. 4.19 und 4.20). Es zeigte sich hier für die LN18 Zellen nur ein geringer Effekt der eingesetzten Antikörper; wohingegen bei den LN229 Zellen mit den Antikörpern 6F12 und 12A4 eine Reduktion der Wachstumsrate beobachtet wurde.

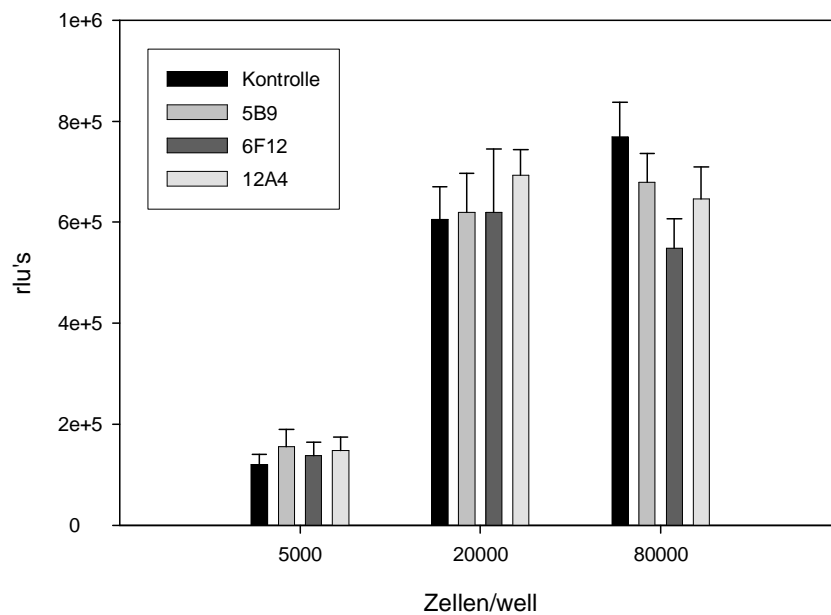


Abbildung 4.19: BrdU-Assay der Zellen LN18 mit verschiedenen monoklonalen anti-MIF Antikörpern

Um diesen Effekt weiter zu untersuchen, wurden die Zellen auch mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen behandelt (Abb. 4.21). Hier fand sich eine dosisabhängige Proliferationsinhibition für beide Antikörper, die bei hohen Zelldichten stärker ausgeprägt war als bei niedriger Zelldichte. Um unspezifische Einflüsse von

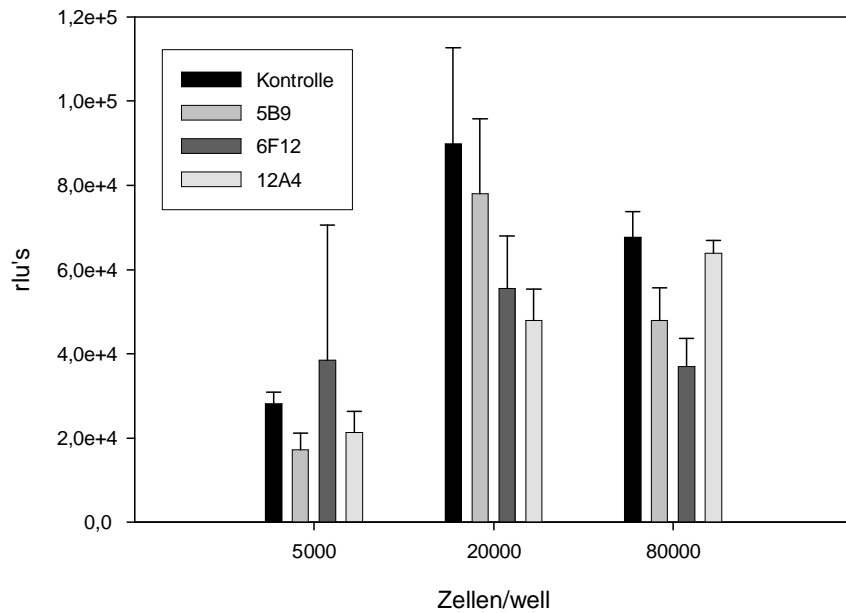


Abbildung 4.20: BrdU-Assay der Zellen Ln229 mit verschiedenen monoklonalen anti-MIF Antikörpern

den eingesetzten Antikörpern auszuschliessen, wurde in einem Kontrollexperiment ein unspezifischer monoklonaler Antikörper eingesetzt (Abb. 4.22). Es fand sich keine Auswirkungen des unspezifischen Antikörpers auf das Wachstum dieser Zellen.

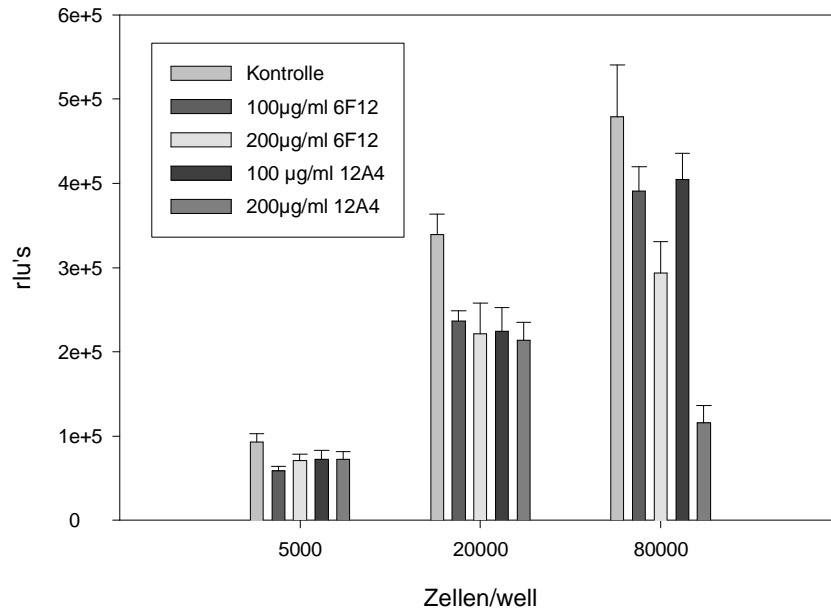


Abbildung 4.21: BrdU-Assay der Zellen LN229 mit anti-MIF Antikörpern 6F12 und 12A4

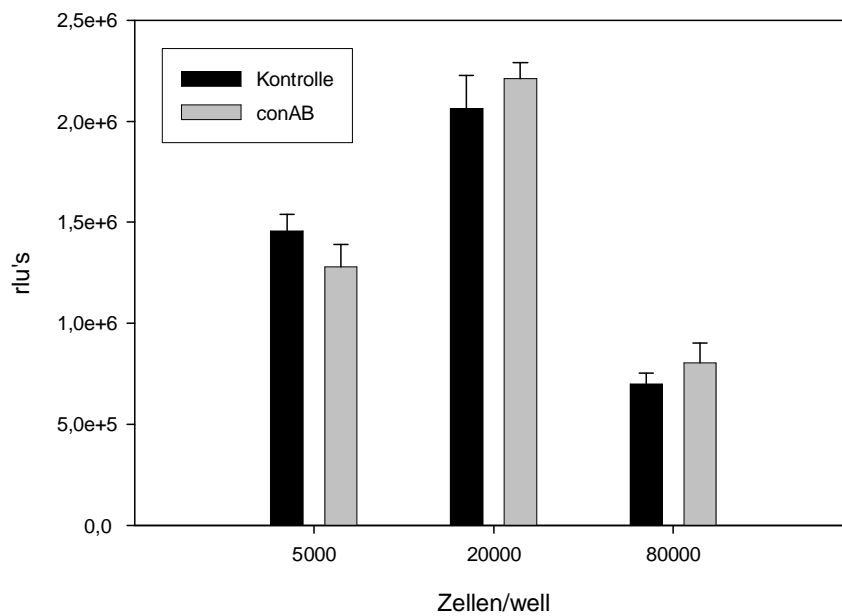


Abbildung 4.22: BrdU-Assay der Zellen LN229 mit Kontrollantikörper

### 4.3.2 MIF-Inhibitor

Die biologische Wirkung von MIF wurde schon oft mit der enzymatischen Tautomeraseaktivität von MIF in Verbindung gebracht. Durch die Hemmung dieser Eigenschaft mit dem spezifischen Inhibitor ISO-1 konnte der Einfluss auf das Wachstum der Glioblastomzellen untersucht werden. In den LN229 Zellen fand sich bei einer mittleren Zelldichte eine dosisabhängige Reduktion des Zellwachstums (Abb. 4.23). Betrachtet man den Einfluss des Inhibitors auf verschiedenen Zelldichten, so fand sich - wie schon bei den Antikörperexperimenten gezeigt - eine deutlichere Proliferationshemmung bei höheren Zelldichten (Abb. 4.24). Bei einer dichtgewachsenen Kultur war eine Wirkung von fast 70% Proliferationshemmung zu erzielen.

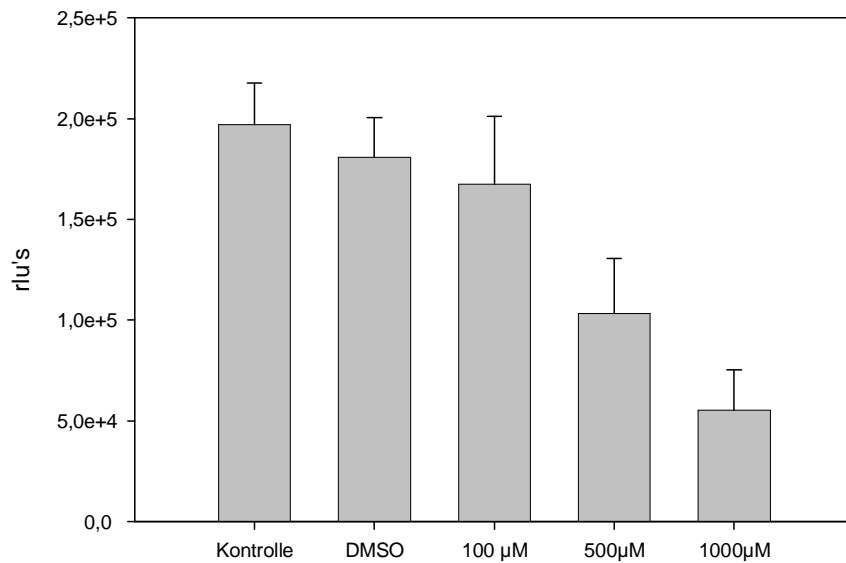


Abbildung 4.23: BrdU-Assay der Zellen LN229 mit verschiedenen Konzentrationen des MIF-Inhibitors ISO-1

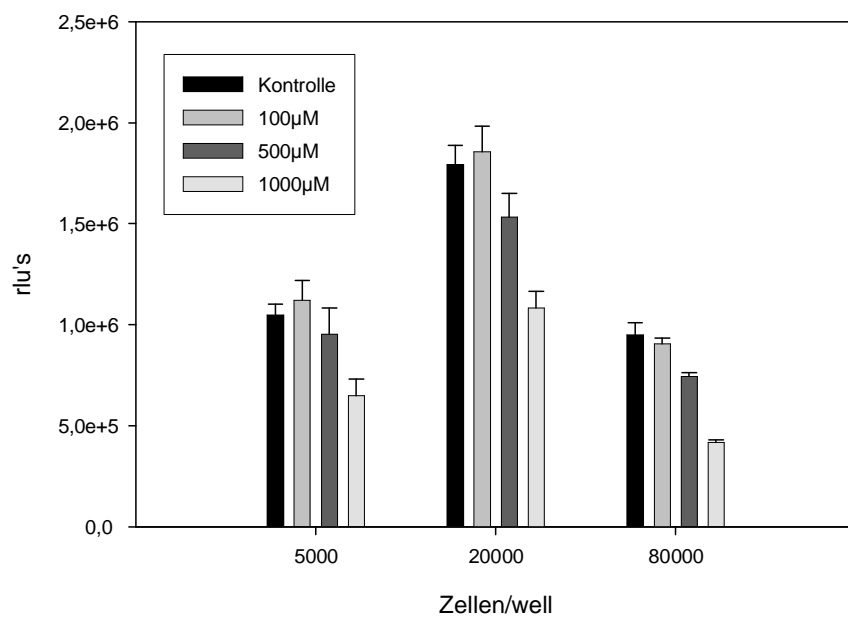


Abbildung 4.24: BrdU-Assay der Zellen LN229 mit verschiedenen Zelldichten und MIF-Inhibitor ISO-1

### 4.3.3 Rekombinanter MIF

Die Zugabe von rekombinantem MIF zu den Zellkulturen der Glioblastomzellen zeigte fast keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen (Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Dies mag auf den hohen endogenen MIF-Spiegel dieser Zellen zurückzuführen zu sein. Anders verhielt sich dieses bei den primären Fibroblastenkulturen; dort fand man einen Effekt des rec. MIFs. Es zeigte sich im BrdU-Assay über 16h eine klare Stimulation der Proliferation bei allen Zelldichten (Abb. 4.27). Ebenso sah man bei dichtgewachsenen - und somit eigentlich kontaktinhibierten - Kulturen eine Wachstumsstimulation durch MIF (Abb. 4.28). Interessanterweise fand sich die stärkste Stimulation nicht bei der höchsten MIF-Konzentration, sondern bei 50ng/ml. Auch im Langzeitwachstum zeigte sich ein Einfluss von MIF, welcher wiederum erst mit zunehmender Zelldichte klarer hervortrat (Abb. 4.29).

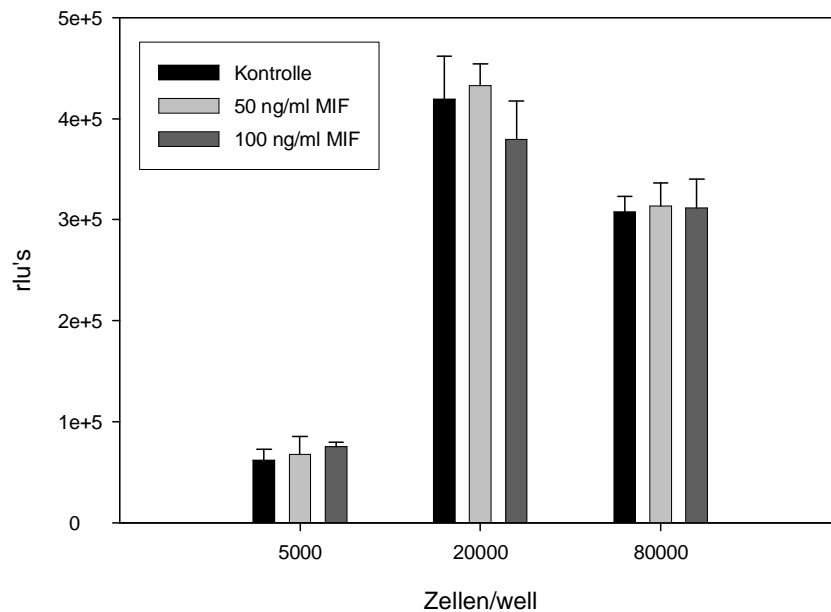


Abbildung 4.25: BrdU-Assay der Zellen LN18 mit rekombinantem MIF



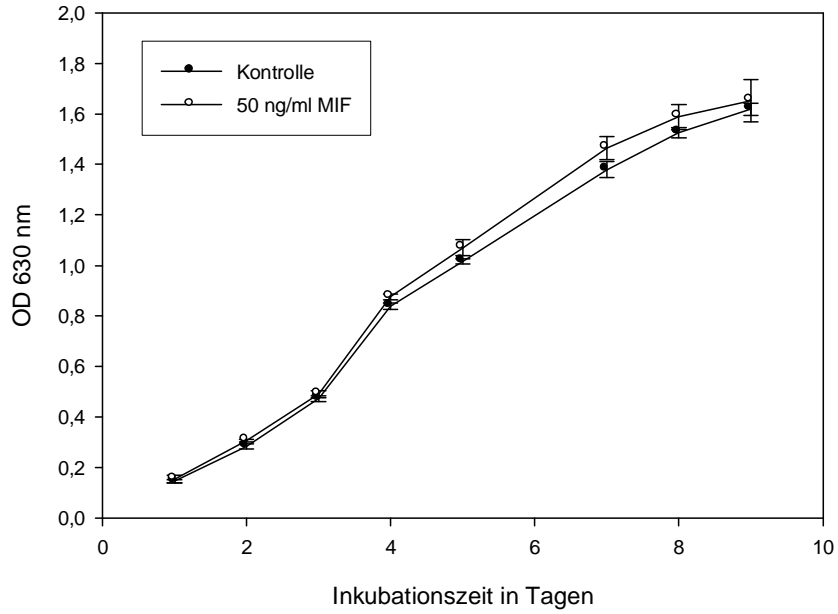


Abbildung 4.26: Amidoblack-Assay der Zellen LN18 mit rekombinantem MIF

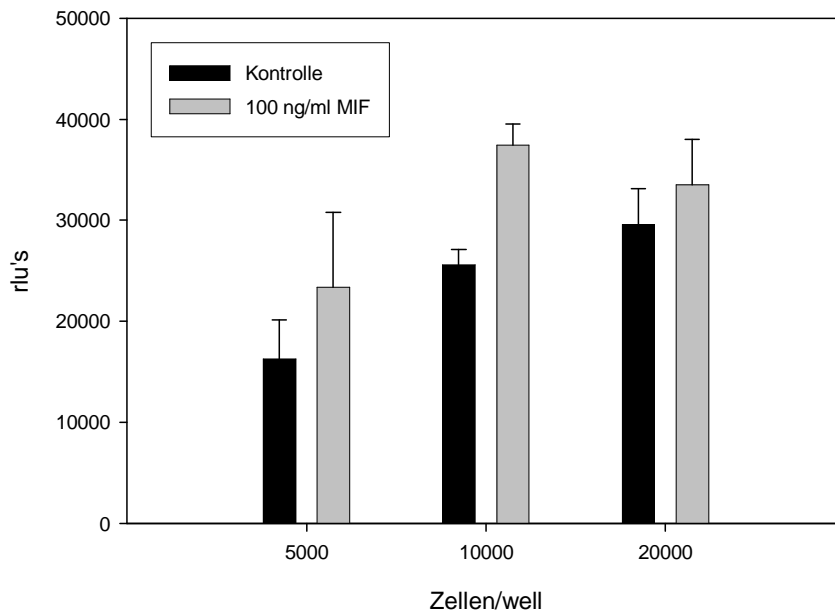


Abbildung 4.27: BrdU-Assay der Zellen HF mit rekombinantem MIF bei verschiedenen Zelldichten

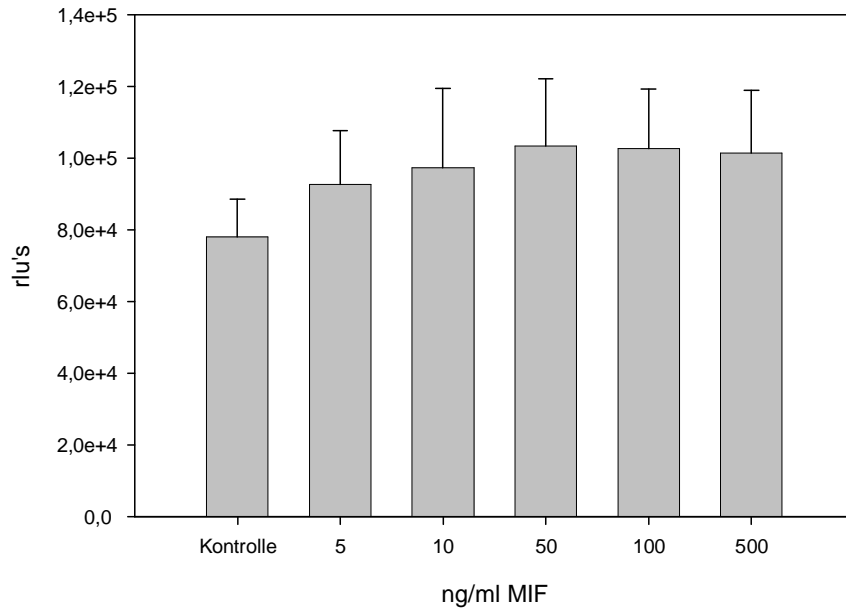


Abbildung 4.28: BrdU-Assay der Zellen HF bei dichtgewachsener Kultur mit rekombinatem MIF

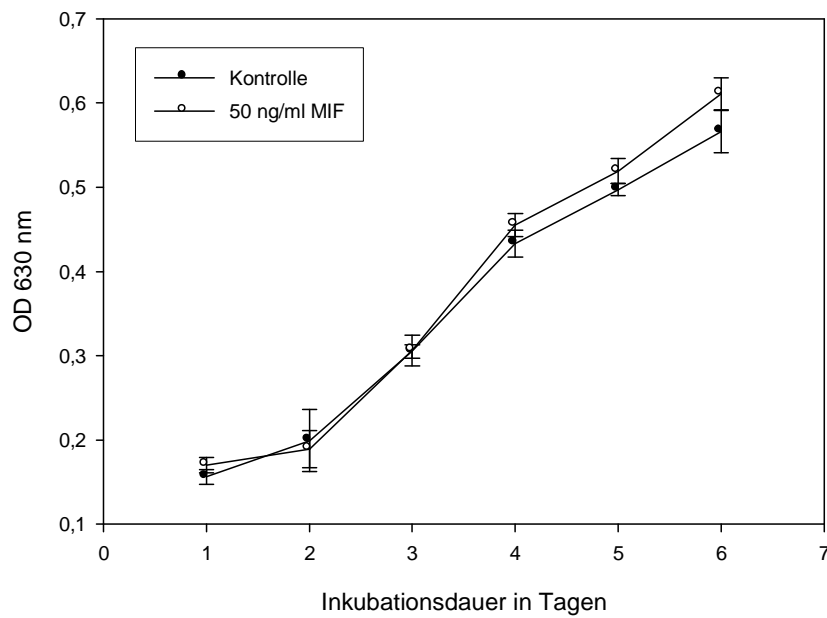


Abbildung 4.29: Amidoblack-Assay der Zellen HF mit rekombinatem MIF

## 4.4 Zelldichte

In vielen Tumoren herrscht eine im Vergleich zum umliegenden Gewebe erhöhte Zelldichte, trotzdem können die Tumorzellen unter diesen Bedingungen proliferieren. Ausserdem ist die hohe Zelldichte ein Stressfaktor für die Zellen. Somit stellt sich die Frage, ob die MIF Expression durch die Zelldichte reguliert wird. Im Northern Blot der beiden Glioblastomzelllinien LN18 und LN229, sowie der humanen primären Fibroblasten [HF], zeigte sich eine deutliche Regulation der MIF mRNA (Abb. 4.30). Interessanterweise war in den LN18 Zellen eine Steigerung der mRNA mit zunehmender Zelldichte zu beobachten, während bei den beiden anderen Zellen die MIF mRNA abnahm. Dies korreliert mit der proliferativen Aktivität der Zellen bei unterschiedlichen Zelldichten. Die LN18 Zellen zeigten eine fast gleichbleibende Wachstumsrate trotz hoher Zelldichten, wohingegen die LN229 bei hoher Zelldichte langsamer wuchsen (Abb. 4.31). Die Fibroblasten als primäre Zellen zeigten eine typische Kontaktinhibition bei dichtgewachsener Kultur.

Bei der Analyse der MIF Proteinexpression zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei jedoch auch in den LN229 und in den HF eine Zunahme des intrazellulären MIFs zu finden war (Abb. 4.32). Allerdings war die Zunahme in den LN18 Zellen am stärksten. Auch in den Zellkulturüberständen (Abb. 4.33) fand sich in den LN18 Zellen eine stärkere MIF Konzentration als in den beiden anderen Zelllinien; es zeigte sich aber keine eindeutige Regulation des extrazellulären MIF-Spiegels.

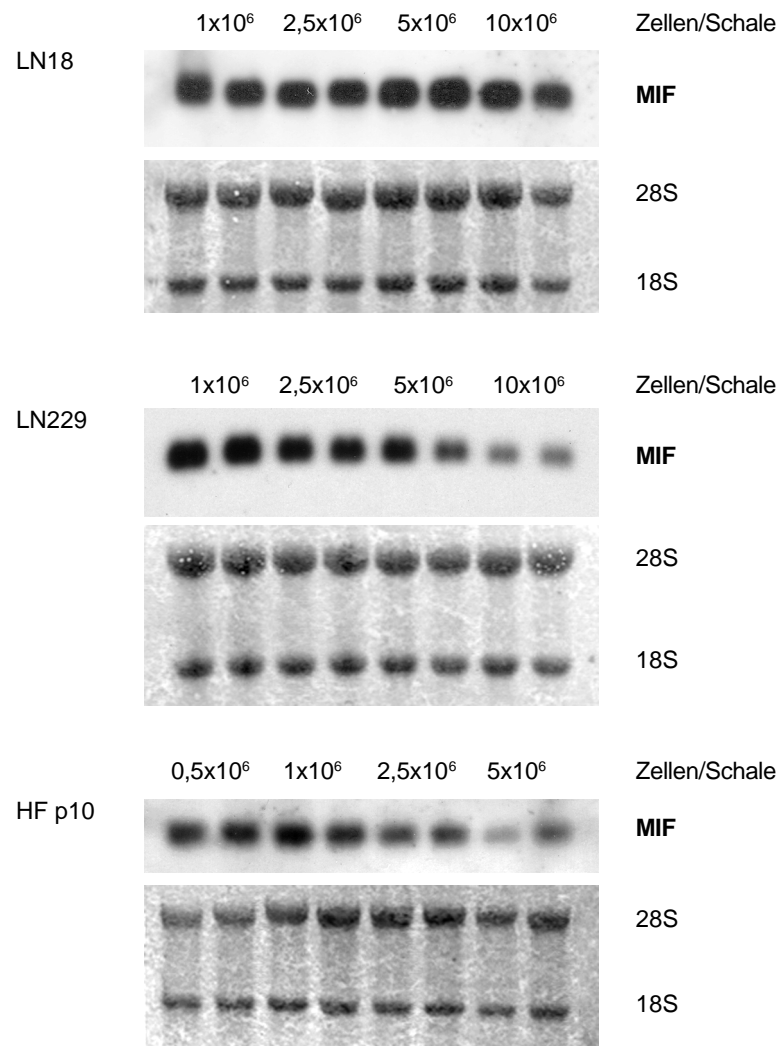


Abbildung 4.30: Northern Blot der Zellen LN18, LN229 und HF bei unterschiedlichen Zelldichten

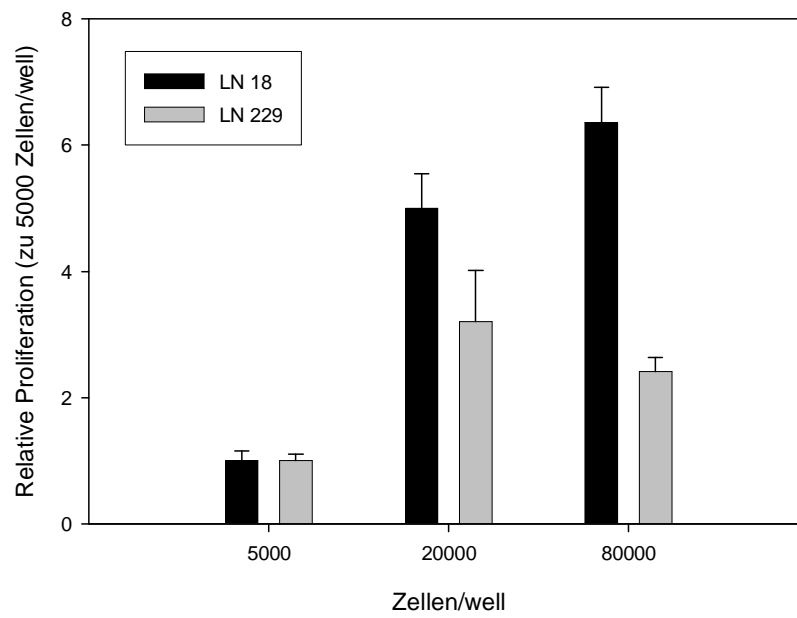


Abbildung 4.31: Vergleich der Proliferation der Zellen LN18 und LN229 bei unterschiedlichen Zelldichten

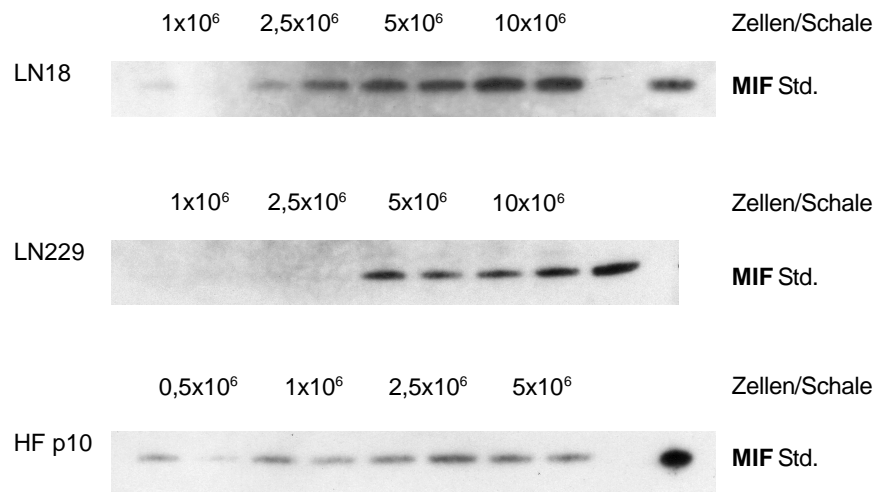


Abbildung 4.32: Western Blot der Zellen LN18, LN229 und HF bei unterschiedlichen Zelldichten

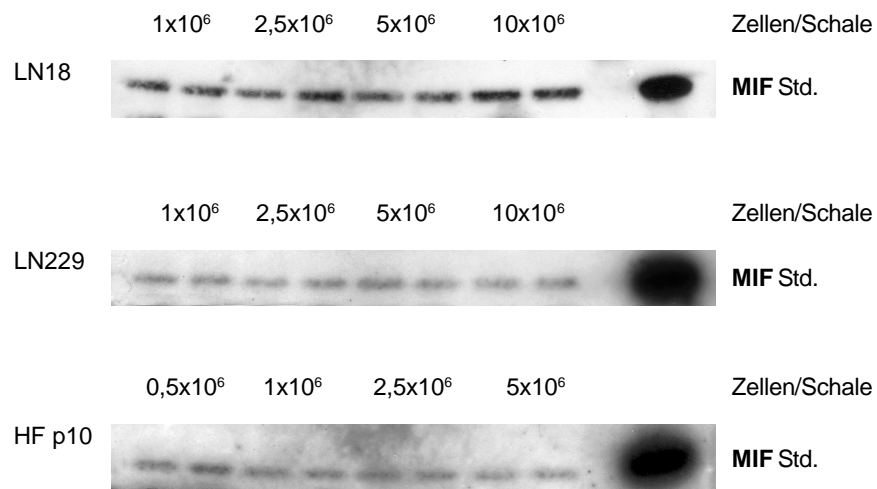


Abbildung 4.33: Western Blot der Zellkulturüberstände LN18, LN229 und HF bei unterschiedlichen Zelldichten

## 4.5 AKT-Aktivierung

Botenstoffe wirken auf Zellen über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die meist mit einer Phosphorylierung von bestimmten Signalproteinen in den Zellen einhergehen. Das AKT Protein, auch Proteinkinase B genannt, nimmt eine zentrale Stelle in der Weitergabe von proliferativen und antiapoptotischen Signalen ein [41]. In vielen Tumorzellen ist diese Kinase konstitutiv aktiviert, so auch in den LN18 Zellen (Daten nicht gezeigt). In den LN229 Zellen dagegen findet sich keine konstitutive Aktivierung dieses Signalweges. Diese Zellen wurden nun unter verschiedenen FCS-Konzentrationen mit rekombinantem MIF stimuliert (Abb. 4.34). Es fand sich eine dosisabhängige Stimulation der Akt-Phosphorylierung bei 0%FCS, welche bei 50ng/ml MIF nach 15min ihr Maximum erreichte. Nach 60min hat sich das Maximum auf eine geringere Konzentration verschoben. Unter einer geringen Serummenge fand sich keine zusätzliche Induktion der Akt-Aktivierung, wohingegen bei 5%FCS in der Vorinkubation eine weitere Steigerung des Signals durch MIF erfolgte. Auch bei den als Kontrollzellen untersuchten humanen Fibroblasten fand sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Akt, somit scheint dieser Signalweg nicht ausschliesslich auf Tumorzellen beschränkt zu sein.

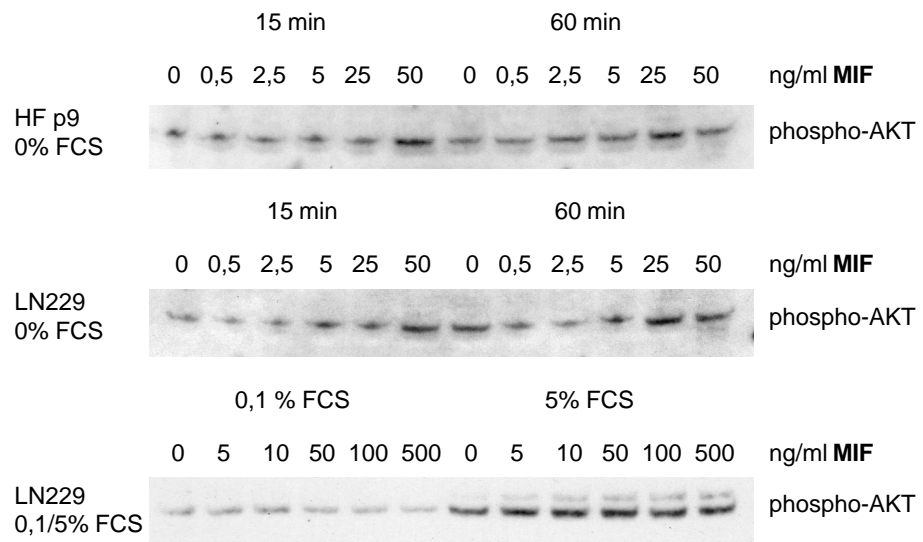


Abbildung 4.34: Phospho-AKT Western Blot der Zellen LN229 und HF nach Stimulation mit rekombinantem MIF



**Kapitel 5**

**Diskussion**

## 5.1 MIF als Angiogenesefaktor

Eine ausgeprägte Neoangiogenese ist ein Kennzeichen maligner Tumoren. Das Einsprossen und Ausreifen von Gefässen sichert dem Tumor trotz Massenzunahme eine ausreichende Nährstoffversorgung. Dieser Prozess wird durch eine Vielzahl von Proteinen und Botenstoffen ausgelöst und reguliert [15, 47, 55]. Die Expression dieser Cytokine wird durch Folgen der Mangelversorgung in den Tumorzellen reguliert. So führen Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu einer erhöhten Expression von VEGF, einem klassischen Angiogenesefaktor [94]. Ausgehend von den Beobachtungen einer reduzierten Tumorkaskularisierung durch Anti-MIF Behandlung in einem Lymphommodell [81] und einer erhöhten MIF-Expression im Randbereich von Tumornekrosen in humanen Glioblastomgewebe, stellte sich die Frage, ob MIF ein durch Zellstress induzierbarer Angiogenesefaktor für humane Glioblastome ist.

In der Zellkultur von humanen Glioblastomzelllinien konnte gezeigt werden, dass sowohl Sauerstoff- als auch Glukosemangel nach 12h zu einer erhöhten Expression der MIF mRNA führten (Abb. 4.1 und 4.2). In einem Screening von Plattenepithelkarzinomzellen mittels der Microarray-Technologie wurde MIF als ein nach 18h Hypoxie induziertes Gen identifiziert [62] - somit findet sich eine vergleichbare Kinetik für diese beiden Tumormodelle. Eine andere Untersuchung an einer Makrophagen-Zelllinie fand keine Regulation des MIF-Gens durch Hypoxie - allerdings wurde hier nur der Zeitraum bis 90 min beobachtet [116]. Die Regulation dieser deNovo-Expression der MIF mRNA wurde durch eine Luciferasereporterstudie in der murinen Gliomazelllinie RGL3 bestätigt [11]. Die Frage nach dem entscheidenden Transkriptionsfaktor dieser Induktion bleibt offen, da viele der Faktoren, die auf dem MIF-Promoter Bindungsstellen haben, durch Hypoxie aktiviert werden; dies wurde in der Zellkultur gezeigt für NF-kappaB, AP-1 und SP-1 [6, 61].

Neben der mRNA-Induktion für MIF durch Hypoxie und Hypoglykämie fanden sich auch erhöhte MIF-Proteinspiegel im Überstand der Zellkulturen (Abb. 4.3 und 4.4). Dies liess sich allerdings nur für die LN18 Zellen zeigen; bei den LN229 Zellen fand keine Freisetzung ins Kulturmedium statt. Bei den LN18 Zellen fand man mit

zunehmender Inkubationsdauer eine verstärkte Freisetzung von LDH in den Überstand, was ein Hinweis auf akute nekrotische Prozesse ist. Die LN229 Zellen zeigten keine Anzeichen von Zellschädigung (und keine LDH Freisetzung). Wenn man postuliert, dass MIF nicht reguliert sezerniert wird, sondern „nur“ passiv bei Zelluntergang freigesetzt wird, so könnte dies ein Grund für das fehlende MIF-Protein im Überstand der Zellen LN229 sein. Allerdings fand sich der MIF-Anstieg im Überstand vor dem LDH-Anstieg, so dass es sich vielleicht um eine Kombination einer aktiven Sezernierung und passiven Freisetzung handelt. In einer Arbeit an Influenza-Viren infizierten Epithelzellen wurde ebenfalls eine MIF Freisetzung bei Zellnekrose beschrieben, und es konnte gezeigt werden, dass die Bioaktivität von MIF dabei erhalten blieb [5]. Somit wäre auch eine passive Freisetzung von MIF für die Zellen im Gewebeverband sinnvoll.

In nicht-entarteten Kontrollzellen (primären humanen Fibroblasten) wurde keine MIF Sekretion unter Hypoxie beobachtet (Abb. 4.7); wobei sich die VEGF-Sekretion unter Hypoxie dagegen in den primären Zellen nachweisen liess (Abb. 4.8). Andererseits findet man in einem Reperfuisionsmodell des Gehirns (ein Modell für hypoxische Schädigung) eine MIF mRNA-Induktion im normalen Hirngewebe [125]. Es bleibt also die Frage, ob die MIF-Induktion unter Hypoxie eine tumorspezifische Reaktion ist, oder eine allgemeine Reaktion auf Zellstress darstellt.

Im Zusammenhang mit hypoxischem Zellstress und der damit verbundenen synchronen Produktion von anderen „klassischen“ Angiogenesefaktoren wie VEGF und IL-8 kann MIF synergistisch bei Ausbildung neuer Blutgefäße mitwirken. MIF fördert nicht nur die Migration und Proliferation von Endothelzellen, sondern auch die Ausreifung zu funktionsfähigen Gefäßen [3]. Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass der proliferative Effekt von VEGF auf Endothelzellen durch anti-MIF Antikörper blockierbar ist [86], was ein Hinweis auf eine synergistische Wirkung von VEGF und MIF sein könnte. Auf der anderen Seite ist aber auch die Sekretion von VEGF und IL-8 in Tumorzellen durch MIF stimulierbar [98, 97].

Ein anderer Wirkort des in den Tumorzellen auf Stressreize produzierten MIFs könnte in einer parakrinen und autokrinen Weise die Tumorzellen selbst sein. MIF

ist in der Lage, in der Zellkultur Apoptose zu verhindern und das Überleben unter Stressbedingungen zu erhöhen [46, 85]. So findet man bei anti-MIF behandelten Tumoren im Tiermodell eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen [1]. Ein Mechanismus für diese Effekte ist die Hemmung von p53 in den Zellen, einem zentralen Regulator für apoptotische Prozesse und dem Zellzyklus [46, 80]. Auch in Glioblastomen findet sich eine Koloaktion von MIF und p53 [11]. Weiterhin ist eine Hemmung der Spaltung von Proteinen der Bcl-2 Familie und Freisetzung von Caspase-3 durch rekombinantes MIF in Neutrophilen beschrieben worden [13].

## 5.2 MIF als Wachstumsfaktor

Wachstumsfaktoren sind essentiell für alle Zellen, um überleben und proliferieren zu können. Obwohl in Tumorzellen ein autonomes, unreguliertes Wachstum stattfindet, bleiben auch sie von Wachstumsfaktoren abhängig. Allerdings findet sich oft eine Veränderung der Rezeptorfunktion oder des Signaltransduktionsweges für Wachstumsfaktoren.

Bei immunhistochemischen Färbungen ist in allen bisher untersuchten Tumoren eine MIF-Expression gefunden worden [21, 31, 53, 68, 98, 121]. Auch bei der *in vitro* Kultivierung von Tumorzelllinien findet sich eine MIF-Expression und Sekretion in einer Vielzahl von Zellen [98, 99, 107, 113]. Neben den Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe [11], haben zwei weitere Gruppen die Expression von MIF auf mRNA- und Proteinebene in humanen Glioblastomen bestätigt [75, 82].

Die Expression von MIF in den humanen Glioblastomzelllinien LN18 und LN229 wurde in dieser vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Es fand sich hierbei eine deutliche Abhängigkeit der MIF-Expression von der Zelldichte (Abb. 4.30, 4.32 und 4.33), welche zusätzlich mit der Proliferationsaktivität der Zellen korreliert (Abb. 4.31). Die LN18 Zellen zeigten die höchste MIF-Expression und waren die am schnellsten wachsenden Zellen. In den primären Fibroblasten fand sich ebenfalls eine zelldichteabhängige MIF-Expression - allerdings nahm der Spiegel mit zunehmender Zelldichte (und damit zunehmender Kontaktinhibition) ab.

Erstmals 1998 wurde gezeigt, dass MIF ein Wachstumsfaktor für Kolontumor-

zellen sein kann [113]. Es gelang hier durch eine Antisense Blockierungsstrategie die MIF-Produktion der Tumorzellen zu reduzieren, was zu einer Abnahme der Zellzahl im Vergleich zu nicht behandelten Zellen nach 96h führte. Gleiches wurde auch für humane Melanomazellen gezeigt [107]. In beiden Fällen wurde allerdings lediglich die Zellzahl über deren Stoffwechselaktivität gemessen und somit keine direkte Aussage über die Proliferation getroffen. Eine erster Hinweis auf einen direkten Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen erfolgte in einer Studie mit murinen und humanen Kolonkarzinomzelllinien, in der erstmals ein Effekt auf die BrdU-Inkorporation der Zellen durch antisense MIF-Transfektion beobachtet wurde [103]. Im nachfolgenden wurde auch durch Blockade des extrazellulären MIFs durch anti-MIF Antikörper eine Hemmung der Tumorerproliferation *in vitro* und *in vivo* beschrieben [81, 86]

In den in dieser Arbeit beschriebenen stabilen antisense MIF-Klonen der Tumorzelllinie LN18 fand sich ein reduzierter BrdU-Einbau im Vergleich zu Wildtyp- und Kontrollzellen (Abb. 4.14) als Indiz für eine reduzierte Proliferation dieser Zellen. Allerdings war dieser Effekt bei niedrig konfluenten Zellen moderat und erst bei konfluenten Zellkulturen fand sich eine deutliche Reduktion des Wachstums der Zellen. Dies konnte auch in einem Langzeitproliferationsassay bestätigt werden; auch hier fanden sich zwischen as-Klonen und Kontrollen in den ersten Tagen (bei niedriger Zelldichte) wenig Unterschiede. Nach 4 Tagen war aber schon ein verlangsamtes Wachstum der Zellen zu beobachten, und es fand sich am Ende der Beobachtungszeit eine viel geringere (End-) Zelldichte (Plateauphase) als in den Kontrollen (Abb. 4.15). Der Zusammenhang dieser Effekte mit einem reduzierten MIF-Proteingehalt der Zellen wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.13). Im Northern Blot fand sich neben der antisense MIF-Expression auch eine deutliche Erhöhung der MIF sense mRNA, welche eine gegenregulatorische Massnahme der Zellen als Reaktion auf die verminderten Proteinspiegel sein könnte. Durch Zugabe von rekombinantem MIF konnte nur eine geringfügige Steigerung der Proliferation in den as-Klonen erreicht werden; dies mag an der Schwierigkeit gelegen haben, die endogenen MIF-Spiegel adäquat zu simulieren. In weiterführenden Experimenten versuchten wir Wildtyp- und MIF-antisense-Klone in Nacktmäuse zu injizieren.

Diese Experimente konnten allerdings nicht verwertet werden, da weder Wildtyp noch antisense-Klone in den Nacktmäusen anwuchsen. Wir vermuten, dass die Passagennummer (größer als 600) der verwendeten Zellen und der damit verbundenen selektiven Anpassung an die Zellkulturbedingungen ein Grund dafür waren, dass die Zellen nicht *in vivo* propagiert werden konnten.

In einer zweiten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass sich mit einem anti-MIF Antikörper das Wachstum von Glioblastomzellen hemmen lässt. Während sich bei den LN18 Zellen nur geringe Effekte zeigten, liess sich das Wachstum der LN229 Zellen durch den Antikörper deutlicher beeinflussen. Diese Unempfindlichkeit der LN18 Zellen für die MIF-Blockade kann in der hohen MIF-Expression dieser Zellen im Vergleich zu LN229 begründet sein. Wie auch bei den antisense MIF-Klonen zeigte sich eine stärkere Wirkung bei hohen Zelldichten. Die eingesetzten Mengen an Antikörper sind vergleichbar mit denen von anderen Gruppen [81, 86]. Ebenso liegen die erreichten Proliferationsreduktionen (maximal 50%) im Bereich dessen, was auch in anderen Studien beschrieben wurde.

Eine dritte Strategie zur Blockade der MIF-Wirkung auf die Zellen war die Hemmung der enzymatischen Aktivität von MIF durch einen spezifischen Inhibitor ISO-1 [72]. Durch Zugabe von ISO-1 konnte in den LN229 Zellen eine Reduktion des Wachstums von bis zu 60% erreicht werden. Eine Toxizität bei den eingesetzten Konzentrationen (100 $\mu$ M - 1000 $\mu$ M) wurde nicht beobachtet. Vergleicht man diese Konzentrationen mit der IC<sub>50</sub> für die Hemmung enzymatische Aktivität von MIF von 7 $\mu$ M, so fällt ein Unterschied um nahezu Faktor 100 auf. Man muss aber deutlich hervorheben, dass in biologischen Systemen - wie der Zellkultur - andere Bedingungen herrschen als in chemischen Reaktionsassays und dass die Zellen die Möglichkeit haben, durch Freisetzung von MIF aus intrazellulären Speichern und Neusynthese des Proteins die extrazelluläre MIF Konzentration massiv zu erhöhen.

Bei allen drei untersuchten MIF-Blockierungsstrategien fällt auf, dass die stärksten Effekte der MIF-Hemmung bei hohen Zelldichten erzielt wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass MIF ein wichtiger autokriner Faktor zur Überwindung der - in nicht-entarteten Zellen normalerweise vorhandenen - Kontaktinhibition in Tumorzellen ist.

Eine indirekte Bestätigung dieser These fand sich in MIF-knockout Fibroblasten: Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen war die Proliferationsgeschwindigkeit reduziert und die maximal erreichbare Zelldichte erheblich reduziert [93]. Desgleichen zeigten sich die untersuchten MIF -knockout Fibroblasten resistenter gegen eine Ras-vermittelte maligne Transformation und behielten ihre Kontaktinhibition bei, wohingegen sich Wildtyp-Zellen einfacher transformieren liessen und ihre Kontaktinhibition verloren. Da der Verlust der Kontaktinhibition ein zentrales Ereigniss in der malignen Transformation von Zellen ist, lässt sich spekulieren, ob die erhöhte Expression von MIF in Tumoren und die daraus abgeleiteten klinischen Prognosen mit der Überwindung der Kontaktinhibition in Verbindung stehen [2, 68].

Der Einsatz von rekombinantem MIF zeigte in den untersuchten Zelllinien keinen Effekt auf die Proliferation. Dies mag zum Teil an den hohen endogenen MIF-Spiegeln der Zellen liegen. Nur bei den Fibroblasten - als nicht entartete Zellen - findet sich eine Reaktion auf die Gabe von rekombinantem MIF; allerdings nur unter Serumentzug. Bei normalen Kulturbedingungen mit 10% FCS im Medium findet eine endogene Freisetzung von MIF durch Wachstumsfaktoren statt [81, 113] . Durch zusätzliche MIF-Gabe liess sich kein weiterer Effekt erreichen, und es scheint, dass sehr hohe MIF-Spiegel einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen haben. Ähnlich wie in den Versuchen mit embryonalen Mausfibroblasten [46] fand sich auch in den humanen Fibroblasten bei der Proliferation ein glockenförmiger Verlauf der Dosiswirkungskurve (Abb. 4.28). Die größte Wachstumssteigerung erhält man bei MIF-Konzentrationen um 50ng/ml, welches etwa den physiologischen Spiegeln entspricht. Mit viel höheren Konzentrationen lässt sich aber ein antiproliferativer Effekt erzielen, der über die Bindung von MIF an Jab-1 vermittelt wird [57]. Ob die physiologische Funktion dieser Bindung an Jab-1 wirklich die Antiproliferation ist, bleibt zu bezweifeln; viel eher könnte es sich um einen negativen Feedback-Mechanismus der MIF-Transkription handeln, da die Inaktivierung von Jab-1 die Aktivität von AP-1 hemmt, welches einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren auf dem MIF-Promoter ist.

Viele Zytokine, die von aussen auf Zellen wirken, bedienen sich einer Vielzahl

von Signaltransduktionswegen. Für MIF ist bisher in Tumoren die Aktivierung der MAPK-Kaskade beschrieben worden [81, 97]. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine Aktivierung des Akt-Signalweges in LN229 Tumorzellen beschrieben. Bisher war dies nur für Endothelzellen gezeigt worden. Die effektive Konzentration in beiden Systemen ist mit 50ng/ml MIF identisch. Interessanterweise verschiebt sich bei längerer Inkubation (60 min) das Wirkungsmaximum zu niedrigeren Konzentration - ein Hinweis darauf, dass langandauernde Aktivierungen eher bei niedrigeren MIF-Mengen zu erwarten sind. Diese Untersuchungen sind allein in den LN229 Zellen durchgeführt worden, da sich in den LN18 Zellen eine konstitutive Aktivierung des Akt-Signalweges findet.

### 5.3 Modell der MIF-Wirkung in Tumoren

Im folgenden soll ein Modell dargestellt werden, wie - aufgrund des derzeitigen Forschungsstandes und der eigenen Ergebnisse - die Expression und Funktion von MIF in Tumoren zusammengefasst werden kann [Abb. 5.1].

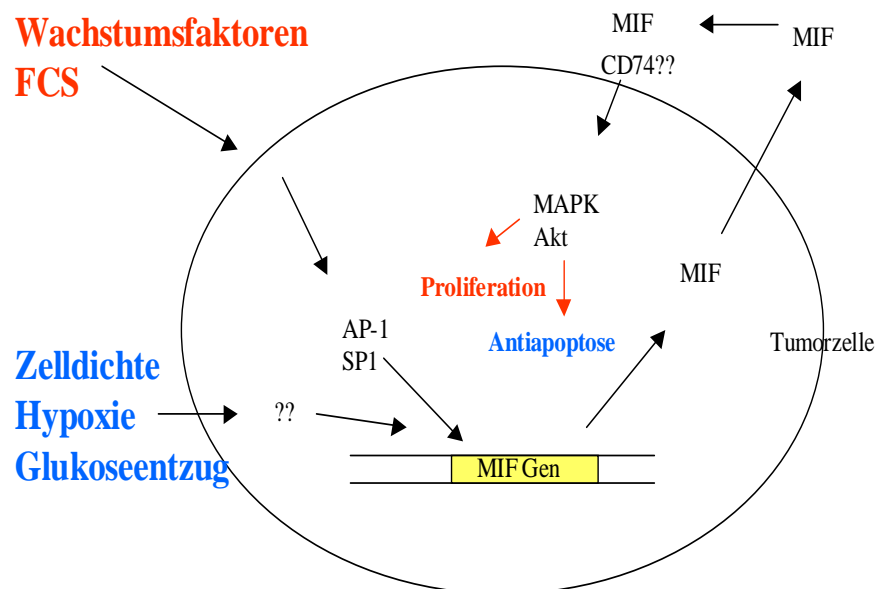


Abbildung 5.1: Schema der Regulation und Funktion von MIF in Tumorzellen



Am Anfang steht die Induktion der MIF-Transkription durch Wachstumsfaktoren und andere Serumproteine (FCS), bzw. durch verschiedene Zellstress-Stimuli. Dieser MIF wird nun aus den Zellen freigesetzt und wirkt sowohl autokrin als auch parakrin über einen noch nicht endgültig charakterisierten Zellmembranrezeptor auf die sezernierende Zelle zurück. Dort führt MIF zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade und des Akt-Signalweges. Über diese Signaltransduktion wird die Wirkung auf Proliferation und Überleben der Zellen vermittelt.

## 5.4 MIF Blockierung als Therapieoption bei Tumoren

Es finden sich in vielen Tumoren Effekte von MIF, die das Tumorwachstum und die Progression der Tumorerkrankung begünstigen. Von daher ist es naheliegend sich die Blockierung von MIF als eine neue antitumoröse Therapie vorzustellen. Es ergeben sich vier mögliche Ansatzpunkte für die Wirkung einer anti-MIF-Therapie:

1. Direkte Proliferationshemmung der Tumorzellen
2. Aufhebung der durch MIF vermittelten Anti-Apoptose
3. Hemmung der Angiogenese in den Tumoren
4. Sensitivierung der Tumorzellen für Chemo- und Strahlentherapie

Für die Punkte 1.-3. sind bereits vielfältige Versuche in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* durchgeführt worden. Ebenfalls haben sich in *in-vivo*-Modellen Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit dieser „Angriffswege“ ergeben. Ein weiterer anti-MIF-Effekt könnte über die Sensibilisierung der Tumorzellen für eine apoptoseinduzierende Chemo- oder Strahlentherapie wirksam sein. Es wäre möglich, dass die Zellen auf die eingesetzten Therapeutika mit einer MIF-Synthese reagieren, um so über einen anti-apoptotischen Effekt des MIFs dem Zellstress zu entgehen. Blockiert man nun den entstehenden MIF, wären die Zellen weniger resistent und man könnte mit niedrigeren Dosen mehr Zellen erreichen.

Um die Wirkung von MIF in Tumoren zu blockieren, gibt es verschiedene Strategien. Die gentechnische Veränderung von Tumorzellen durch antisense Transfektion ist zwar ein gutes *in vitro* Modell, kann aber *in vivo*, oder gar in therapeutischer Absicht am Menschen schlecht angewandt werden. Einen besseren Ansatz bietet hier

die Generierung MIF-spezifischer siRNAs, die auch *in vivo* in die Tumorzellen zu injizieren wären. Es bleibt auch die Möglichkeit über tumorspezifische virale Konstrukte genetisches Material in Zellen einzuführen, aber auch hier ist die Forschung noch nicht in der Lage, spezifisch Tumorzellen zu adressieren und gesundes Gewebe zu schonen.

Die Verwendung von anti-MIF Antikörpern ist ein weiterer Ansatzpunkt zur Blockade von MIF, allerdings ist die Verabreichung von Fremdproteinen immer mit einer Vielzahl von Problemen verbunden. Der meiner Ansicht nach erfolgsversprechendste Ansatz ist die Blockade von MIF durch spezifische kleine Moleküle, die die enzymatische und biologische Aktivität von MIF hemmen. In dieser Arbeit wurde erstmals der MIF-Inhibitor ISO-1 an Tumorzellen getestet und erste positive Ergebnisse im Hinblick auf eine Proliferationshemmung der Tumorzellen beobachtet.

Bei all diesen Strategien muss aber bedacht werden, wie normales Gewebe auf eine Blockierung von MIF reagiert, wenn man sich die Vielzahl von Funktionen, die MIF physiologischer Weise ausübt, vor Augen hat. In den bisher durchgeführten Untersuchungen im Mausmodell, bei denen MIF durch Antikörper bzw. Inhibitor blockiert wurde, zeigten sich allerdings keine gravierenden Nebenwirkungen. Ob dieses ebenso für die Langzeitanwendung gilt, bleibt abzuwarten. Gerade im Hinblick auf den immunsuppressorischen Effekt einer anti-MIF-Therapie und die mögliche Abschwächung der körpereigenen Immunantwort gegen den Tumor, sollte dies in ausreichend großen Studien untersucht werden.

Die *in vitro*-Daten dieser Doktorarbeit legen eine wichtige Rolle für MIF in der Tumorentstehung und Tumorprogression der Glioblastome nahe. Trotz aller noch bestehender Schwierigkeiten in der Anwendung und noch unbekannter Nebenwirkungen zeigt sich doch, dass die Blockierung von MIF in Tumoren ein erfolgsversprechendes Ziel für künftige Tumortherapien darstellt. Dieses Ziel gilt es in Studien im Tiermodell weiterzuverfolgen, um die Wirkung der MIF-Blockade in komplexeren biologischen Systemen zu untersuchen. Wenn diese Studien die Ergebnisse aus der Zellkultur bestätigen, wäre die therapeutische Anwendung am Menschen eine logische Konsequenz. Für die Patienten, die am Glioblastom erkrankt sind, könn-

te die Blockierung der MIF-Produktion des Tumors eine neue Perspektive in der Behandlung dieser bisher therapierefraktären Tumore darstellen.

# Literaturverzeichnis

- [1] Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the ctl response by macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Immunology*, 166(2):747–753, 2001.
- [2] Abercrombie M. Contact inhibition and malignancy. *Nature*, 281(5729):259–262, 1979.
- [3] Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circulation Research*, 93:321–329, 2003.
- [4] Apte RS, Sinha D, Mayhew E, Wistow GJ, Niederkorn JY. Role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting nk cell activity and preserving immune privilege. *Journal of Immunology*, 160:5693–5696, 1998.
- [5] Arndt U, Wennemuth G, Barth P, Nain M, Al-Abed Y, Meinhardt A, Gemsa D, Bacher M. Release of macrophage migration inhibitory factor and cxcl8/interleukin-8 from lung epithelial cells rendered necrotic by influenza a virus infection. *Journal of Virology*, 76(18):9298–9306, 2002.
- [6] Ausserer WA, Bourrat-Floeck B, Green CJ, Laderoute KR, Sutherland RM. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Molecular and Cellular Biology*, 14(8):5032–5042, 1994.
- [7] Bacher M, Eickmann M, Schrader J, Gemsa D, Heiske A. Human cytomegalovirus-mediated induction of mif in fibroblasts. *Virology*, 299(1):32–37, 2002.

- [8] Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabar F, Mu W, Metz CN, Chesney J, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R. Mif expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Molecular Medicine*, 4:217–230, 1998.
- [9] Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins, RC, Bucala R. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *American Journal of Pathology*, 150:235–246, 1997.
- [10] Bacher M, Metz, CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for mif in t-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93:7849–7854, 1996.
- [11] Bacher M, Schrader J, Thompson N, Kuschela K, Gemsa D, Waeber G, Schlegel J. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor gene and protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *American Journal of Pathology*, 162(1):11–17, 2003.
- [12] Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ, Wolfe F, Gregersen PK, Bucala R. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (mif) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immunology*, 3(3):170–176, 2002.
- [13] Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB Journal*, 17(15):2221–2230, 2003.
- [14] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361(9354):323–331, 2003.
- [15] Bello L, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Costa F, Bikfalvi A. Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treatment Research*, 117(263-284):263–284, 2004.

- [16] Bendrat K, AL-Abed Y, Callaway DJ, Peng T, Calandra T, Metz, CN, Bucala R. Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry*, 36:15356–15362, 1997.
- [17] Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *Journal of Clinical Investigations*, 91(1):153–159, 1993.
- [18] Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (mif) in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *Journal of Experimental Medicine*, 183:277–282, 1996.
- [19] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. Mif is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. *Nature*, 365:756–759, 1993.
- [20] Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (mif). *Biochemistry*, 33(47):14144–14155, 1994.
- [21] Bin Q, Johnson BD, Schauer DW, Casper JT, Orentas RJ. Production of macrophage migration inhibitory factor by human and murine neuroblastoma. *Tumour Biology*, 23(3):123–129, 2002.
- [22] Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153:80–82, 1966.
- [23] Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu, B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *Journal of Experimental Medicine*, 189:341–346, 1999.

- [24] Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G. Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (mif) to chromosome 22q11.2. *Genomics*, 39(2):235–236, 1997.
- [25] Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. Mif is a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377:68–71, 1995.
- [26] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Experimental Medicine*, 179:1895–1902, 1994.
- [27] Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (mif): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Critical Reviews Immunology*, 17(1):77–88, 1997.
- [28] Calandra T, Echtenacher B, Le Roy D, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature Medicine*, 6(2):164–170, 2000.
- [29] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3:791–800, 2003.
- [30] Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95(19):11383–11388, 1998.
- [31] Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala, R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (mif) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Molecular Medicine*, 5:181–191, 1999.
- [32] Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic ikba. *American Journal of Physiology*, 279:1043–1049, 2000.

- [33] de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C, Sahli MA. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine mif. *Nature Immunology*, 2(11):1061–1066, 2001.
- [34] Diserens AC, de Tribolet N, Martin-Achard A, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterisation of an established human malignant glioma cell line: Ln-18. *Acta Neuropathologica (Berlin)*, 53(1):21–28, 1981.
- [35] Donn R, Alourfi Z, Zeggini E, Lamb R, Jury F, Lunt M, Meazza C, De Benedetti F, Thomson W, Ray D; British Paediatric Rheumatology Study Group. A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatica*, 50(5):1604–1610, 2004.
- [36] Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Medicine*, 3(3):320–323, 1997.
- [37] Eberle K, Oberpichler A, Trantakis C, Krupp W, Knupfer M, Tschesche H, Seifert V. The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells. *Anticancer Research*, 20(3A):1679–1684, 2000.
- [38] Esumi N, Budarf M, Ciccarelli L, Sellinger B, Kozak CA, Wistow G. Conserved gene structure and genomic linkage for d-dopachrome tautomerase (ddt) and mif. *Mammalian Genome*, 9(9):753–757, 1998.
- [39] Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100(6):9354–9359, 2003.



- [40] Flieger A, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an abc transporter. *FEBS Letters*, 551:78–86, 2003.
- [41] Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. Pi3k/akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22(56):8983–8998, 2003.
- [42] Fukuzawa J, Nishihira J, Hasebe N, Haneda T, Osaki J, Saito T, Nomura T, Fujino T, Wakamiya N, Kikuchi K. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28):24889–24895, 2002.
- [43] George M, Vaughan JH. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, (111):514–521, 1962.
- [44] Gurvits BY, Tretyakov OY, Klishina NV, Stoeva S, Voelter W, Galoyan AA. Identification of macrophage migration inhibitory factor isoforms in bovine brain. *Neurochemistry Research*, 25(8):1125–1129, 2000.
- [45] Honma N, Koseki H, Akasaka T, Nakayama T, Taniguchi M, Serizawa I, Akahori H, Osawa M, Mikayama T. Deficiency of the macrophage migration inhibitory factor gene has no significant effect on endotoxaemia. *Immunology*, 100:84–90, 2000.
- [46] Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *Journal of Experimental Medicine*, 190(10):1375–1382, 1999.
- [47] Isayeva T, Kumar S, Ponnazhagan S. Anti-angiogenic gene therapy for cancer (review). *International Journal of Oncology*, 25(2):335–343, 2004.
- [48] Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent co-alterations of tp53, p16/cdkn2a, p14arf, pten tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathology*, 9:469–479, 1999.

- [49] Jaworski DC, Jasinskas A, Metz CN, Bucala R, Barbour AG. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick *Amblyomma americanum*. *Insect Molecular Biology*, 10:323–331, 2001.
- [50] Jones TR, Bigner SH, Schold SC Jr, Eng LF, Bigner DD. Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. morphology and glial fibrillary acidic protein expression. *American Journal of Pathology*, 105(3):316–327, 1981.
- [51] David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell -antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 56:72–77, 1966.
- [52] Juttner S, Bernhagen J, Metz CN, Rollinghoff M, Bucala R, Gessner A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . *Journal of Immunology*, 161(5):2383–2390, 1998.
- [53] Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, Ogata A, Shindoh M, Ohbuchi T, Kawakami Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 89(2):334–341, 2000.
- [54] Kew Y, Levin VA. Advances in gene therapy and immunotherapy for brain tumors. *Current Opinion Neurology*, 16(6):665–670, 2003.
- [55] Kirsch M, Schackert G, Black PM. Metastasis and angiogenesis. *Cancer Treatment Research*, 117:285–304, 2004.
- [56] Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Current Opinion Oncology*, 15:197–203, 2003.
- [57] Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through JAB1. *Nature*, 408:211–216, 2000.

- [58] Kleemann R, Rorsman H, Rosengren E, Mischke R, Mai NT, Bernhagen J. Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. full immunologic activity of n-terminally truncated mutants. *European Journal of Biochemistry*, 267(24):7183–7193, 2000.
- [59] Kleihues P, Cavanee WK. *Tumours of the Nervous System*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon, 2000.
- [60] Koebernick H, Grode L, David JR, Rohde W, Rolph MS, Mittrucker HW, Kaufmann SH. Macrophage migration inhibitory factor (mif) plays a pivotal role in immunity against salmonella typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99(21):13681–13686, 2002.
- [61] Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa b through the phosphorylation of i kappa b alpha on tyrosine residues. *Cancer Research*, 54(6):1425–1430, 1994.
- [62] Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Research*, 60(4):883–887, 2000.
- [63] LaBelle JL, Truitt RL. Characterization of a murine nkt cell tumor previously described as an acute myelogenous leukemia. *Leukaemia Lymphoma*, 43(8):1637–1644, 2002.
- [64] Lan HY, Bacher M, Yang N, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Metz C, Meinhardt A, Bucala R, Atkins RC. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunological induced kidney disease in the rat. *Journal of Experimental Medicine*, 185:1455–1465, 1997.
- [65] Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9):3919–3929, 1992.
- [66] Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor in

- rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheumatica*, 42(8):1601–1608, 1999.
- [67] Leech M, Metz C, Santos L, Peng T, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheumatica*, 41(5):910–917, 1998.
- [68] Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, Hendlisz A, Schuring MP, Salmon I, Gabius HJ, Pector JC, Kiss R. Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (mif) in human colorectal cancers. *Modern Pathology*, 16(5):491–504, 2003.
- [69] Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. Mif signal transduction initiated by binding to cd74. *Journal of Experimental Medicine*, 197(11):1467–1476, 2003.
- [70] Li Z, Ren Y, Wu QC, Lin SX, Liang YJ, Liang HZ. Macrophage migration inhibitory factor enhances neoplastic cell invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinase 9 and interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chinese Medical Journal*, 117(1):107–114, 2004.
- [71] Liao H, Bucala R, Mitchell RA. Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (mif). *Journal of Biological Chemistry*, 278(1):76–81, 2003.
- [72] Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, Lolis E, Al-Abed Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28):24976–24982, 2002.
- [73] Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (mif): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infection*, 4(4):449–460, 2002.
- [74] Magi B, Bini L, Liberatori S, Marzocchi B, Raggiaschi R, Arcuri F, Tripodi SA, Cintonino M, Tosi P, Pallini V. Charge heterogeneity of macrophage migra-

- tion inhibitory factor (mif) in human liver and breast tissue. *Electrophoresis*, 19(11):2010–2013, 1998.
- [75] Markert JM, Fuller CM, Gillespie GY, Bubien JK, McLean LA, Hong RL, Lee K, Gullans SR, Mapstone TB, Benos DJ. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiology Genomics*, 5(1):21–33, 2001.
- [76] Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infection Immunity*, 68(4):2259–2267, 2000.
- [77] McInnes A, Rennick DM. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form multinucleated cells. *Journal of Experimental Medicine*, 167:598–611, 1988.
- [78] Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*, 48:448–452, 1996.
- [79] Mitchell R, Bacher M, Bernhagen J, Pushkarskaya T, Seldin MF, Bucala R. Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (mif). *Journal of Immunology*, 154:3863–3870, 1995.
- [80] Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (mif) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(1):345–350, 2002.
- [81] Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25):18100–18106, 1999.
- [82] Munaut C, Boniver J, Foidart JM, Deprez M. Macrophage migration inhibitory factor (mif) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (vegf) expression. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 28(6):452–460, 2002.
- [83] Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *European Journal of Clinical Investigation*, 31(4):337–343, 2001.
- [84] Nathan CF, Karnovsky ML, David JR. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 133(6):1356–1376, 1971.
- [85] Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Immunology*, 170(6):3337–3347, 2003.
- [86] Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, Todo S. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine*, 12(4):309–314, 2000.
- [87] Ong GL, Goldenberg DM, Hansen HJ, Mattes MJ. Cell surface expression and metabolism of major histocompatibility complex class ii invariant chain (cd74) by diverse cell lines. *Immunology*, 98(2):296–302, 1999.
- [88] Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology*, 92(1):131–137, 1997.

- [89] Onodra S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10):7865–7874, 2002.
- [90] Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differentiation*, 10(4):431–442, 2003.
- [91] Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (mif). *Genomics*, 19:48–51, 1994.
- [92] Pastrana DV, Raghavan N, FitzGerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, Scott AL. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infection Immunity*, 66(12):5955–5963, 1998.
- [93] Petrenko O, Fingerle-Rowson G, Peng T, Mitchell RA, Metz CN. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to ras-mediated transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13):11078–11085, 2003.
- [94] Plate KH. Mechanism of angiogenesis in the brain. *Journal of Experimental Neurology*, 58(4):313–320, 1999.
- [95] Ponath G. Regulation und Expression von Makrophagen-Migrations Inhibitions-Faktor (MIF) in Glioblastoma mutiforme. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, 1999.
- [96] Rainov NG, Ren H. Gene therapy for human malignant brain tumors. *Cancer Journal*, 9(3):180–188, 2003.
- [97] Ren Y, Chan HM, Li Z, Lin C, Nicholls J, Chen CF, Lee PY, Lui V, Bacher M, Tam PKH. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced n-myc expression by the activation of erk signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and vegf in neuroblastoma. *Oncogene*, pages 1–9, 2004.

- [98] Ren Y, Tsui HT, Poon RTP, Ng IOL, Li Z, Chen Y, Jiang G, Lau C, Yu WC, Bacher M, Fan ST. Macrophage migration inhibitory factor: Roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*(107):22–29.
- [99] Repp AC, Mayhew ES, Apte S, Niederkorn JY. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by nk cells. *Journal of Immunology*, 165(2):710–715, 2000.
- [100] Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. Mif regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. *Nature*, 414:920–924, 2001.
- [101] Rosengren E, Aman P, Thelin S, Hansson C, Ahlfors S, Bjork P, Jacobsson L, Rorsman H. The macrophage migration inhibitory factor mif is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Letters*, 417:85–88, 1997.
- [102] Rosengren E, Bucala R, Amam P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, Rorsman H. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (mif) catalyzes tautomerization reaction. *Molecular Medicine*, 2:143–149, 1996.
- [103] Sasaki Y, Kasuya K, Nishihira J, Magami Y, Tsuchida A, Aoki T, Koyanagi Y. Suppression of tumor growth through introduction of an antisense plasmid of macrophage migration inhibitory factor. *International Journal of Molecular Medicine*, 10(5):579–583, 2002.
- [104] Sato A, Uinuk-ool TS, Kuroda N, Mayer WE, Takezaki N, Dongak R, Figueroa F, Cooper MD, Klein J. Macrophage migration inhibitory factor (mif) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(5):401–412, 2003.
- [105] Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous leishmania major infection. *Infection Immunity*, 69(2):906–911, 2001.



- [106] Schulz J, Dettlaff S, Fritzsche U, Harms U, Schiebel H, Derer W, Fusenig NE, Hülsen A, Böhm M. The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (hacat) and other cell types growing adherently or in suspension. *Journal of Immunological Methods*, 167:1–13, 1994.
- [107] Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264:751–758, 1999.
- [108] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398):843–845, 1992.
- [109] Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92(3):768–772, 1995.
- [110] Sugimoto H, Taniguchi M, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J. Crystal structure of human d-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 38(11):3268–3279, 1999.
- [111] Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93:5191–5196, 1996.
- [112] Swope MD, Sun HW, Klockow B, Blake P, Lolis E. Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and s-hexylglutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 273:14877–14884, 1998.

- [113] Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (mif) in the mechanism of tumor cell growth. *Molecular Medicine*, 4(11):707–714, 1998.
- [114] Thurman GB, Braude IA, Gray PW, Oldham RK, Stevenson HC. Mif-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization. *Journal of Immunology*, 134:305–309, 1985.
- [115] Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by egf, pdgf-bb, and bfgf. *Journal of Neurosurgery*, 82(5):864–873, 1995.
- [116] Turner L, Scotton C, Negus R, Balkwill F. Hypoxia inhibits macrophage migration. *European Journal of Immunology*, 29(7):2280–2287, 1999.
- [117] Weiser WY, Temple PA, Witek-Gianotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 56:72–77, 1989.
- [118] Weller M, Wick W. *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*, chapter G 2. Primäre intrakranielle und spinale Tumoren, pages 776–811. Kohlhammer, Stuttgart, 4th edition, 2003.
- [119] Wennemuth G, Aumüller G, Bacher M, Meinhardt A. Macrophage migration inhibitory factor-induced  $Ca^{2+}$  response in rat testicular peritubular cells. *Biology of Reproduction*, 62(6):1632–1639, 2000.
- [120] Westphal M, Herrmann HD. *Praxis der Neurologie*, chapter 12 Hirntumoren, pages 571–592. Thieme, Stuttgart, 2nd edition, 1999.
- [121] White ES, Flaherty KR, Carskadon S, Brant A, Iannettoni MD, Yee J, Orlinger MB, Arenberg DA. Macrophage migration inhibitory factor and cxc chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clinical Cancer Research*, 9(2):853–860, 2003.

- [122] Wistow GJ, Shaughnessy MP, Lee DC, Hodin J, Zelenka PS. A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 90:1272–1275, 1993.
- [123] Wu H, Goel V, Haluska FG. Pten signaling pathways in melanoma. *Oncogene*, 22(20):3113–3122, 2003.
- [124] Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Mu W, Metz C, Bacher M, Meinhardt A, Bucala R, Atkins RC, Lan HY. Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (mif): potential role of mif in regulating glucocorticoid production. *Molecular Medicine*, 4(6):413–424, 1998.
- [125] Yoshimoto T, Nishihira J, Tada M, Houkin K, Abe H. Induction of macrophage migration inhibitory factor messenger ribonucleic acid in rat forebrain by reperfusion. *Neurosurgery*, 41(3):648–653, 1997.
- [126] Zeng FY, Weiser WY, Kratzin H, Stahl B, Karas M, Gabius HJ. The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(1):74–80, 1993.
- [127] Zschabitz A, Gabius HJ, Zeng FY, Kunt T, Martens KD, Koepp H, Fassbender HG, Stofft E. Detection of sarcolectin-specific receptors like the cytokine macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid nodules. *Histology and Histopathology*, 14(3):771–777, 1999.

# Anhang A

## Materialien

### A.1 Lösungen

#### Northern-Blot

Probenscocktail:

750  $\mu$ l Formamid, 150  $\mu$ l (10x)MOPS, 240  $\mu$ l Formaldehyd, 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ l Glycerin, 80  $\mu$ l Bromphenolblau

(10x)MOPS:

41,8 g 4-Morpholinopropansulfonsäure (200mM), 16,7 ml (3M)Natriumacetat (50mM), 20 ml (0,5M)EDTA (10mM), ad 1 l Aqua dest. , pH 7,0

(20x)SSC:

350,6 g NaCl, 176,4 g tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, ad 2 l Aqua dest. , pH 7,0

Methylen-Blau-Färbelösung:

0,5M Natriumacetat (pH 5,2), 0,04% Methylenblau

Prähybridisierungscocktail:

50 ml Formamid (100%), 25 ml (20x)SSC, 20 ml Blocking-Puffer (10%), 1 ml N-Laurylsarcosin (10%), 100  $\mu$ l SDS (20%), 3,9 ml Aqua dest.

Waschpuffer I:

50 ml (20x)SSC, 2,5 ml SDS (20%), 447,5 ml H<sub>2</sub>O

Waschpuffer II:

2,5 ml (20x)SSC, 2,5 ml SDS (20%), 495 ml H<sub>2</sub>O

(10x)Maleinsäurepuffer:

23,21 g Maleinsäure, 17,53 g NaCl, 16,06 g NaOH, ad 2 l Aqua dest. , pH 7,5

(10%)Blockingpuffer:

10% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim), 90% Maleinsäurepuffer

Reaktionspuffer:

5,84 g NaCl, 2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,83 g Tris HCl, 11,58 g Tris-Base, ad 1 l Aqua dest. , pH 9,5

### **Amidoblack-Assay**

Fixierungslösung nach Vilcek:

10% Formalin, 9% Essigsäure 0,1 M Natriumacetat, 200 ml 37% Formalin, 48,6 ml Eisessig, 291,4 ml Aqua dest., 4,4g Natriumacetat

Färbelösung nach Vilcek:

90 ml Eisessig, 910 ml Aqua dest., 8,2 g Natriumacetat, 1,0 g Amidoschwarz

Waschlösung:

7 Tropfen 10 M HCl auf 0,5 l Aqua dest.

### **OPD-Puffer**

Substratpuffer:

7,3 g Zitronensäure x H<sub>2</sub>O, 11,87 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, ad 1 l Aqua dest. , pH 5,0

### **Sonstige**

PBS(10x):

2,0 g KCl, 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80,0 g NaCl 11,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ad 1 l Aqua dest. , pH 7,4

TBS(10x):

12,11 g Tris/Base, 87,66 g NaCl, ad 1 l Aqua dest. , pH 7,6

## A.2 Chemikalien und Einwegartikel

### Chemikalien

Merck, Darmstadt:

DMSO, LiCl, Chloroform, Formaldehyd, Essigsäure, tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, Bromphenolblau, (3M)Natriumacetat, Zitronensäure x H<sub>2</sub>O, MgCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Riedel de Haen, Seelze:

Isopropanol, Ethanol, Methanol, Formamid

Serva, Heidelberg:

Triton X 100, Tween 20, TBS, Glycerin, N-Laurylsarcosin

Roth, Karlsruhe:

BSA, EDTA, SDS

ICN, Aurora, USA:

MOPS, Maleinsäure, Tris HCl

Sigma&Aldrich, Saint Louis, USA:

Methylenblau, Amidoschwarz

Töpfer, Dietsmannsried:

Trockenmilch

### Einwegartikel

Greiner, Frickenhausen:

Pipetten (5ml, 10ml)

Eppendorf, Hamburg:

Pipettenspitzen, Eppendorfreaktionsgefäße

Costar Corporation, Cambridge, USA:

Zellkulturflaschen (25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>, 162cm<sup>2</sup>)

Falcon, B&D, Franklin Lanes, USA:

Zellkulturgefäße (96-well, 6-well), 10er Petrischalen, Falconröhrchen (15ml, 50ml)

## Anhang B

# Abkürzungen und Einheiten

### B.1 Abkürzungen

A	Österreich
as	antisense
BrdU	Brom Desoxyribo Uridine
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie
DMEM	Dubeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid
DTH	Delayed Type Hypersensitivity Reaction
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGRFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GB	Grossbritannien

HRP	Horse Radish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Veine Endothelial Cell
I	Italien
IgG	Immunglobulin G
LDH	Laktatdehydrogenase
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MOPS	Morpholinepropansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natrium Hydroxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	PDGF Receptor
PI3	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and tensin homolog-mutated in multiple advanced cancers
rec.	recombinant
RNA	Ribo Nucleic Acid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Standard Sodium Citrate
Std.	Standard
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
wt	wildtyp



## B.2 Einheiten

g	Gramm
g*	Gravitation
°C	Grad Celsius
h	Stunden
kD	Kilodalton
M	Mol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rlu	Relative Light Units
s	Sekunden
V	Volt

## Zusammenfassung

Die Funktion des Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor [MIF] wurde zuerst im Immunsystem beschrieben. Erst in den letzten Jahren wurde auch erkannt, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Tumorprogression spielt. Ausgehend von dem Befund einer erhöhten MIF Expression in Gewebeschnitten von Patienten mit dem Gehirntumor Glioblastom stellte sich die Frage nach der Regulation und Funktion von MIF in diesen Tumoren. Diese Promotionsarbeit untersucht diese Fragestellung im Zellkulturmodell an verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien.

Nachdem in anderen Studien bereits eine Rolle von MIF als Angiogenesefaktor für Tumore beschrieben wurde, sollte nun in der Zellkultur die Regulation von MIF unter Zellstress untersucht werden. Die Glioblastom-Kulturen wurden - als Simulation der mangelnden Blut- und Nährstoffversorgung von in vivo wachsenden Tumoren - hypoxischen und hypoglykämischen Kulturbedingungen ausgesetzt. Es zeigte sich eine deutliche Induktion von MIF mRNA in den Tumorzellen und eine Freisetzung von MIF-Protein in den Kulturüberstand unter beiden Stressbedingungen. In primären humanen Fibroblasten - als nicht-entartete Kontrollzellen - war diese Zellstress-induzierte Regulation von MIF nicht zu beobachten.

In den Tumorzellen fand sich auch eine hohe basale Expression von MIF. Mithilfe einer gentechnischen Veränderung der LN18 Tumorzellen durch Integration einer MIF-Antisense cDNA konnte die MIF-Proteinexpression in diesen Zellen verringert werden. Diese generierten MIF-Antisense-Klone wuchsen langsamer als die Kontroll- und Wildtyp-Zellen. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt um so deutlicher je dichter die Zellkulturen waren. Ausserdem erreichten die Antisense-Klone eine geringere maximale Zelldichte im Langzeitwachstum. Ein ähnliches Ergebnis liess sich durch Blockade von MIF mit MIF-Antikörpern und durch den Einsatz eines Inhibitors, der an den enzymatischen Bereich von MIF bindet, erreichen. Passend zu diesen Ergebnissen fand sich eine zelldichteabhängige Expression von MIF in den Tumorzellen. Die exogene Zufuhr von rekombinantem MIF führte zu keiner Steigerung der Proliferationsrate in den Tumorzellen; allerdings zeigte sich eine Wachstumsindukti-

on in ruhenden, Kontakt-inhibierten primären Fibroblasten. Diese Beobachtungen zeigen einen direkten proliferativen Effekt von MIF auf die Zellen und bieten eine Erklärung für die Überwindung der Kontaktinhibition in den Tumorzellen.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von Glioblastomen ist MIF ein erfolgversprechendes, therapeutisches Ziel. In seiner dualen Funktion als direkter Wachstumsfaktor für die Tumorzellen mit Wirkung auf die Kontaktinhibition und als Angiogenesefaktor für die Tumorprogression bietet er einen gemeinsamen Angriffspunkt zur Beeinflussung der beiden wichtigsten Mechanismen des unkontrollierten Tumorwachstums.

# Lebenslauf

Name: Jörg Schrader  
geboren: 01.08.1974 in Minden(Westf.)  
Adresse: Ketzerbach 19 1/2  
35037 Marburg  
Eltern: Christel Schrader, Grundschullehrerin a.D.  
Wilhelm Schrader, Hauptschullehrer a.D.

## Schule:

1980-1984 Grundschule Porta Westfalica - Holzhausen  
1984-1993 Städtisches Gymnasium Prota Westfalica  
06/1993 Abitur (Note 1,3)

## Zivildienst:

09/1993 - 11/1994 Rettungssanitäter, Feuerwache Porta Westfalica

## Arbeitstätigkeit:

12/1994 - 03/1995 Aushilfstätigkeit als Lackierer, Firma Nordwest(Stadthagen)

## Studium:

1995 Beginn des Physikstudiums, Philipps-Universität Marburg  
1996 Beginn des Medizinstudiums, Philipps-Universität Marburg  
Fortführung des Physikstudiums als Zweitstudium  
1997 Vordiplom in Physik (Note sehr gut)  
1999 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes  
Beendigung des Physikstudiums ohne Diplomabschluss  
05/1999 - 06/2000 Experimenteller Teil der Promotion  
07/2000 - 07/2001 DAAD-Jahresstipendium, Aberdeen-University, GB  
Gaststudent im vierten Jahr des Medizinstudiums

10/2001 Wiederaufnahme des Medizinstudiums in Marburg

11/2003 Staatsexamen in Medizin (Note 1,0)

**Berufstätigkeit:**

seit 02/2004

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Arzt im Praktikum)

Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie

Leitung Prof. Dr. med. R. Arnold

Arbeitsgruppe von PD Dr. med. D. Hörsch

# Publikationsliste

## Artikel

Bacher M, Eickmann M, **Schrader J**, Gemsa D, Heiske A. Human cytomegalovirus mediated induction of MIF in fibroblasts. *Virology*, 299(1):3237, 2002.

**Schrader J**, Bacher M, Thompson N, Kuschela K, Gemsa D, Waeber G, Schlegel J. Up-regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor gene and protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *American Journal of Pathology*, 162(1):1117, 2003. *J.S. and M.B. contributed equally*

**Schrader J**, Bauschke B, Schlegel J, Gemsa D, Al-Abed Y, Bacher M. MIF targeting by antisense transfection and antibodies inhibits growth and restores contact inhibition in human glioblastoma cell lines. *Zur Veröffentlichung eingereicht*

**Schrader J**, Scheffer S, Weng Y, Barth P, Gemsa D, Bacher M. MIF expression in chronic HCV infection. *In Vorbereitung*

## Kongressbeiträge

Hörsch D, **Schrader J**, Brendel M, Jahr H, Burks D. Limited expansion and improved survival of primary human beta-cells by adenoviral overexpression of IRS-2 and cAMP elevation. *Diabetes und Stoffwechsel*, 13(1): 41, 2004. *Vortrag auf der 39. Jahrestagung der DDG von **Schrader J***

**Schrader J**, Scheffer S, Weng Y, Barth P, Gemsa D, Bacher M. MIF expression in chronic HCV infection - from inflammation to tumour formation?. *Immunobiology*, 208(1-3): 179, 2003. *Posterpräsentation*

**Schrader J**, Schlegel J, Gemsa D, Bacher M. Migration inhibitory factor participates in the tumorigenesis of malignant human gliomas. *Immunobiology* 204(1-2): 305, 2001. *Posterpräsentation*

Bacher M, **Schrader J**, Fröhlich S, Gemsa D, Schlegel J. MIF expression in human gliomas indicates an important role for tumor-associated angiogenesis. *Immunobiology*, 200(1-2): 397-398, 2000. *Posterpräsentation*

Ponath G, Schlegel J, **Schrader J**, Kuschela K, Gemsa D, Bacher M. Regulation of MIF expression in rat glioblastoma cells. *Immunobiology*, 196(1-2): 697, 1999. *Posterpräsentation*

# Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Achilles, Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Beato, Becker, Berendes, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gemsa, Gente, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotzen, Graul, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hochban, Hörsch, Hofmann, Huffmann, Jacob, Joseph, Jungclas, Kälble, Kaffarnik, Kann, Karlson, Katschinski, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Koranzky, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Legrum, Lengsfeld, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier, Maisch, Mann, Mattejat, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Niemeyer, Nies, Niessing, Noll, Nüsing, Oepen, Oertel, Penzel, Peter, Petermann, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupec, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schueffel, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stinner, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Zielke.



In Aberdeen:

El-Omar, Forrester, Gilbert, Graham, Greaves, Haites, Hall, Hawksworth, Helms, Heys, Holmes, Hulks, Hutchinson, Kerr, Linington, MacLeod, Murray, Page, Ralston, Rees, Reid, Rogers, Russell, Seymor, Simpson, Templeton, Webster, Youngson.

In Wetzlar:

Berger, Brobmann, Heinrich, Knaepler, Kramer, Rauber, Schröder.

# Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen; ihnen allen gebührt mein herzlichster Dank.

An erster Stelle ist mein Doktorvater Michael zu nennen. Ohne ihn hätte ich nicht zu meinem Thema der Doktorarbeit und zum Forschungsgebiet MIF im Allgemeinen gefunden. Durch seine Begeisterung für die Wissenschaft und sein unermüdliches Erklären hat er mir als Mediziner die Molekularbiologie näher gebracht und in mir den Spass an der Forschung geweckt. Seine Offenheit für neue Ideen hat mich immer dazu ermuntert neue Fragen an mein Thema zu stellen und auch über „den Tellerrand meiner Doktorarbeit“ hinauszublicken.

An zweiter Stelle bin ich Herrn Gemsa zu Dank verpflichtet, dass er mich in seinem Institut als Doktorand angenommen hat. Durch viele kritische Arbeitsbesprechungen hat er immer wieder den Blick auf das Wesentliche gelenkt und seine „offene Tür“ war immer eine Einladung bei allen kleinen und großen Sorgen zu ihm zu kommen.

Ein großes Dankeschön für die vielen Hilfen bei diversen Labortechniken geht auch an die Arbeitsgruppenleiter Marianne, Andreas und Holger sowie an die naturwissenschaftlichen Doktoranden Claudia, Marion und Ute. Auch die MTAs Gundi, Sabine und Ulli haben viel zum reibungslosen Ablauf im Labor beigetragen. Nicht zu vergessen natürlich die anderen Mit-Doktoranden Birgit, Birgit, Christoph, Gerald, Karen, Mike und Timm, durch deren Anwesenheit das Pipettieren zu nächtlichen Zeiten nicht so einsam war und die soziale Komponente nicht zu kurz kam.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium - mit allen seinen „Umwegen“ - ermöglicht haben und jederzeit hinter mir gestanden haben. Bei meiner Freundin Donata möchte ich mich für all die Geduld und aufmunternden Worte bedanken, die ich in der Phase des Doktorarbeitschreibens immer gebrauchen konnte. Meinem ehemaligen Mitbewohner Reiner schulde ich nicht nur Dank für die unend-

lich vielen Hilfestellungen beim Kampf mit meinem Computer, sondern auch für das allzeit offene Ohr für alle Probleme, die während der Doktorarbeit auftraten. Darüberhinaus wären noch viel Freunde zu nennen, die mich bei der Doktorarbeit begleitet haben, die mich ertragen mussten, wenn Versuche nicht geklappt haben, und die durch häufiges Nachfragen nach dem „endgültigen Ende“ meiner Doktorarbeit zur Fertigstellung beigetragen haben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Expression und Funktion von Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor (MIF) in humanen Glioblastomzelllinien“ im Medizinischen Zentrum für Hygiene (Leitung Prof. Dr. Klenk) im Institut für Immunologie (Leitung Prof. Dr. Gemsa) mit Unterstützung durch PD Dr. Bacher ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im *American Journal of Pathology* veröffentlicht.

Marburg, den 16.09.2004