

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Klinikum  
Großhadern  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Über die Rolle von Macrophage Migration Inhibitory  
Factor (MIF) bei der murinen Hauttumorgenese**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Jahns

München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Hallek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Judith P. Johnson

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. G. Fingerle-Rowson

Dekan Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2010

**Meiner Familie**

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei allen Beteiligten bedanken, die geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden. Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern: Professor Dr. med. Hallek, in dessen Einrichtung und Arbeitsgruppe ich arbeiten durfte, und PD Dr. med. Günter Fingerle-Rowson, unter dessen Aufsicht ich die experimentellen Methoden, das wissenschaftliche Arbeiten und nicht zuletzt medizinisches Denken gelernt habe und der mit viel Geduld und Konsequenz die Fertigstellung der Arbeit verfolgt hat.

Einen besonderen Anteil haben auch meine Frau, Dr. med. Borianna Jahns, meine Mutter Frau med. pract. Gabriele Jahns und ihr Mann, Dr. Alfred Berkold, sowie mein Vater Helge-Max Jahns: Nur mit ihrer leidenschaftlichen und konsequenten moralischen Unterstützung konnte ich die Höhen und Tiefen des wissenschaftlichen Arbeitens meistern und nach langjähriger akademischer Odyssee im ersehnten Heimathafen landen.

Zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern in der GSF Großhadern, die mich fachlich und menschlich unterstützt, mir die oft verschlungenen Wege des Labors gewiesen und mit mir Bench und Pipette geteilt haben: Corinna Schlander, Amparo Hausherr, Olga Mitina, Günter Krause, Karin Forster und Christine Mayr.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung – Seite 1

I. Einleitung – Seite 2

- A: MIF als Regulator im Immunsystem – Seite 2
- B: MIF als Wachstumsregulator und Mediator der Tumorgenese – Seite 5
- C: Mechanismen der MIF Aktivität – Seite 7
- D: Gen-Targeting mit Cre/loxP – Seite 22
- E: Hautkrebs – Seite 24

II. Ziele der Arbeit – Seite 27

III. Material und Methoden – Seite 28

- A: Chemische One-Stage Tumorgenese – Seite 28
- B: Histologie – Seite 28
- C: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz– Seite 39
- D: Westernblot – Seite 31
- E: Proteinquantifizierung mittels BCA – Seite 34
- F: Statistik – Seite 35

IV. Ergebnisse – Seite 36

- A: Hauttumorgenese im BaP Modell – Seite 36
- B: Tumorphistologie – Seite 39
- C: Quantifizierung von MIF mittels Westernblot – Seite 41

V. Diskussion – Seite 42

- A: Zusammenfassung der Befunde – Seite 42
- B: MIF als Tumorsuppressor in der Haut – Seite 42
- C: Die p1g Mutante in der Hauttumorgenese – Seite 45

VI. Literatur – Seite 47

# Abbildungsverzeichnis

1. Ein dreidimensionales Modell von MIF in seiner trimeren Struktur – Seite 3
2. Der AP-1 / DNA Komplex – Seite 8
3. MIF hemmt die Jab-1 abhängige Aktivierung von AP-1 – Seite 9
4. Der Zellzyklus – Seite 11
5. Das Proteasom – Seite 12
6. Funktionelle Interaktion von MIF mit dem SCF-Komplex – Seite 13
7. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Regelkreis – Seite 17
8. MIF als Tautomerase – Seite 20
9. Schematische Darstellung der katalytischen Tasche von MIF – Seite 21
10. Herstellung der MIF p1g Maus mittels Gene Targeting – Seite 24
11. Spinozelluläres Karzinom der Epidermis des Menschen – Seite 25
12. Gesamttumorzahl nach B[a]P-Applikation – Seite 37
13. Größe der Tumoren in mm<sup>3</sup> – Seite 38
14. Spektrum der Benzo[a]pyren-induzierten Hauttumoren – Seite 39
15. MIF Expression in der Immunhistochemie – Seite 40
16. Nukleäre Expression von MIF in der Immunfluoreszenz – Seite 40
17. MIF Expression im Westernblot – Seite 41

## Zusammenfassung

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) ist ein 12,5 kDa großes Protein, das als Homotrimer in fast allen Körpergeweben konstitutionell exprimiert wird und proinflammatorische wie wachstumsregulierende Eigenschaften aufweist. Die experimentelle Datenlage über die Wirkmechanismen von MIF zeigen, dass MIF sowohl extrazelluläre Wirkung als Zytokin/Chemokin wie auch eine intrazelluläre Wirkung als Regulator von Ubiquitylierung und proteasomaler Aktivität oder als Enzym mit Tautomerase-Aktivität besitzt. Für alle Mechanismen ist ein Einfluss von MIF auf Wachstumsregulation beschrieben. Die Evidenz für MIF als Tautomerase ist allerdings schlecht belegt und es wird diskutiert, ob dies ein Artefakt oder ein Relikt aus evolutionären Vorformen von MIF ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, über genetisch modifizierte Mäuse, die entweder eine komplette Deletion des MIF-Gens (MIF Knock-Out-Maus) oder eine Punktmutation mit Verlust der Enzymaktivität tragen, die funktionelle Rolle von MIF bei der Hauttumorgenese zu bestimmen und zu testen, ob die Tautomerase-Aktivität von MIF von funktioneller Relevanz bei der Tumorgenese ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von MIF in der murinen Haut während der chemischen One Stage-Karzinogenese mit Benzo[a]pyren zu verstärkter Tumorbildung führt. Der Verlust von Prolin 1 und damit der Tautomeraseaktivität alleine führt zu einem Phänotyp, welcher zwischen dem des Knock-Outs und dem des Wildtyps liegt. Dies weist daraufhin, dass Prolin 1 oder alternativ die Tautomeraseaktivität eine wichtige biologische Rolle für die Funktion von MIF bei der malignen Transformation von Keratinozyten spielt.

## **I – Einleitung**

Im Folgenden soll ein Überblick über die bisherigen Erkenntnisse bezüglich MIF, speziell über seinen Wirkmechanismus und seine Rolle in der Tumorgenese, gegeben werden. Ferner wird auf das Modell der Hauttumorgenese eingegangen. Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse entstammen Linien, die PD Dr. med. Günter Fingerle-Rowson im Vorfeld generiert hatte. Es wird deshalb am Ende noch ein Überblick über das Prinzip des Gene Targetings gegeben, mit Hilfe dessen diese Mauslinien generiert werden konnten. Im Teil II werden die Ziele der Arbeit dargestellt. Im dritten Teil werden die Methoden und Materialien erläutert. Diese umfassen neben der Hauttumorinduktion mittels Benzopyren im Mausmodell die pathologischen und molekularmedizinischen Basismethoden der Histologie, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und des Westernblots. Abschließend werden im vierten Teil die Resultate dargelegt und im fünften Teil, der Diskussion, wird versucht, die Resultate in die aktuellen Konzepte über den Wirkmechanismus von MIF einzuordnen und seinen Proteasom-vermittelten Einfluss auf den Zellzyklus, auf die Zellproliferation und letztlich auf die Tumorgenese zu beschreiben.

### **A: Macrophage Migration Inhibitory Factor als Regulator im Immunsystem**

1966 entdeckten die Gruppen von J. David und B. Bloom ungefähr zeitgleich im Überstand von aktivierten Lymphozyten einen löslichen Anteil, welcher die natürliche Bewegung von Makrophagen hemmte und deren Adhäsions- und Phagozytoseeigenschaften steigerte. Nach dieser Eigenschaft wurde er deskriptiv „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ (MIF) genannt und er war das erste bekannte Protein, welches Zytokin-Aktivität besaß [1, 2], denn zu diesem Zeitpunkt waren Zytokine wie IL-2 oder TNF- $\alpha$  noch nicht entdeckt.

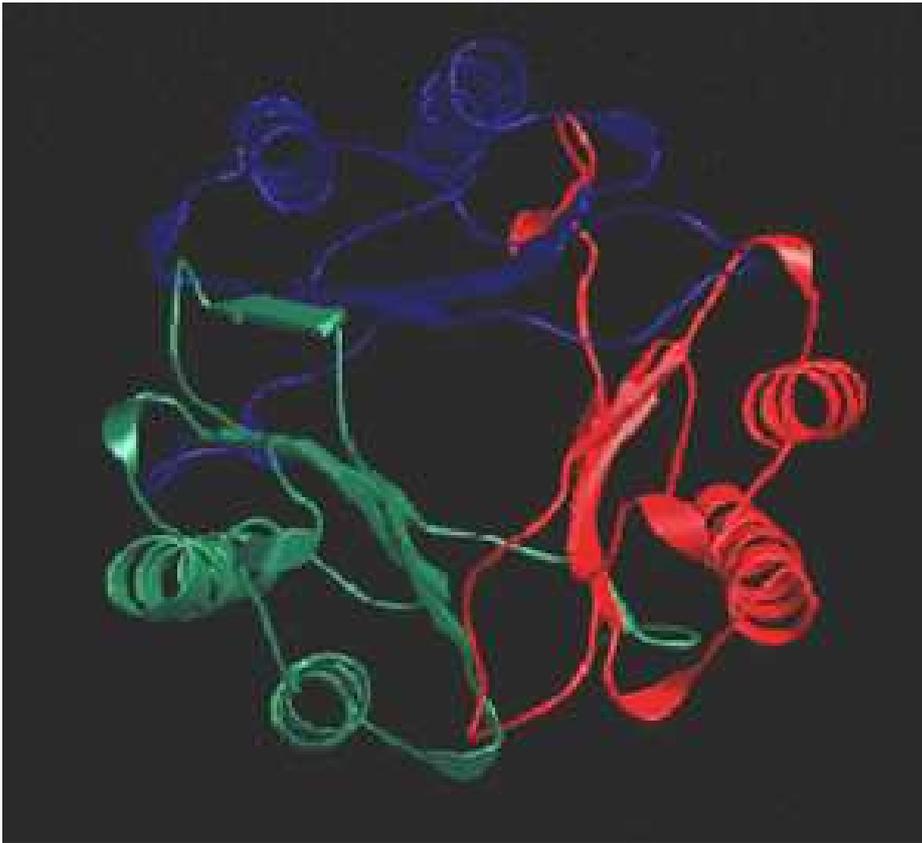


Abbildung 1: Ein dreidimensionales Modell von MIF in seiner trimeren Struktur (blau, grün und rot sind jeweils ein Monomer).

Nach der Klonierung von humanem MIF 1989 verstärkte sich das Interesse daran und viele weitere Untersuchungen ergaben letztlich das Bild, dass MIF ein immunregulatorischer Mediator mit Bedeutung für humanrelevante Krankheiten ist. Dies konnte in Krankheitsmodellen bei Mäusen wie dem septischen Schock [3], der rheumatoiden Arthritis [4-6], der Immunreaktion vom verzögerten Typ (IV) [7] oder der autoimmunen Kolitis [8] wie auch an Untersuchungen am Menschen und an humanen Zellen deutlich gezeigt werden.

Beim septischen Schock lösen Bakterien-Toxine wie zum Beispiel Lipoproteinpolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien eine komplexe Reaktion des Körpers aus, die häufig zum Tode führt. LPS verursacht die systemische Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ . Dadurch wird die Membrandurchlässigkeit der Gefäße gesteigert und die Gefäße weiten sich, wodurch der arterielle Blutdruck abfällt. Zusätzlich kommt es zu einem Stadium der Hyperkoagulabilität und der disseminierten intravasalen

Gerinnung (DIC); Blutungen und Verbrauchskoagulopathie sind die Folge. Diese Kombination von Hypotonus und Mikrothromben kann zum Multiorganversagen und schließlich zum Tode führen.

Da MIF stark von Makrophagen/Monozyten gebildet wird und MIF Serumspiegel im septischen Geschehen deutlich erhöht sind, testeten Calandra et al. die Funktion von MIF in einem Mausmodell des Endotoxinschocks. Während die Injektion von LPS oder TNF- $\alpha$  zum septischen Schock führte, löste die alleinige Gabe von MIF kein Schockbild aus. Andererseits wurde aber durch die kombinierte Gabe von MIF und LPS der Schockzustand verschlimmert und dies war mit einer erhöhten Mortalität verbunden [3]. Dazu passte, dass spezifische Antikörper gegen MIF im Mausmodell des Endotoxinschocks protektiv wirkten und den passiv immunisierten Mäusen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den mit Kontroll-IgG geimpften Mäusen brachten [9]. Weitere Untersuchungen im Modell der „coecal ligation and puncture“ bestätigten die ursprünglichen Untersuchungen und etablierten MIF als einen wichtigen Mediator der angeborenen Immunität.

Als weiteres Beispiel möchte ich die Bedeutung von MIF für die rheumatoide Arthritis anführen. In einem Arthritis-Rattenmodell fand sich eine Korrelation der MIF-Konzentration in der Gelenksflüssigkeit mit dem Grad der Inflammation und dem Krankheitsstadium. Im kontrollierten Experiment wurde MIF mittels spezifischen Antikörpern neutralisiert, was zu einem signifikanten Rückgang der klinischen Krankheitsparameter wie auch der zellulären Entzündungsreaktion führte [4].

Im Modell der kollagen-induzierten Arthritis in der Maus führte die Blockade von MIF mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern zu einer geringeren Inzidenz und zum späteren Auftreten von Arthritiden, nachdem man die Tiere mit Kollagen Typ II immunisiert hatte. Die Gelenksflüssigkeit dieser Tiere enthielt darüber hinaus weniger Immunglobulin IgG2a gegen Kollagen Typ II [5], was damit die vorangegangenen Versuche bestätigte und die Beteiligung von MIF bei der Entzündungsreaktion der rheumatoiden Arthritis untermauerte.

## **B: MIF als Wachstumsregulator und Mediator der Tumorgenese**

Das klassische Bild von MIF als ein proinflammatorisches Zytokin wurde erstmals durch die Beobachtung von Lanahan et al. erweitert, der beschrieb, dass MIF in Fibroblasten als ein „delayed-early response gene“ nach Wachstumsstimulation mit Serumfaktoren exprimiert wird [10]. In diesem System lösen externe Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF) und insulin-like growth factor I und II (IGF-I, IGF-II) über Bindung an entsprechende Rezeptoren und Weiterleitung des Aktivierungssignals durch Adapterproteine eine Proteinkinase-Kaskade aus. Der Ablauf dieser Signalkaskade erfolgt über eine zeitlich gestaffelte Aktivierung von für den weiteren Verlauf nötigen Genen (Zellteilung, Zelldifferenzierung etc.). Es lassen sich beispielsweise Gene identifizieren, die früh, also meist schon nach 30 Minuten, exprimiert werden (immediate-early response genes), andere folgen im Abstand von Stunden (delayed-early response genes) und sind sekundär. Bekannte primär exprimierte Gene sind zum Beispiel Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Jun, sekundäre sind beispielsweise HMGI(Y) und HMGI-C, zwei chromosomale Nucleohistone, die Adenine Phosphoribosyltransferase (APRT), MIP, Zyklin D1 oder der Bradykinin B2 Rezeptor. Die sequentielle Aktivierung führt im weiteren Verlauf zur entsprechenden Reaktion der Zelle auf den initialen Stimulus, also zum Beispiel zur Zellteilung.

Es folgten mehrere Studien, die weitere Hinweise auf eine Rolle von MIF in der Zellproliferation gaben. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden, dass MIF in Tumorzellen im Vergleich mit dem Primärgewebe überexprimiert ist. Dies konnte beim Prostata-, Urothel-, Kolon-, Mamma-Carcinom wie auch beim Lymphdrüsenkrebs nachgewiesen werden (N. Reinart et al., Manuskript in Vorbereitung). 2002 wurde von Meyer-Siegler et al. eine Studie über Prostata-Karzinome veröffentlicht, die eine positive Korrelation des MIF-Serumspiegels mit dem PSA-Serumspiegel und Prostatakarzinomen zeigte. Die Gewebeexpression von MIF korrelierte sogar mit der Aggressivität der Prostatakarzinome [11].

In vitro Experimente mit einer vom Kolonkarzinom stammenden Zelllinie (Colon-26) ergaben, dass man durch Blockierung von endogenem MIF durch Antisense-Technologie eine Reduktion der Wachstumsraten der Kolontumorzellen um 40% erreichen konnte [12]. An NIH/3T3 Fibroblasten konnten Mitchell et al. zeigen, dass MIF als Antwort auf Wachstumsfaktoren sezerniert wird und die Zellen bei

Blockade des sezerniertem MIF durch anti-MIF-Antikörper danach um bis zu 50% langsamer als die Kontroll-Zellen wachsen. Rekombinantes MIF half den Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase heraus in den Zellzyklus wieder einzutreten. MIF wirkte also auto- bzw. parakrin wachstumsstimulierend.

Diese Effekte von MIF auf Wachstum und Zellzyklus können das Tumorwachstum nicht nur direkt, sondern auch indirekt über die Neoangiogenese fördern [13]. Angiogenese ist ab einer bestimmten Größe des Tumors ein entscheidender Parameter fürs weitere Wachstum, weil sonst die Versorgung mit Nährstoffen für die Tumorzellen knapp wird. Chesney et al. injizierten Mäusen subkutan B-Zell-Lymphomzellen und beobachteten das Tumorwachstum [14]. Es zeigte sich, dass die Tumoren deutlich langsamer wuchsen, wenn die Mäuse mit MIF-Antikörpern behandelt wurden. Auch mit MIF-Antisense-Oligonukleotiden, Substanzen, die spezifisch die MIF mRNA degradieren und somit die Expression von MIF hemmen, wurde dieses Ergebnis beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass beide Effekte nicht nur mit einer geringeren Tumorzellproliferation, sondern auch mit einer gehemmten Angiogenese einhergingen.

Diese und andere histologische und biochemische Studien wiesen darauf hin, dass MIF als ein Tumorpromoter agiert.

Was passiert nun, wenn man bei Mäusen das MIF-Gen auf genetischem Wege ausschaltet? Fingerle-Rowson et al. generierten MIF Knock-Out Mäuse (MIF ko) auf reinem C57BL/6 Hintergrund und testeten den Phänotyp der MIF-Defizienz in verschiedenen Modellen. Auf den ersten Blick zeigten die MIF ko Mäuse keine Verhaltensauffälligkeiten, schienen nicht immundefizient, waren fertil und entwickelten keine morphologischen Abnormalitäten oder Spontantumoren.

Die ersten funktionellen Effekte zeigten sich an murinen embryonischen Fibroblasten (MEF) von MIF Wildtyp (MIF wt) und Knock-Out Mäusen in Zellkultur. MIF ko MEF zeigten in ihrem Wachstumsverhalten deutliche Unterschiede zu MIF wt Fibroblasten, indem sie schneller die Kontaktinhibition bei Konfluenz erreichten und nicht so leicht durch die Onkogene E1A und H-ras maligne transformierbar waren. Funktionell hing dies mit einer verstärkten Aktivität des p53-Pathways zusammen, denn das transkriptionelle Zielmolekül von p53, der zyklin-abhängige Kinaseinhibitor p21, war verstärkt exprimiert und die MIF ko Zellen hatten eine geringere Apoptoseschwelle als wt MEFs. Dazu

passte, dass Fibrosarkome durch chemische Tumorgenese in vivo bei MIF ko Mäusen kleiner als bei MIF wt Mäusen waren [15].

p53 ist ein wichtiges Wächterprotein des Genoms, das einerseits bei DNA-Schädigung einen reversiblen Wachstumsstopp oder eine Seneszenz der Zelle, was eine Form von irreversibler Arretierung der Zellteilung ist, auslösen kann [16]. Andererseits kann p53 eine Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) treiben, zum Beispiel wenn sich irreparable genetische Schäden angehäuft haben [16]. Die überragende Bedeutung von p53 für die Tumorerkrankungen des Menschen ist durch die Tatsache erklärt, dass p53 in einem großen Teil aller menschlichen Tumoren mutiert oder deletiert ist und der Verlust an funktionellem p53 mit der Aggressivität von Tumoren korreliert [17, 18]

Tumoren entstehen häufig auf dem Boden einer chronischen Entzündung. Beispielhaft möchte ich hierbei die Häufung von Kolonkarzinomen auf dem Boden einer Colitis ulcerosa [19, 20], die Entstehung eines Magenkarzinoms bei Helicobacter-positiver Gastritis [21] oder die Entwicklung von Urothelkarzinomen bei chronischer Bilharziose [22] nennen. Da MIF funktionelle Eigenschaften besitzt, die Entzündungsvorgänge wie auch maligne Entartung fördern können, wird MIF als ein molekulares Verbindungsglied zwischen Inflammation und Tumorgenese angesehen. Im Nachfolgenden erläutere ich die bisher gefundenen Bindungspartner und die gängigen Theorien über die Wirkmechanismen von MIF.

### **C: Mechanismen der MIF Aktivität**

MIF kann sehr unterschiedliche biologische Prozesse wie die Produktion/Sekretion von Zytokinen und Mediatoren wie NO, PGE2 oder TNF- $\alpha$ , die Angiogenese, die Insulinsekretion, die Zellmigration, die Apoptose, die Zelldifferenzierung und vieles mehr beeinflussen. Zum einen erklären sich diese pleiotropen Effekte durch die ubiquitäre Expression von MIF, denn jede Zelle des Körpers exprimiert MIF, wenn auch in unterschiedlicher Stärke. Zum anderen kommt hinzu, dass MIF ein bifunktionales Molekül mit einer intrazellulären wie auch einer extrazellulären Wirkkomponente ist.

#### **MIF bindet an Jab-1 intrazellulär**

Kleemann et al. [23] suchten in einem Yeast two hybrid-screen nach Bindungspartnern von MIF. Drei Klone wurden gefunden, zwei davon waren MIF, was indirekt das Konzept der Trimer-Oligomerisation von MIF bestätigte [24], der dritte Klon enthielt c-Jun activating binding protein-1 (Jab-1), welches als ein Koaktivator des Transkriptionsfaktors AP-1 bekannt ist. Anschließend „pull-down“ Experimente und Immunopräzipitationen bestätigten nochmals, dass die biochemische Interaktion von intrazellulärem MIF und Jab-1 wirklich valide war.

AP-1 ist ein gut untersuchter Transkriptionsfaktor der Fos- und Jun-Proteinfamilie [25], welcher eine DNA-Bindungsdomäne besitzt, die die Region 5'-TGA[C/G]TCA-3' (die man in den regulierenden Domänen zahlreicher Gene findet) spezifisch erkennen kann. Die AP-1 Aktivität wird kontrolliert durch DNA-schädigende Umstände wie UV-Strahlen, Hitze oder Gifte sowie durch inflammatorische oder wachstumsstimulierende Zytokine [26], was auf seine mögliche Bedeutung in der Tumorgenese hinweist.

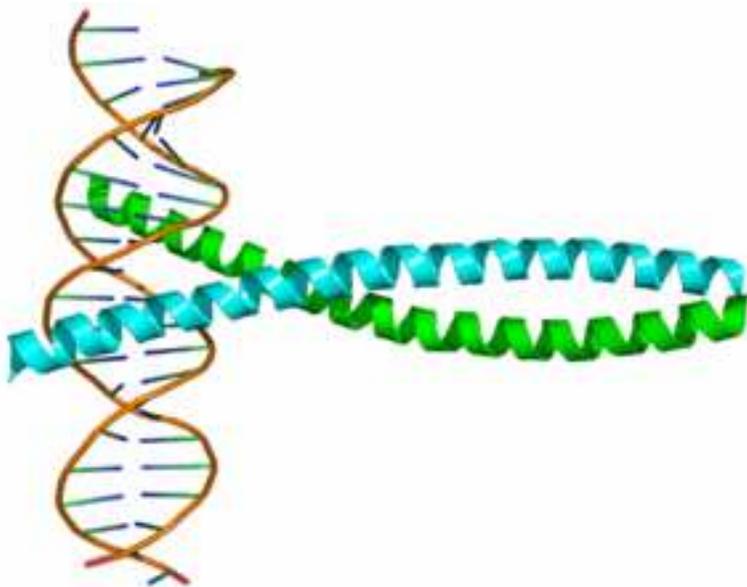


Abbildung 2: Der AP-1 / DNA Komplex. AP-1 bindet an DNA und spaltet die Doppelhelix mittels eines „Leucin-Zipper“. Kristallographische Struktur des AP-1 Heterodimer bestehend aus c-Fos (zyanblau) und c-Jun (grün). Braun: DNA Doppelhelix.

Jab-1 koaktiviert AP-1, indem es den Komplex von c-Jun und c-Fos stabilisiert [27]. MIF selbst hemmt die Aktivität von Jab-1, was funktionell überraschend ist, denn dieser Effekt würde anti-proliferativ wirken. Ferner musste geklärt werden, ob auch extrazelluläres MIF an Jab-1 binden kann. Dafür biotinylierten Kleemann et al. MIF [23], gaben dieses zur Zellkultur und konnten dann in vitro

beobachten, wie es in die Zelle und in das Zytosol gelangt und sich an Jab-1 lagert. Der Mechanismus der Aufnahme ist jedoch noch nicht im Detail geklärt, aber man geht davon aus, dass die Aufnahme in das Zellinnere nicht rezeptorvermittelt ist, da Sättigung erst bei sehr hohen Konzentrationen auftritt, sondern dass sie durch Endozytose vermittelt wird. Wie MIF anschließend jedoch durch die Vesikelmembran in das Zytosol transportiert wird, ist bisher unklar; denn MIF weist keine spezifischen Sequenzen auf, die den Transport katalysieren würden, wie es etwa bei dem HIV-1 tat Protein oder Drosophila antennapedia der Fall ist [28].

Angekommen im Zytosol lagert sich MIF einerseits so an Jab-1, dass Jab-1 daran gehindert wird, das Dimer AP-1 zu stabilisieren, wodurch die AP-1 Aktivität gehemmt wird. Dazu kommt noch, dass MIF die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) hemmt, die c-Jun phosphoryliert. Die mittels UV-Strahlung oder TNF- $\alpha$  induzierte AP-1 Aktivität konnte durch MIF rückgängig gemacht werden.

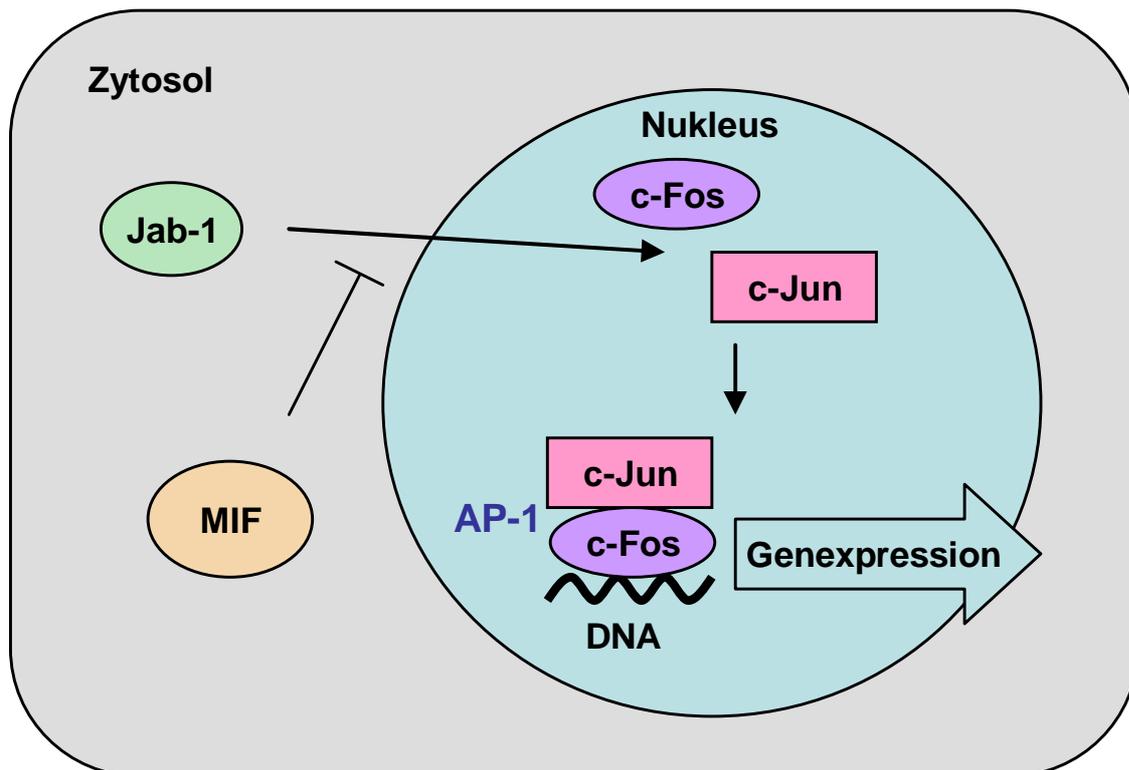


Abbildung 3: MIF hemmt die Jab-1 abhängige Aktivierung von AP-1. MIF = macrophage migration inhibitory factor, Jab-1 = Jun activating binding protein 1, AP-1 = activator protein 1, DNA = desoxyribonucleic acid.

Eine zweite Möglichkeit, wie MIF über Jab-1 auf den Zellzyklus Einfluss nehmen kann, ist über den cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) p27. P27 ist ein

wichtiges Kontrollprotein im Zellzyklus, welches die Zellzyklusprogression sehr effizient stoppen kann. Jab-1 beschleunigt den Abbau von p27 [29] und kann somit Zellen vor einem p27-vermittelten Wachstumsstopp retten. Die Interaktion von MIF mit Jab-1 via p27 führt letztlich dazu, dass MIF anti-proliferativ wirkt.

### **MIF und das Proteasom**

Wie die Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen konnten, basieren diese beiden Beispiele für die Jab-1-vermittelten Effekte von MIF auf der Funktion von Jab-1 als Regulator des SCF-Komplexes (SCF = skip-cullin-F-Box). Dieser Multiproteinkomplex ist in der Evolution hoch konserviert und besitzt eine wichtige biologische Funktion: Er bestimmt - neben dem APC/C-Komplex (anaphase promoting/cyclosome complex) - nämlich, welche Proteine ubiquityliert und danach über das Proteasom proteolytisch abgebaut werden. Damit haben diese beiden Komplexe erheblichen Einfluss auf den Zellzyklus, denn auch die Zellzyklus regulierenden Proteine, die Zykline [30] und deren Regulatoren, die CDKs [31], sowie zahlreiche Weitere (c-Jun [32], c-myc [33], p21, p27 [34],  $\beta$ -Kathenin und Notch [35]) werden vom Proteasom abgebaut und unterliegen so letztendlich auch der Kontrolle des SCF- [36] und des APC/C-Komplexes [37]. Somit ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen des SCF-Komplexes in maligner Entartung resultieren können [38].

Der SCF-Komplex besteht aus vier Untereinheiten. Die variable Einheit, die so genannten F-Box Proteine, von denen beim Menschen bislang mehr als 70 bekannt sind, fungiert als Substrat-Erkennungseinheit. Die Rbx-1 und die Cul1 Untereinheiten wirken als katalytisches Zentrum und werden durch Anlagerung des Proteins Nedd8 stimuliert [39]. Dieser Prozess wird wiederum kontrolliert über das CSN/COP9 Signalosom, einem Multiproteinkomplex mit essentiellen Aufgaben in der Zelldifferenzierung [40].

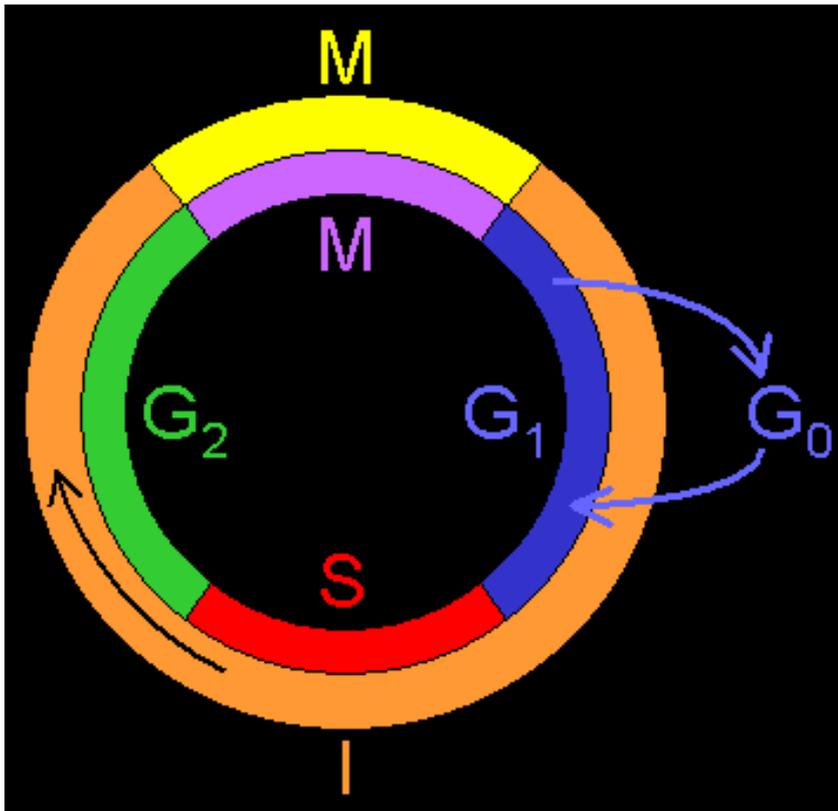


Abbildung 4: Der Zellzyklus. Der SCF-Komplex ist während der späten G1 bis zur frühen M-Phase aktiv, der APC/C-Komplex hingegen von der mittleren M-Phase bis zum Ende der G1-Phase. M: Mitose, I: Interphase, S: Synthese Phase, G: gap-Phase = Zwischenphase (Wikipedia, GNU Free Documentation licensed).

Eine Untereinheit des CSN/COP9 Signalosoms ist Jab-1, welches auch component 5 des COP9 Signalosoms (CSN) bezeichnet wird (Jab-1 = CSN5) [41]. Jab-1 wirkt in diesem CSN-Komplex als Metalloprotease und entfernt die Proteinmodifikation Nedd8 von Cullin, was zum Zerfall des aktiven SCF-Komplexes und zum Verlust seiner Ubiquitylierungsaktivität führt [42]. Andererseits verhindert CSN5 den Abbau von F-Box Proteinen und wirkt so protektiv auf den SCF-Komplex [43]. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Auswirkungen der Funktion von Jab-1/CSN5 auf die Ubiquitylierung und damit auf die proteasomale Degradation von intrazellulären Proteinen komplex und noch nicht in allen Details geklärt sind. Was aber feststeht, ist die Tatsache, dass eine genaue Kontrolle des Jab-1/CSN5 Komplexes für die Zelle extrem wichtig ist und MIF bei diesem Prozess beteiligt ist.

Dies ist mit weit reichenden Konsequenzen behaftet. Knock-Out Modelle von Untereinheiten des CSN Komplexes, zum Beispiel auch von Jab-1/CSN5, waren für die Mäuse-Embryonen jeweils tödlich [44], was unter anderem auf die

fehlgel leitete Degradierung von für den Zellzyklus essentiellen Proteinen wie Zyklin E und p27 zurückgeführt wurde.

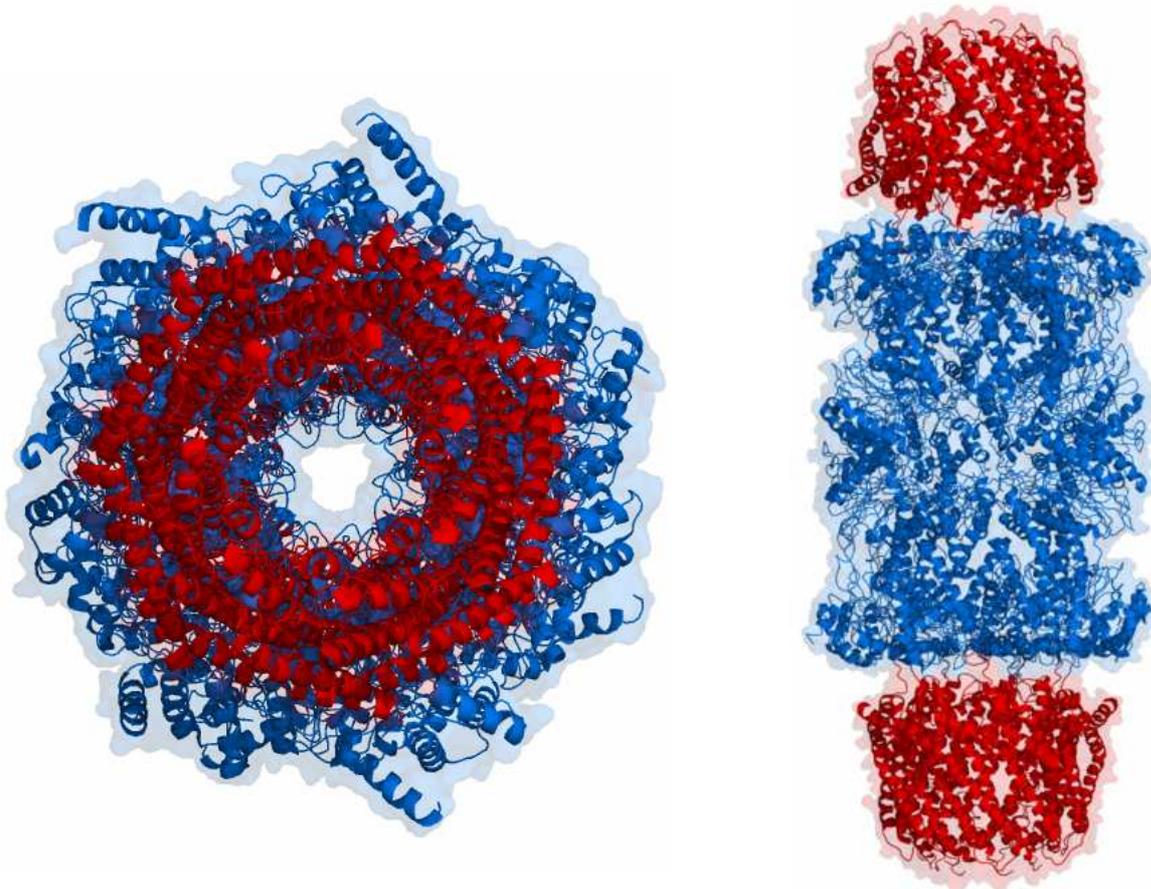


Abbildung 5: Das Proteasom. Es ist ein 1.700 kDa schwerer Proteinkomplex, der als multikatalytische Protease im Zytosol und im Zellkern Proteine abbaut. Dazu zählen metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren und zellzyklusregulierende Proteine wie die Zykline und die zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs). Blau: Enzymatisch aktive Seite. Rot: Proteineinheiten, die den Zugang zum abbauenden Zentrum regulieren (Wikipedia, GNU Free Documentation licensed).

Neuere Daten lassen vermuten, dass MIF wichtig ist, um unter physiologischen Bedingungen den SCF-Komplex in einem kontrollierten Zustand zu halten. Aufgrund der Vielzahl von wachstumsregulatorischen Proteinen mit teils wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Funktionen, welche durch den SCF-Komplex reguliert werden, ist es theoretisch zu erwarten, dass MIF als Tumorpromoter wie auch als Tumorsuppressor agieren kann.

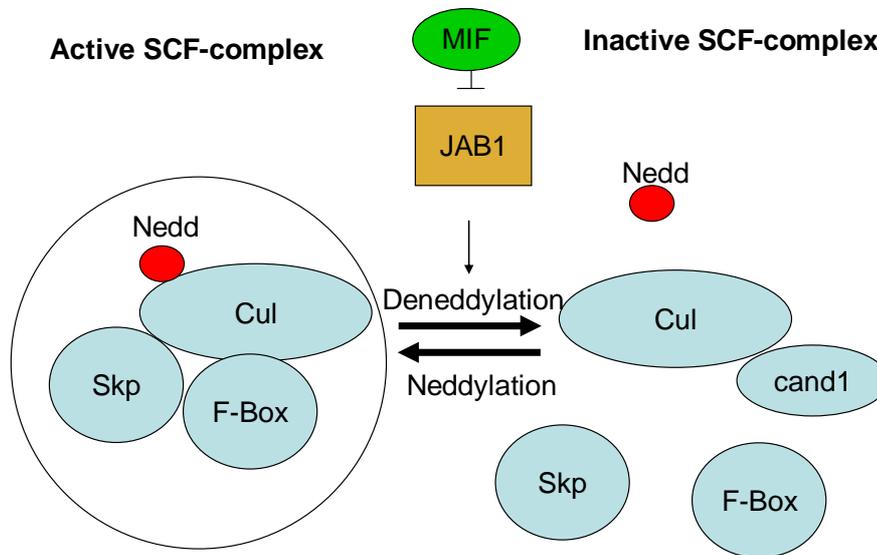


Abbildung 6: Funktionelle Interaktion von MIF mit dem SCF-Komplex. Jab-11 deneddyliert Cullin, wodurch der SCF-Komplex zerfällt und das inhibitorische cand1 Cullin bindet. Die Inhibition von JAB1 durch MIF sorgt dafür, dass der SCF-Komplex in ausreichendem Masse in funktionstüchtigem Zustand vorhanden ist. MIF = macrophage migration inhibitory factor, JAB1 = Jun activating binding protein 1, SCF-complex = skip-cullin-F-Box, Nedd = Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated, Cul = Cullin, Skp = S-phase kinase-associated protein.

Trotz der vielen Befunde, die auf Jab-1/CSN5 als funktionellen Partner von MIF hindeuten, gibt es doch auch klare Hinweise, dass viele Funktionen von MIF durch sezerniertes MIF ausgelöst werden, wie im Folgenden dargelegt wird.

### **MIF bindet an membranäres CD74**

2003 konnte von Leng et al. gezeigt werden, dass MIF an einen Rezeptor an der Zelloberfläche bindet [45]. MIF wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 488 markiert. Nun wurden COS-7 Zellen mit einer cDNA Library transfiziert, mit Alexa-MIF markiert und mittels Durchflusszytometrie die Alexa-MIF exprimierenden Zellen sortiert. Nach mehreren Durchgängen konnten so Zellklone etabliert werden, welche eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit für Alexa-MIF besaßen als die Ausgangspopulation. Die Analyse der in diesen Zellen exprimierten cDNA ergab, dass der Zelloberflächenrezeptor CD74, ein nicht-

polymorphes Polypeptid, das mit Major-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) Klasse-II Proteinen intrazellulär assoziiert ist (und daher auch „invariant chain“ genannt wird) als MIF-Rezeptor agiert. Die invariant chain hilft MHC-Klasse II Proteine von antigen-präsentierenden Zellen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zu transportieren und verhindert dabei, dass Antigenpeptide zu früh an das MHC-Klasse II-Protein binden [46]. Die invariant chain besitzt in ihrer Struktur eine transmembrane Domäne, worüber es in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verankert wird. Der Hauptanteil der invariant chain zirkuliert im Zytosol, nur etwa 2-5% der zellulären invariant chain werden als CD74 auf der Zelloberfläche exprimiert [47].

Wie wirkt CD74? Man weiß, dass CD74 Knock-Out Mäuse ausgeprägt immundefizient sind, und zwar in einem Maße, das man nicht allein aus der Funktion als MHC-II Chaperone erklären kann [48]. Die Expression von MHC Klasse II Molekülen ist zwar im CD74 Knock-Out vermindert, aber nicht in einem sehr starken Maße. Erkenntnisse der Gruppe um I. Shachar am Weizman Institute in Israel zeigten, dass CD74 über Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges eine wichtige Rolle im Reifungsprozess von B-Lymphozyten spielt und dass CD74-Defizienz mit einem Differenzierungsblock der B-Lymphozyten zwischen Marginalzone und folliculärer Zone assoziiert war. Dies führte dazu, dass die absolute Zahl an B-Lymphozyten in der CD74 Knock-Out Maus vermindert war [49].

Die intrazelluläre Domäne von CD74 (CD74-ICD) wird während der Aktivierung von CD74 durch eine membranständige Protease abgespalten. CD74-ICD transloziert zum Zytosol, wo es die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors bewirkt. Neben dem NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg besitzt CD74 auch noch eine Signaltransduktionsmöglichkeit über den Korezeptor CD44. Dieses ist ebenfalls auf allen CD74-exprimierenden Zellen vorhanden [50].

Als wichtig erscheint der Umstand, dass CD74 an einigen Teilen der biologischen MIF Aktivität beteiligt ist. Wie wir später noch sehen werden, ist die Induktion der p44/p42 (ERK1/2) mitogenaktivierenden Proteinkinase, kurz MAP Kinase, ein Teil der bisher beobachteten MIF Bioaktivität. Im Westernblot wurde die Konzentration der phosphorylierten p44/p42 nach MIF Induktion in CD74 Wildtyp und CD74 Knock-Out Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass MIF im CD74 Knock-Out Modell keine Phosphorylierung von p44/p42 erreichen konnte, ebenso wenig

die reaktive Ausschüttung von PGE<sub>2</sub>. Auch die Wachstumsstimulierung, die mit der Induzierung des MAP-Kinasen Systems einhergeht, war signifikant erniedrigt. Die gleichen Effekte ließen sich erzielen, indem CD74 mit Antikörpern blockiert wurde. Zur Kontrolle wurde auch die IL-6 induzierte MAP-Kinasen Kaskade untersucht, welche von CD74 Antikörpern unbeeinflusst blieb. Diese Daten sprechen dafür, dass MIF bei diesen Zellen an CD74 bindet und dieser Rezeptor essentiell für die Weitergabe des MIF-Signals ist [45].

### **MIF aktiviert den MAP Kinase Signaltransduktionsweg**

Was hat es mit den MAP-Kinasen nun auf sich? Wie seit langem bekannt ist, proliferieren Säugetierzellen in Kultur nur dann, wenn zusätzlich zum Medium noch Serum hinzu gegeben wird. Dieses enthält nämlich mitogen-wirkende Wachstumsfaktoren, ohne die die Zellen entweder in Apoptose gehen oder in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus verharren („serum starvation“). Beispiele für im Serum vorkommende Wachstumsfaktoren sind der epidermale Wachstumsfaktor EGF, der Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF und die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und II. Diese Zytokine binden an integrale Membranproteine als Rezeptoren, die Tyrosinkinase-Aktivität besitzen und sich intrazellulär selbst phosphorylieren. Gewisse Adapterproteine wie SOS oder Grb2 mit SH<sub>2</sub>-Domänen („src homology domains“) können dann an diesen Phosphat-Gruppen andocken und dadurch das G-Protein Ras aktivieren. Dieses wiederum aktiviert die Raf-Kinase, die in einer weiteren Reaktion zur Aktivierung der Mitogen aktivierenden Protein (MAP) Kinase führt. Diese MAP Kinase wird auch als p44/p42 und sogenannte „extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAP bezeichnet [51]. MAP-Kinasen wiederum aktivieren dann durch Phosphorylierung eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren und zytosolischen Proteinen wie P90<sup>rsk</sup>, c-myc und die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>).

Zusammenfassend lässt sich über die gut untersuchte MAP-Kinasen-Kaskade sagen, dass es die gemeinsame Endstrecke zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren ist und über Phosphorylierung auf zytosolische Enzymaktivitäten und Transkriptionsfaktoren einwirkt und mitogene Eigenschaften besitzt.

In den Proliferationsexperimenten von Mitchell et al. [52] wurde gefunden, dass MIF länger als die meisten anderen Zytokine in der Lage ist, die MAP-Kinase in

aktiviertem Zustand zu halten, nämlich bis zu 24 Stunden. Auch fand sich, dass diese Aktivierung abhängig von der Proteinkinase A (PKA) ist, denn PKA-Inhibitoren konnten die durch MIF induzierte MAP-Kinasen Aktivität unterdrücken.

Die durch MIF aktivierten MAP-Kinasen führten letztlich zu einer Phosphorylierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>, deren Produkt Arachidonsäure ist. Aus Arachidonsäure werden von der Zelle Leukotriene und Prostaglandine gebildet, also entzündungs- und proliferationsaktive Substanzen, die auch bei der Tumorentstehung von großer Bedeutung sind [53]. Das passt auch zu dem Befund, dass MIF Zellen zur Ausschüttung von PGE<sub>2</sub> veranlassen kann [45].

### **MIF inhibiert die Glukokortikoidwirkung**

Eben hier setzt ein weiterer Effekt von MIF an, der sich weniger auf die Proliferation bezieht, als vielmehr auf die immunmodulatorische Wirkung von MIF, nämlich der Hemmung der Glukokortikoidwirkung [54, 55]. Wie schon beschrieben, kann zusätzlich verabreichtes rekombinantes MIF in inflammatorischen Modellen in der Maus (wie dem septischen Schock oder der rheumatoiden Arthritis) die therapeutische Wirkung von Glukokortikoiden aufheben [6, 55]. In vitro kann MIF die immunsuppressiven Effekte der Glukokortikoide auf TNF- $\alpha$  induzierte Arachidonsäureproduktion aufheben [52].

Glukokortikoide werden in der Nebennierenrinde ausgeschüttet und stehen unter der Kontrolle von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen. Die immunsuppressiven Effekte macht sich die Medizin bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und anderen entzündlichen Erkrankungen zunutze. Glukokortikoide hemmen unter anderem die Phospholipase A<sub>2</sub> (PL A<sub>2</sub>), die, wie oben erwähnt, Arachidonsäure produziert und folglich zur Produktion von Entzündungsmediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen beiträgt. Und eben jene PL A<sub>2</sub> wird unter anderem von MIF aktiviert [52]. Allerdings ist das nicht der einzige molekulare Mechanismus, über den MIF auf die Glukokortikoide wirken könnte.

## MIF erhöht die NF- $\kappa$ B Konzentration im Zellkern

Schon seit längerem ist bekannt, dass physiologische Spiegel von Hydrokortison die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  im Zytosol erhöht und dadurch die Konzentration von NF- $\kappa$ B im Nukleus erniedrigt. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in Immunzellen vorkommt und als Antwort auf eine Reihe von Stresssituationen (wie inflammatorische Zytokine, LPS, Bakterien und Viren) aktiviert wird. Es reguliert eine Vielzahl von Genen, die für eine frühe Abwehr- und Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wie Zytokine (z.B. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ), Adhäsionsmoleküle, Immunrezeptoren und Akut-Phase-Proteine [56].

NF- $\kappa$ B ist ein heterodimeres Protein und besteht aus den Untereinheiten p50 und p65, die die Consensussequenz 5'-GGGACTTCC-3' erkennen. In seinem inaktiven Zustand liegt es im Zytosol an ein inhibitorisches Protein namens I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden vor, das spezifisch an die p65 Untereinheit bindet. Nach Aktivierung dissoziiert NF- $\kappa$ B von I $\kappa$ B $\alpha$ , transloziert in den Nukleus und wirkt dort transkriptionsaktivierend [57, 58].

Glukokortikoide ihrerseits erhöhen die Expression des inhibitorischen Proteins I $\kappa$ B $\alpha$ , welches NF- $\kappa$ B im Zytosol gebunden hält und dadurch die Expression inflammatorisch wirkender Gene verhindert [59].

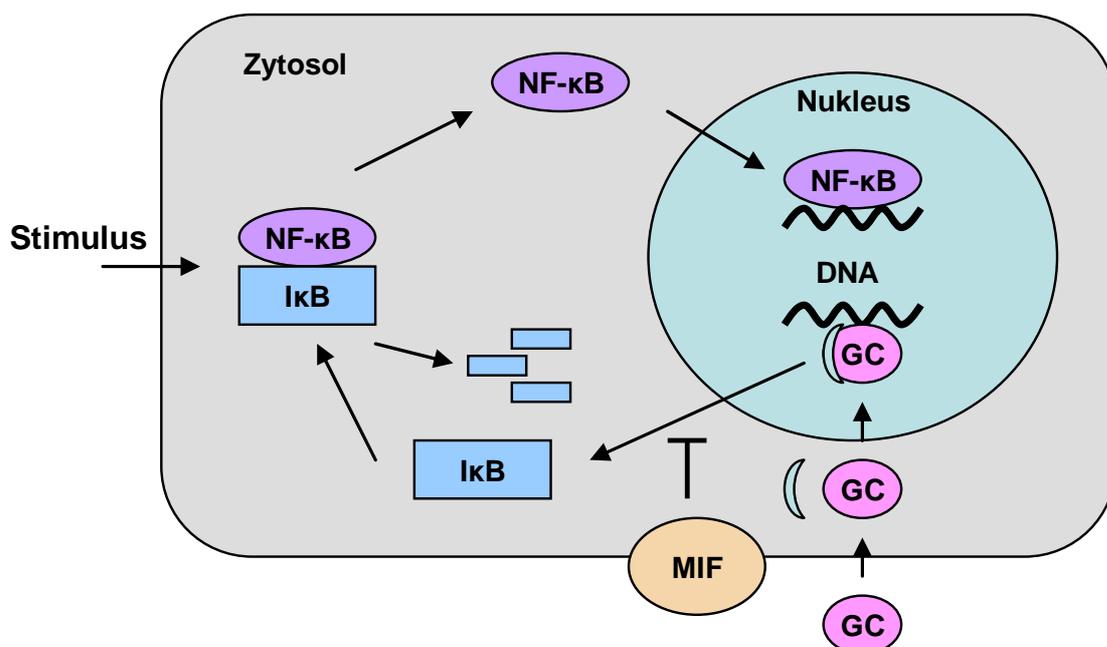


Abbildung 7: Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Regelkreis zwischen einem Stimulus (inflammatorische Zytokine, LPS, Bakterien oder Viren) auf der einen Seite und der Hemmung durch I $\kappa$ B $\alpha$  und Glukokortikoide (= GC mit intrazellulärem Rezeptor) auf der anderen Seite sowie

der GC-Hemmung durch MIF. NF- $\kappa$ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, GC = Glucocorticoid, grüne Sichel = GC-Rezeptor, graues Rechteck = dissoziiertes, inaktives I $\kappa$ B, MIF = macrophage migration inhibitory factor.

MIF konnte in in vitro Experimenten mit Monozyten die inhibierende Wirkung der Glukokortikoide auf NF- $\kappa$ B aufheben [60]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch Aufhebung der I $\kappa$ B $\alpha$ -aktivierenden Wirkung des Hydrokortisons erzielt wird. Dadurch kann mehr NF- $\kappa$ B in den Nukleus gelangen und somit Einfluss auf die Transkription nehmen. Auch in mit LPS vorbehandelten Zellen, in denen normalerweise die NF- $\kappa$ B Konzentration im Nukleus ohne Hydrokortison stark zunimmt, diese Zunahme nun aber in Anwesenheit von Hydrokortison wieder rückgängig gemacht wurde, hebt MIF die Wirkung von Hydrokortison auf und lässt die NF- $\kappa$ B Spiegel im Nukleus wieder ansteigen [60].

### **MIF beeinflusst die p53-Aktivität**

Apoptose kann durch diverse Auslöser eingeleitet werden. Zum Beispiel führt ein Mangel an Wachstumsfaktoren bei Fibroblasten in vitro zur Apoptose, was die Verwendung eines Serums zur Kultivierung der Zellen notwendig macht. Der Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) induziert sogar über einen speziellen Rezeptor den programmierten Zelltod, während der Mechanismus bei Glukokortikoiden, die Lymphozyten zur Apoptose bringen, noch nicht vollständig geklärt ist. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird vermehrt in der Zelle produziert, wenn sich DNA Schäden am Genom häufen, und löst ebenfalls Apoptose aus. Indem die Zelle in den programmierten Zelltod geht, werden DNA-Schäden, die potenziell in maligner Entartung, also unkontrolliertem Wachstum einer einzelnen Zelle und letztendlich einer Bedrohung des ganzen Organismus enden können, früh erkannt, neutralisiert, und es wird verhindert, dass sie an die Nachkommenschaft weitergeben [61].

Zellen, die p53-defekt sind, akquirieren schädliche Genommutationen, ohne in die Apoptose gehen zu können. Dies kann zur Entartung dieser Zellen und letztendlich zur Tumorentstehung führen [62]. Außerdem begrenzt p53 die Anzahl der Zellteilungen und kann zur Seneszenz, einer Form des irreversiblen Wachstumsstopps führen. Es besitzt somit eine wichtige Schutzfunktion für die genomische Integrität und wird deshalb oft „Gatekeeper“ oder „Wächter des Genoms“ genannt.

Die bisherigen Befunde über MIF und p53 sind vielfältig und manchmal widersprüchlich. Fest steht, dass sich in diversen Experimenten eindeutige Interaktionen von MIF auf p53 nachweisen lassen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass MIF die p53-vermittelte Apoptose und Genaktivierung hemmen kann [63]. In MIF Knock-Out Mäusen wurde gefunden, dass embryonische Fibroblasten, in Kultur genommen, schneller Kontakt inhibiert wurden und resistenter gegenüber ras-vermittelter Transformation waren [15]. P21, ein wichtiges downstream Zielprotein von p53, wurde dementsprechend vermehrt exprimiert. Diese Effekte wurden in p53 defizienten Mäusen jedoch wieder aufgehoben, was ein Wechselspiel zwischen MIF und p53 nahe legt.

Dass MIF mit Jab-1 interagiert, wurde bereits dargelegt. Jab-1 seinerseits wird als wichtiger Modulator der p53 Aktivität beschrieben. Der Mechanismus dieser Interaktion ist vielfältiger Natur, beinhaltet er nicht nur die Jab-1 vermittelte Dislokation von p53 vom Zellkern in das Zytosol, sondern auch eine posttranslationale Modifikation von p53 [64]. Demgegenüber fand man in Jab-1 defizienten Mäusen erhöhte Konzentrationen nicht nur von p53, sondern auch vom bereits genannten p27 [44], so dass im Umkehrschluss nahe liegt, dass Jab-1 die p53 Konzentration reguliert.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass MIF über vielfältige Mechanismen an der Tumorentstehung beteiligt ist.

### **MIF verfügt über Tautomerase-Aktivität**

Für ein Zytokin oder Chemokin besitzt MIF aus Evolutionssicht eine ungewöhnlich hoch konservierte Struktur. MIF homologe Proteine lassen sich in Pflanzen ebenso finden wie in Insekten, Würmern und Wirbeltieren [65-68]. Die Aminosäuresequenz von parasitärem oder murinem MIF zu humanem MIF ist zu 27% bzw. zu 98% identisch.

In der Aminosäuresequenz finden sich eine Reihe von hochkonservierten Aminosäuren wie Prolin 1, Threonin 7, Asparagin 8, Lysin 32, Prolin 33, Prolin 56, Cystein 57, Alanin 58, Leucin 59, Cystein 60, Serin 64, Isoleucin 65, Glycin 66, Asparagin 73, Leucin 88, Isoleucin 97, die zwischen dem Tomaten-Genom und dem humanen Genom identisch sind. Eine wichtige Rolle kommt möglicherweise

Prolin 1 zu, denn es wurde entdeckt, dass MIF eine enzymatische Aktivität als Keto-Enol-Tautomerase besitzt [69].

Tautomerie ist ein Spezialfall der Isomerie und bezeichnet die Eigenschaft von organischen Verbindungen, in zwei ineinander umwandelbaren Strukturen mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften zu existieren. Eine Keto-Enol-Tautomerase katalysiert die intramolekulare Protonenwanderung zwischen einem sekundären ungesättigten Alkohol und einem gesättigten Keton.

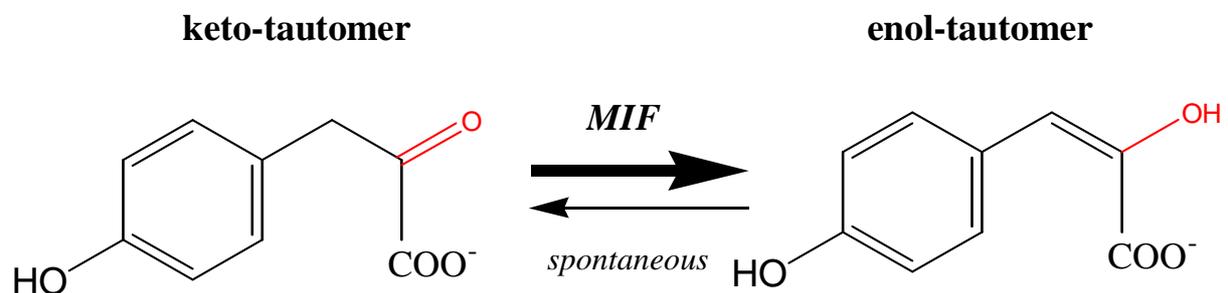


Abbildung 8: MIF als Tautomerase. MIF = macrophage migration inhibitory factor.

Diese enzymatische Aktivität von MIF wurde zufällig bei der Suche nach Katalysatoren in der Melanin-Biosynthese entdeckt. MIF ist in der Lage, die auch spontan ablaufende Konversion von D-Dopachrom zu 5,6-dihydroxyindol-2-carboxylsäure (DHICA) zu katalysieren. Diese Reaktion ist aber gewiss ein Artefakt, denn D-Dopachrom kommt physiologischerweise nicht vor. Nur das L-Isomer von Dopachrom ist physiologisch und fungiert als Zwischenstufe in der Melanin Biosynthese.

Die Suche nach anderen Substraten für die Tautomeraseaktivität von MIF ergab noch p-Hydroxyphenylpyruvat. Allerdings besitzt diese Reaktion eine zu hohe Michaelis-Konstante (KM) und benötigt unphysiologisch hohe Substratspiegel, so dass man auch hier davon ausgehen muss, dass p-Hydroxyphenylpyruvat kein physiologisches Substrat ist [69].

Weitere Evidenz für eine potentielle Bedeutung von MIF als Tautomerase besteht in der strukturellen Ähnlichkeit von MIF mit anderen bakteriellen Tautomerasen wie der 4-Oxalocrotonat Tautomerase (4-OT) und der 5-Carboxymethyl-2-

Hydroxymuconat Isomerase (CHMI). Diese Enzyme katalysieren Vorgänge im Stoffwechsel von aromatischen Aminosäuren in Substrate für den Zitronensäure-Zyklus [70].

Die Analyse der dreidimensionalen Struktur von MIF zeigt eine einschlägige Ähnlichkeit mit diesen zwei bakteriellen Enzymen [71], die einzigartig unter den bekannten murinen Enzymen ist. Die Vermutung, dass die enzymatische Aktivität durch die dreidimensionale Form ermöglicht wird, bestätigt sich durch Knock-Out Experimente einzelner Aminosäuren. Die Beschneidung des C-Terminus resultiert nicht nur in der Unmöglichkeit der Trimerisierung, sondern auch im Verlust der enzymatischen Aktivität [72]. Der N-Terminus seinerseits wird durch die Aminosäure Prolin 1 gebildet, die an der gleichen Position in der 4-OT und der CHMI gefunden wird.

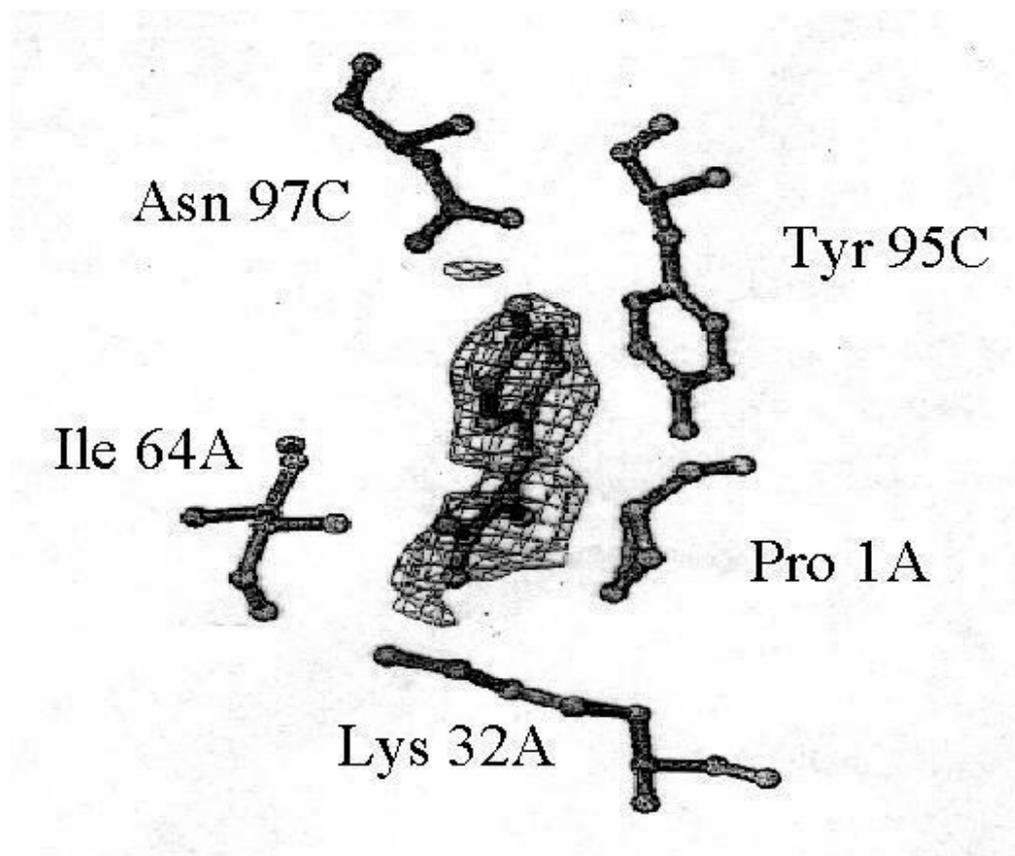


Abbildung 9: Schematische Darstellung der katalytischen Tasche von MIF. Das Trimer besteht aus den Monomeren A, B, C. Beteiligte Aminosäuren: Pro 1A = Prolin an Position 1 des MIF-Monomers A. Lys 32A = Lysin an Position 32 des MIF-Monomers A, Ile 64A = Isoleucin an Position 64 des Monomers A, Asn 97C = Asparagin an Position 97 des Monomers C, Tyr 95C = Tyrosin an Position 95 des Monomers C.

Knock-Out Experimente konnten zeigen, dass durch Verlust des endständigen Prolin 1 zwar die Trimer-Struktur erhalten bleibt, aber die Tautomeraseaktivität verloren geht. Dieser Befund spricht dem Prolin 1 eine Schlüsselfunktion in der enzymatischen Aktivität von MIF zu. Die Erklärung findet man in der dreidimensionalen Struktur, die eine enzymatische Tasche bildet mit Prolin 1 in zentraler Stellung (enzymatisches Zentrum). Prolin 1 fungiert in dieser Position als katalytische Base.

Freilich konnten diese Untersuchungen nicht die Frage klären, ob MIF seine biologische Aktivität über die Tautomerase-Aktivität entfaltet, oder ob es nur eine rudimentäre Eigenschaft von MIF ist, die ohne biologische Bedeutung ist.

Zur weiteren Klärung der biologischen Relevanz der Tautomerase-Aktivität für MIF konnte ich in dieser Arbeit ein Mausmodell benutzen, bei dem auf gentechnischem Wege das N-terminale Prolin gegen Glycin ausgetauscht wurde (P1G Mutante).

## **D: Gen-Targeting mit Cre/loxP**

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse entstammen Linien, die mittels des Cre/loxP-Rekombinationssystems hergestellt worden waren [15, 73]. Diese Technik soll hier kurz dargestellt werden:

Das Prinzip des Gen-Targeting beruht auf der Fähigkeit von Zellen zur homologen Rekombination, also dem Austausch von homologen DNA-Bereichen zwischen zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen [74]. Unter homolog versteht man, dass die Nukleotidsequenzen identisch sind. Es lagern sich zunächst die homologen Bereiche an („Paarung“), und im Folgenden kommt es zum Crossing-Over. Dieser Prozess besitzt große Bedeutung in der Meiose, denn er trägt zur genetischen Variabilität der Nachkommenschaft bei.

### **A ) Konventionelles Gen-Targeting**

Nun kann man sich diesen Mechanismus zunutze machen, indem man das Ziel-Gen mittels eines von außen eingeführten Plasmids, welches zum Zielgen in großen Bereichen homolog ist, in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) austauscht. Trägt das Plasmid das Ziel-Gen zum Beispiel in inaktivierter Form in

sich, entsteht somit ein inaktives Genallel in den ES-Zellen. Man kann die Zellen, die die Rekombination erfolgreich durchgeführt haben, durch weitere in das Plasmid eingebundene Selektionskassetten anreichern. Zu diesem Zweck wird zum Beispiel typischerweise das Neomycin-Resistenzgen (Aminoglykosid Phosphotransferase) verwendet, weil man diese Zellen mittels des Wirkstoffs G418 selektieren kann.

Nach erfolgreichem Targeting eines Allels in ES-Zellen werden die ES-Zellen in Blastozysten von Empfängermausen injiziert, wo sie mit dem Embryo mitwachsen und zum Entstehen einer chimären Maus beitragen. Diese wiederum werden mit Wildtyp-Mäusen verpaart bis eine Keimbahnzelle, die das veränderte Gen in sich trägt, zur Entstehung einer heterozygoten Maus führt. Heterozygote Mäuse werden solange miteinander verpaart, bis Mäuse entstehen, die das veränderte Allel in homozygoter Form in sich tragen.

Mäuse, bei welchen ein Gen funktionell inaktiviert wurde, nennt man Knock-Out Mäuse. Im Gegensatz dazu werden Mäuse, bei denen das Zielgen durch eine veränderte Variante ersetzt wurde, Knock-In Mäuse genannt.

Diese Knock-Out oder Knock-In Mäuse eignen sich sehr gut zur Untersuchung von biologischen Mechanismen, für Krankheitsmodelle oder für pharmakologische Fragestellungen.

## B ) Cre-loxP vermitteltes Gen-Targeting

Der Nachteil der konventionellen Gen-Targeting Methode ist, dass das eingebrachte Selektionsgen die Transkription oder die posttranslationale Modifizierung ungünstig beeinflussen kann. Dieser Nachteil kann mit dem Rekombinationssystem Cre/loxP, welches aus dem P1 Bakteriophagen stammt [75], und mit dem man den Selektionsmarker ebenfalls entfernen kann, umgangen werden. Eine loxP-Sequenz (loxP = locus of crossing over in P1) besteht aus 34 Basenpaaren und wird von der Cre-Rekombinase erkannt. Diese schneidet gezielt die Region zwischen zwei loxP Sequenzen aus.

Bei der p1g Mutante (MIF p1g) wurde das N-terminale Prolin, welches die katalytische Base des aktiven Zentrums bildet, gegen ein Glycin ausgetauscht. Die Kodierungssequenz für das N-terminale Prolin (CCT) wurde mit Glycin (GGC) ersetzt. Glycin besitzt kein nukleophiles Imin und kann somit keine

Tautomerisation katalysieren. Wie bereits weiter oben dargelegt, führt der Verlust des endständigen Prolin zu einem kompletten Verlust der enzymatischen Tautomeraseaktivität [72]. Die Wahl des Austauschpartners fiel deshalb auf Glycin, weil man aufgrund von Röntgenkristallographiedaten bereits wusste, dass durch diese Mutation die Tertiär- und Quartärstruktur von MIF nicht verändert wird [71].

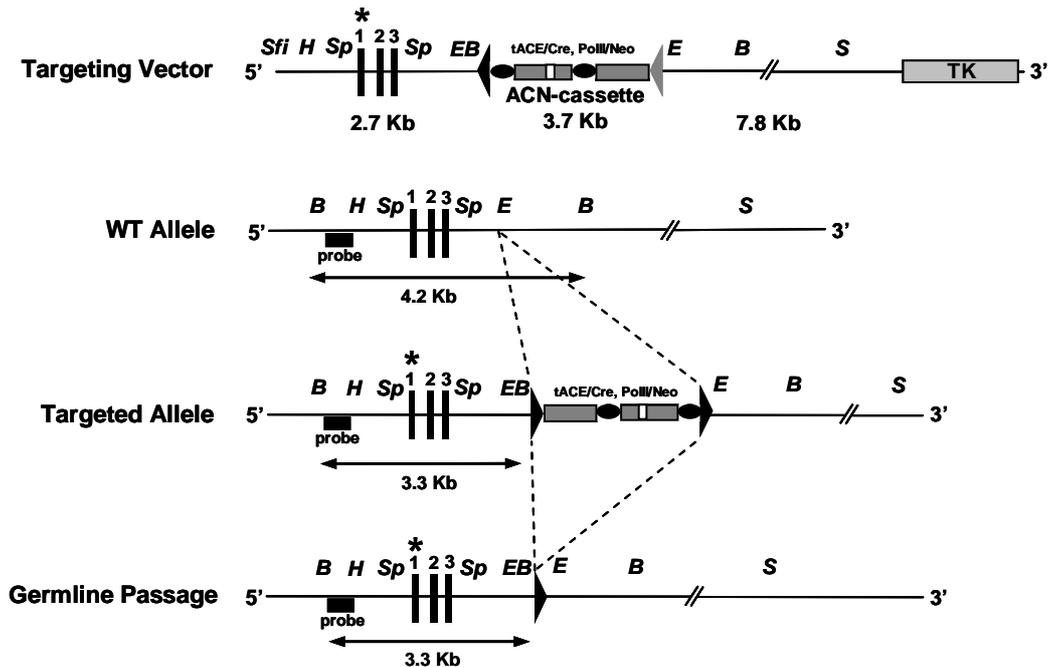


Abbildung 10: Herstellung der MIF p1g exprimierenden Maus mittels Gene Targeting. Der Targeting Vector enthält im linken Homologiearm das mutierte MIF-Gen (MIFp1g Gen), eine loxP-flankierte Selektionskassette (ACN) mit dem Gen der *Pol II*-Neomycinresistenz sowie eine *Cre* Rekombinase, die unter Kontrolle des Promotors *tACE* (testis specific promotor for angiotensin-converting enzyme) steht. WT = Wildtyp. *Sfi* = *Sfi*I, *H* = *Hind*III, *Sp* = *Spe*I, *E* = *Eco*RI, *B* = *Bam*H1, *S* = *Sal*I. Mit freundlicher Genehmigung von G. Fingerle-Rowson.

## E: Hautkrebs

Hautneoplasien sind in unserer Gesellschaft aus verschiedenen Gründen ein zunehmendes Problem. Eine Ursache dafür ist die sich zunehmend verdünnende Ozonschicht, wodurch vermehrt DNA-schädigende UV-Strahlung auf die Erdoberfläche gelangt. Dazu kommen noch veränderte Schönheitsideale und Lifestylegewohnheiten wie Sonnenbaden und der Besuch von Sonnenstudios. Das

Lebenszeitrisiko an einem malignen Melanom zu erkranken, liegt derzeit schon bei 1:80 (siehe Krebsregister Saarland beim malignen Melanom).

Es lassen sich benigne und maligne Formen des Hautkrebses unterscheiden. Analog zu anderen Neoplasien besteht das wesentliche Unterscheidungskriterium darin, dass bei den malignen Formen die Basalmembran durchbrochen wird und die Tumorzellen infiltrierend und destruierend wachsen und metastasieren können. Zu den harmlosen Formen zählt man zum Beispiel die Keratosen, die Keratoakanthome, zu den bösartigen Formen zählt man das spinözelluläre Karzinom, das Basalzellkarzinom und das maligne Melanom.

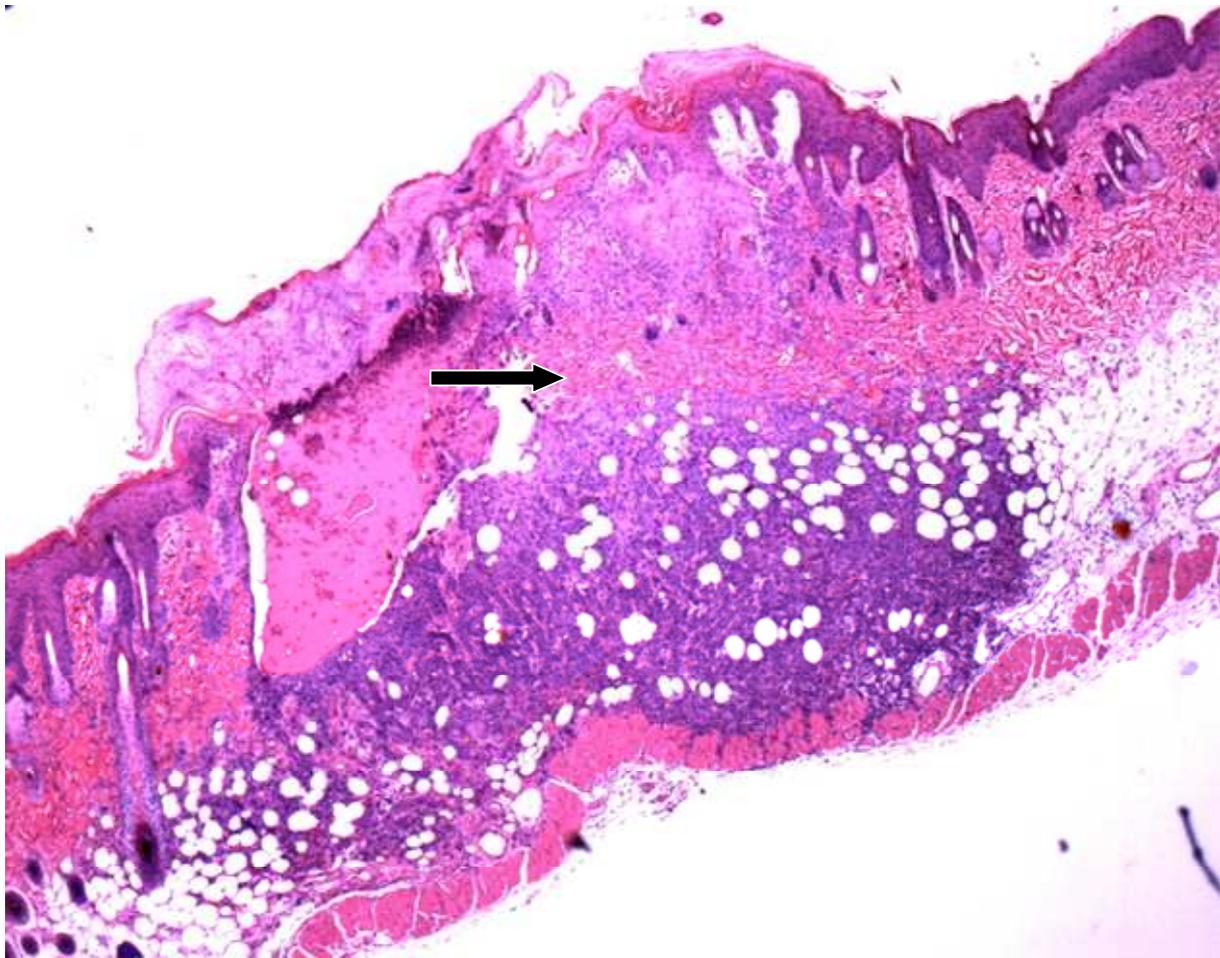


Abbildung 11: HE-Färbung eines spinözellulären Karzinoms der Epidermis des Menschen. Lokal destruierendes und die Subkutis infiltrierendes Wachstum (Pfeil).

Die Ursachen der malignen Entartung sind DNA Schäden, die zur Aufhebung der physiologischen Wachstumshemmung oder der Apoptose-Fähigkeit führen. Hierfür müssen die geschädigten Zellen, meist durch Ultraviolette Strahlung (meist UV-B), mehrere Mutationen anhäufen. Dies dauert, sofern sie nicht vorher

in Apoptose gehen, zehn bis 20 Jahre und verläuft häufig über Vorstufen, die sogenannten Präkanzerosen. Rechtzeitig behandelt sind Präkanzerosen meist heilbar. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise die Aktinische Keratose, aber auch heute selten gewordene Formen wie die Arsenkeratose, die Röntgenkeratose oder die Teerkeratose.

Neben der DNA-Schädigung durch Strahlung wie UV- oder Röntgenstrahlung ist auch ein chemisch-induzierter DNA-Schaden möglich. Neben dem erwähnten, anorganischen Arsen gibt es die Gruppe der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe.

Die mutagenen Effekte dieser aromatischen Substanzen sind seit vielen Jahren bekannt, und deren intensive Erforschung hat viel zur Erkenntnis beigetragen, dass Krebs-Zellen durch genetische Mutationen aus normalen Zellen entstehen. Klassische polyzyklische Kohlenwasserstoffe, die beim Menschen mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden, sind Steinkohleteer oder das in Zigarettenrauch enthaltene Benzo[a]pyren. Durch Anlagerung an die DNA-Stränge kommt es zu erheblicher Verzerrung der DNA-Struktur, man spricht von „bulky adducts“. Über verschiedene Mechanismen führt dies zur Fehlreplikation von DNA und somit zur Anhäufung von Mutationen. UV-Licht hingegen führt durch chemische Reaktion benachbarter Nukleotide zur Verformung der Doppelhelix, wichtigstes Korrelat: Thymin-Dimer-Bildung.

Andere elektromagnetische Strahlen, z.B. Röntgenstrahlen, führen auch direkt zu Doppelstrangbrüchen und zu fehlerhaften, kovalenten Neuverknüpfungen („cross links“). Spezifische DNA-Reparaturmechanismen existieren zwar, folgen aber statistischen Gesetzen und sind somit nicht 100% effizient.

## **II – Ziele der Arbeit**

### **A: Bedeutung von MIF in der Hauttumorgenese**

Die Zusammenschau der bisherigen Experimente zur Rolle von MIF in Zellproliferation und Tumorentstehung (siehe Einleitung, Teil B) legt die Vermutung nahe, dass MIF wachstumsstimulierende Eigenschaften hat. Betrachtet man speziell das Verhalten von Tumoren bei Mäusen, bei denen MIF ausgeschaltet (MIF ko) wurde, findet man im Allgemeinen eine verminderte Rate an Tumorentstehung. Die Arbeitshypothese lautet also, dass MIF als ein Tumorpromotor agiert. Die Haut ist für die MIF-Forschung ein besonders interessantes Organ, denn die MIF-Expression ist in Hautzellen besonders stark. Diese Arbeit soll klären, ob MIF ebenfalls die Entstehung von Hauttumoren fördert. Ferner soll die Expression von MIF in normaler Haut und Hauttumoren bestimmt werden und das subzelluläre Expressionsprofil von MIF in Keratinozyten anhand von Immunhistologie und Immunfluoreszenz untersucht werden.

### **B: Die funktionelle Rolle der Tautomerase-Aktivität von MIF bei der Hauttumorgenese**

Die katalytische Aktivität von MIF als Tautomerase ist in ihrer biologischen Bedeutung noch unklar. Mittels Punktmutation im katalytischen Zentrum (Mutation von Prolin 1 zu Glycin) wurden Mäuse (MIF p1g) hergestellt, bei denen MIF normal exprimiert ist, aber keine enzymatischen Eigenschaften als Tautomerase mehr aufweist. Durch den Vergleich von MIF wt und MIF ko Mäusen mit den tautomerase-defizienten MIF p1g Mäusen wollen wir testen, welche Rolle die Tautomeraseaktivität und Prolin 1 bei der Hauttumorgenese besitzt. Damit soll ein funktioneller Beitrag zur Aufklärung des Zusammenhangs von Struktur und Funktion bei der Rolle von MIF in der Tumorgenese geleistet werden.

### **III – Material und Methoden**

#### **A: Chemische One stage Hauttumorgenese**

MIF wt (n = 11), MIF ko (n = 14) und MIF p1g (n = 11) Mäuse auf reinem C57Bl/6 Hintergrund im Alter von 8-12 Wochen wurden unter SPF (=specific pathogen free) Bedingungen gezüchtet und gehalten. Zur Induktion von Hauttumoren wurden sie wöchentlich am Rücken rasiert, und 200 µg Benzo[a]pyren (Sigma) gelöst in 200 µl Aceton (Sigma) einmal wöchentlich über eine Gesamtdauer von 20 Wochen appliziert. Ebenfalls einmal wöchentlich wurden die Tumoren gezählt, deren Größe gemessen und die Mäuse klinisch beurteilt. Nur Tumoren mit einer Größe > 1 mm<sup>3</sup> wurden mitgezählt und evaluiert. In Woche 24, vier Wochen nach Ende der Benzo[a]pyren-Applikation und nach Erreichen eines Plateaus in der Tumorinduktion, erfolgte die Euthanasierung aller Mäuse durch zervikale Dislokation, die Tumoren wurden entnommen, gezählt, vermessen und histologisch sowie proteinbiochemisch aufgearbeitet. Diese Tierversuche wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

#### **B: Histologie**

##### **Prozedur:**

Paraffin-Einbettung und Schnittanfertigung:

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Hauttumoren in 5%-gepuffertem Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und Schnitte von 5- bis 6-µm Dicke auf poly-L-Lysine beschichteten Objektträgern aufgebracht.

Hämatoxilin-Eosin Färbung:

Anschließend wurden sie nach dem Standardprotokoll der Pathologie für die Färbung mit Hämatoxilin-Eosin (HE) zubereitet. Dies umfasst eine Entparaffinierung in Xylol und eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (siehe Punkt C: Immunhistochemie). Danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin unter Verwendung von saurem Hämalaun angefärbt.

Lichtmikroskopische Beurteilung:

Die mikroskopische Beurteilung der Benignität/Malignität erfolgte durch histologische Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Präparate durch einen Pathologen. In der HE Färbung wurden die Tumoren nach dem Kriterium Durchbruch durch die Basalmembran und Invasion in die Dermis in die Kategorien invasiv und nichtinvasiv eingeteilt.

### **C: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Die Immunhistochemie diente uns zur Bestimmung, ob und wo MIF in der Haut exprimiert wurde. Die Immunhistochemie ist eine Methode, die spezifische Proteine durch Bindung von Antikörpern nachweist. Die Primärantikörper, die das Antigen detektieren sollen, werden dabei durch Farbstoff- oder Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

#### **Material:**

Mouse/rat LSAB2 System, Peroxidase (DAKO K0672).

Schnitte fixiert in 4% PBS-gepuffertem Paraformaldehyd.

Waschlösung: 1xPBS/Tween 20 (4ggtt in 1 Liter, Lagerung bei 4°C).

Feuchtkammer: Tupperbox mit nassen (destilliertes H<sub>2</sub>O) Papiertüchern.

37mM Ammoniak-Lösung: 2.5 ml von 15M Ammoniak Hydroxid in 1 Liter H<sub>2</sub>O.

Lagerung in fest verschlossener Flasche bei Raumtemperatur bis 12 Monate.

#### **Prozedur:**

Deparaffinierung:

Dreimal 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Schutzhaube baden.

Rehydrierung bei folgenden Lösungen:

3 x Isopropanol 100% (Merck)

1 x Ethanol 96% (480 ml Ethanol und 20 ml H<sub>2</sub>O)

1 x Ethanol 90% (450 ml Ethanol und 50 ml H<sub>2</sub>O)

1 x Ethanol 80% (400 ml Ethanol und 100 ml H<sub>2</sub>O)

1 x Ethanol 70% (350 ml Ethanol und 150 ml H<sub>2</sub>O)

1 x Ethanol 50% (250 ml Ethanol und 250 ml H<sub>2</sub>O)

2 x H<sub>2</sub>O

Oxidation:

Verbliebene Flüssigkeit mit Papiertüchern vorsichtig entfernen.

Schnitte mit Hydrogen Peroxidase 5 Minuten bedecken, dann mit Wasser oder Pufferlösung abwaschen.

Proteolyse:

Inkubation mit Pronase über 5 Minuten bei 37°C.

Blockierung von unspezifischen Bindungen:

Verbliebene Flüssigkeit entfernen und die Schnitte in der Feuchtigkeitskammer lassen, mit Blocking Solution bedecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Dann mit PBS abspülen und 2 x 5 Minuten in Waschpufferlösung tauchen.

Primärer Antikörper und IgG Kontrollantikörper:

Anti-MIF III.D.9 1: 1000 verdünnen.

Kontroll-IgG HD-49 in identischer Konzentration.

Verbliebene Flüssigkeit entfernen, und in der Feuchtigkeitskammer mit den Antikörpern über Nacht bei 4° oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

Mit PBS Lösung abwaschen und 3 mal 5 Minuten in Waschlösung tauchen.

Sekundärer biotinylierter Antikörper: Link Antikörper (anti-Maus IgG-Biotin):

Verbliebene Flüssigkeit entfernen, Schnitte in Feuchtigkeitskammer mit sekundärem Antikörper über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren, mit PBS abspülen und 3 mal 5 Minuten in Waschlösung tauchen.

Konjugation mit Streptavidin-HRP:

Verbliebene Flüssigkeit entfernen, Schnitte in Feuchtigkeitskammer mit Streptavidin-HRP 10 Minuten lang inkubieren, mit PBS abspülen und 3 mal 5 Minuten in Waschlösung tauchen.

Färbelösung AEC (3-amino-9-ethylcarbazole in DMF (Lagerung bei 4°C); cave: DMF ist teratogen, spezielle Entsorgung notwendig):

Verbliebene Flüssigkeit entfernen und 5-10 Minuten mit der Färbelösung AEC inkubieren. Dann mit H<sub>2</sub>O abspülen und in einem speziellen Behältnis zur Entsorgung auffangen.

Gegenfärbung mit Mayer´s Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich):

Für 30 Sekunden bis 5 Minuten (abhängig von der gewünschten Färbestärke) mit Mayer´s Hämatoxylin-Lösung benetzen, danach mit H<sub>2</sub>O abwaschen und zehnmal in 37mM Ammoniak-Lösung tauchen, zweimal mit H<sub>2</sub>O abwaschen.

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurde statt eines biotinylierten Antikörpers ein FITC-konjugierter sekundärer Antikörper (Goat-anti-Maus-IgG-FITC, BD, Heidelberg) verwendet. Die Kerngegenfärbung wurde mit DAPI für 3-5 min durchgeführt. Die Analyse der Färbungen erfolgte an einem konfokalen Zeiss Fluoreszenzmikroskop (ConfoCor 2; Zeiss, Göttingen).

### **D: Westernblot**

Der Westernblot diente uns zur semiquantitativen Bestimmung der MIF-Expression in den Tumoren.

**Prinzip:** Es werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf ein geeignetes Trägermedium wie Nitrozellulose übertragen. Die immobilisierten Proteine auf dem Trägermedium besitzen noch ihre Immunreaktivität und können mit Hilfe von Antikörpern oder Enzymsubstraten qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

In unserem Fall verwendeten wir die diskontinuierliche Gelelektrophorese mit Polyacrylamid (SDS-Page). Dabei werden die denaturierten Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt, indem das in der Trägerlösung enthaltene, amphiphatische Detergenz SDS durch hydrophobe Anlagerung an die Proteinmoleküle seine negative Ladung nach außen ausrichtet. Hierbei werden die Proteinmoleküle der Länge nach ausgestreckt; je länger ein Protein ist, desto stärker ist die resultierende negative Ladung. Wir benutzten zuerst ein Sammelgel, welches sich im pH Wert und der SDS Konzentration vom Trenngel unterscheidet und in dem sich die Proteine in einer schmalen Bande sammeln können, bevor sie in das leicht alkalische Trenngel laufen. Im letzteren werden die Proteine entsprechend ihrer Masse aufgetrennt, indem sie durch enge Poren laufen, welche durch die Quervernetzung der Acrylamidpolymere, katalysiert durch TEMED, entstehen. Die kleinsten Proteine kommen in der gleichen Zeit am weitesten, die größten kommen am kürzesten.

Die negativ geladenen Proteine werden dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierbei folgen sie dem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die so beschichtete Membran wird nun mit dem primären Antikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist, inkubiert. Nachdem man ihm Zeit gegeben hat, das Zielprotein zu binden, werden diese Antikörper wiederum mit einem Sekundärantikörper gebunden.

Der Sekundärantikörper ist mit einer spezifischen Markierung versehen, z.B. einem Enzym, welches eine Farb- oder Lichtreaktion (Lumineszenz) katalysiert und so indirekt den Primärantikörper und damit das Zielprotein sichtbar werden lässt. Die lumineszierende Membran belichtet in der Dunkelkammer einen Film, es entsteht eine Schwärzung an den Stellen, an welchen das Protein sitzt. Die Laufweite verrät anhand des Kontrollmarkers die Proteingröße, die Stärke der Belichtung sagt semiquantitativ etwas über die Proteinmenge aus.

### **Material:**

SDS-Protein-Probenpuffer: Tris HCl, pH6,8 62,5 mM Glycerin 20%, SDS 4% ,DTT 100 mM Bromphenolblau 0,05%.

Sammelgel 5% (pro Gel): TrisHCl, pH6,8 500 µl Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 250 µl dd H<sub>2</sub>O 1250 µl, SDS 10% 18 µl, APS 10% 7,5 µl, TEMED 2,5 µl.

Trenngel 12% (pro Gel): Tris HCl, pH8,8 1000 µl, Acrylamid / Bisacrylamid 40% 1000 µl, dd H<sub>2</sub>O 2000 µl, SDS 10% 45 µl, APS 10% 15 µl, TEMED 5 µl.

SDS-Elektrophorese Laufpuffer, pH8,3: SDS 0,1% Glycin, 192 mM Trisbase, 25 mM Isopropanol.

Geltransferpuffer, pH8,3 (10x) Trisbase 25 mM, Glycin 192 mM, Methanol 15%.

Westernblot Transfer Apparatus (Bio-Rad).

Sekundärer Antikörper: Goat-anti-Rabbit Antikörper.

Western Blot Kit (Dako).

### **Prozedur:**

Gelvorbereitung:

Nach dem Aufbau der Glasscheiben und Abstandshalter in der dafür vorgesehenen Vorrichtung - hier ist vor allem auf ein dichtes Abschließen des

Glases mit dem Gummiboden der Halterung zu achten, sonst läuft das Gel aus - nach Anleitung folgt das Ansetzen und Entgasen des Laufgels, wobei die Radikalbildner und -beschleuniger APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen angesetzt werden. Auf die polymerisierende Schicht der Acrylamidlösung können einige Milliliter Isopropanol pipettiert werden, um die Oberkante zu glätten. Nach ca. 30 min ist die Polymerisation des Laufgels abgeschlossen, das Isopropanol wird verworfen. Der Spalt wird dann mit destilliertem Wasser gespült und mit Whatman Papier getrocknet.

Das Sammelgel wird ebenfalls angesetzt und entgast. Wiederum erfolgt die Zugabe von TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen, gleich darauf setzt man den Kamm, der die einzelnen Taschen formt, luftblasenfrei ein. Nach ca. 30 min ist die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen und die Glaskammer mit dem festen Gel kann in die mit SDS-Elektrophorese-Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingebracht werden. Der Kamm wird vorsichtig herausgezogen, die Taschen werden ausgespült.

Proteinelektrophorese:

Die in ihrer Proteinkonzentration mittels BCA-Eichung angeglichenen Zelllysate werden in 50 µl SDS-Puffer aufgenommen, mittels kurzem Vortex-Schütteln homogenisiert und für 5 min bei 100°C proteindenaturiert, auf Eis geschockt, die wand- und deckelständigen Tropfen kurz herunter zentrifugiert. In die Geltaschen werden 10 µl Proteinlysate mitsamt entsprechender Laufkontrolle bzw. Größenmarker pipettiert. Der Gellauf erfolgt bei 100 V für 1-2 Stunden und ist beendet, wenn die Lauffront (Bromphenolblau) das Gel gerade verlassen hat.

Proteinblotting:

Nach dem Gellauf werden die Abstandshalter entfernt, die Glasplatten vorsichtig auseinander genommen, und das Gel mit einer mit Methanol-vorbehandelten größen-identischen Nitrozellulosemembran geladen, auf beiden Seiten durch ein Watman Papier und ganz außen einen abschließenden Schwamm flankiert. Es folgt der Einbau in die entsprechende Blottinghalterung, welche in die mit Geltransferpuffer gefüllte und mit einem Kühlaggregat versehenen Kammer bei 100 Volt über ca. 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert wird. Dabei ist die Reihenfolge der einzelnen Schichten so zu wählen, dass die negativ geladenen Proteine, welche in Anodenrichtung wandern, auf die Nitrozellulosemembran treffen und nicht im Puffer verschwinden.

Antikörperinkubierung:

Nach dem Blotten wird die Membran auf der Proteinbeladenen Seite markiert und über Nacht mit 5% Milchpulver-TBST Puffer bei 4°C blockiert. Die Inkubation mit dem Antikörper passiert dann mit 1:1000 respektive 1:3000 in Blockierlösung verdünntem Primärantikörper über 60 Minuten auf dem Roller. Die Membran wird dreimal 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend in gleicher Konzentration wird der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper mit der Membran 30 Minuten auf dem Roller inkubiert und danach dreimal 10 Minuten gewaschen.

Belichtung:

Nacheinander werden nach Anleitung des Westernblot Kit (Dako) jeweils 2 ml der Lösungen 1 und 2 für jeweils eine Minute inkubiert, danach die Membran kurz mit Kleenex getrocknet und in eine Photokassette gelegt. In der Dunkelkammer folgt dann die Belichtung auf Photopapier, je nach gewünschter Intensität bei verschiedenen Zeiten.

### **E: Proteinquantifizierung mittels BCA**

Die Proteinkonzentration der Tumorlysate unterliegt natürlichen Schwankungen. Um eine valide Aussage über die MIF-Expression in unterschiedlichen Präparaten treffen zu können, musste vor Durchführung des Westernblot die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate angeglichen werden.

**Prinzip:** Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt ähnlich der Lowry-Methode nach dem Prinzip der Messung von Kupfer-Ionen ( $\text{Cu}^{1+}$ ).  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen formen im alkalischen Milieu mit Proteinen einen Komplex und werden hierdurch zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert. Im zweiten Schritt chelieren zwei Moleküle BCA (Bicinchoninic Acid) mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion, welches in einer messbaren Violett-Farbreaktion resultiert. Die Methode hat gegenüber anderen Proteinmessmethoden einige Vorteile. Die resultierende Lösung ist im alkalischen Bereich stabil, weniger störanfällig und über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen valide.

### **Material:**

BCA Protein Assay von Pierce (Rockford, Il., USA).

Spektrophotometer im Messbereich von 562 nm.

Polystyrene Cuvetten.

**Prozedur:**

Die Stocksolution BCA betrug 2 mg/ml. Die Eichung erfolgte nach folgendem Schema:

Eichgerade ( $\mu\text{g}$ )	BCA-Protein ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )
0	0	100,0
5	2,5	97,5
10	5	95,0
15	7,5	92,5
20	10	90,0
30	15	85,0

Das Endvolumen für die einzelnen Proben betrug 100  $\mu\text{l}$  bei einer Verdünnung von 1:100, also 2  $\mu\text{l}$  Proteinlysat in 98  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O. Jeweils 900  $\mu\text{l}$  Reagens werden überall hinzugegeben, gevortext und fünf Minuten im 60° Bad erwärmt, anschließend 15 Minuten abgekühlt und im Spektrophotometer gemessen. Wichtig ist, dass die Lysate durchgehend auf Eis gehalten werden.

**F: Statistik**

Um paarweise Vergleiche zwischen den drei Typen durchzuführen, wurde ein nichtparametrisches Modell nach Brunner und Langer angewandt (E. Brunner, S. Domhof u. F. Langer, Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments, Wiley Series in Probability and Statistics 2002).

Als Signifikanzniveau wurde wie üblich  $<0.05$  verwendet. Da zweiseitige Tests durchgeführt wurden, liefern signifikante Resultate keine Aussage über die Richtung der Unterschiede.

## **IV – Ergebnisse**

MIF gilt aufgrund der bisherigen Datenlage als Bindeglied zwischen Entzündung und Tumorentstehung. Der Einfluss des proinflammatorischen Zytokins MIF auf die Tumorentstehung wird durch zahlreiche Experimente gestützt. Beispielsweise spricht die verminderte Neigung von MIF Knock-Out Tieren zu Tumoren, die man in Experimenten in verschiedenen Geweben gefunden hat, für die Hypothese, dass MIF als Tumorpromotor agiert. In dieser Arbeit wollten wir die Rolle von MIF für die Entstehung von Hauttumoren prüfen. Die Haut ist ein interessantes Organ für die MIF-Forschung, da MIF in ihr sehr stark exprimiert wird. Ferner fragen wir, welche Rolle das in der Evolution konservierte Prolin 1 bei der Tumorgenese spielt. Das endständige Prolin gilt als katalytische Base, die die Tautomerase-Aktivität von MIF bedingt. Unklar ist, inwieweit die Tautomerase-Aktivität, für die bislang noch kein physiologisches Substrat gefunden wurde, in der biologischen Rolle als Tumorregulator Anteil hat. Zum Vergleich untersuchten wir MIF Wildtyp mit MIF Knock-Out und MIF p1g Mäuse. Bei letzteren wurde durch eine Punktmutation in der N-terminalen Aminosäure das als katalytische Base wirkende Prolin in ein Glycin umgewandelt, so dass die Tautomerase-Aktivität ausgeschaltet ist und keinen Einfluss mehr auf die Tumorgenese nehmen kann.

### **A: Hauttumorgenese im BaP Modell**

Ziel der Arbeit ist es, den Phänotyp der MIF-Defizienz zum ersten Mal an epithelialen Zellen wie Keratinozyten zu bestimmen. Wir entschieden uns für das Modell der chemischen Hauttumorgenese, da MIF in Keratinozyten stark exprimiert ist, diese Tumoren leicht beobachtbar sind und ein gut etabliertes System der Tumorgenese darstellen. Da die klassische Induktion mit DMBA/TPA auf dem C57Bl/6 Hintergrund aufgrund der Tumoresistenz des C57Bl/6 Stammes zu fast keinen Hauttumoren führt, entschieden wir uns, das in Tabakrauch und Autoabgasen vorkommende Karzinogen Benzo[a]pyren zu verwenden. Dieser aromatische Kohlenwasserstoff (nach der International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC korrekt Benzo[*def*]chrysen) ist selbst nicht toxisch, wird aber im Körper in eine Epoxidform umgewandelt, welche an DNA bindet (genauer Guanin), so zur Strukturbeeinträchtigung der DNA führen und dadurch Mutationen hervorrufen kann.

Alters- und geschlechtsgematchte C57Bl/6 Mäuse der Genotypen MIF wt, MIF ko und MIF p1g (n = 11, 14 und 11) wurden über einen Zeitraum von 22 Wochen einmal pro Woche topisch auf der Rückenhaut mit Benz[a]pyrene in einer Dosis von 200 µg behandelt und die Entwicklung von Hauttumoren beobachtet. Nach einer Induktionszeit von 14 Wochen lag die Inzidenz bei den MIF ko Mäusen bei 35%, bei den MIFp1g Mäusen sogar 45% und bei den MIF wt Mäusen bei 0%. Nach 17 Wochen erreichte die Inzidenz bei den MIF p1g Mäusen 100%, die Inzidenz der MIF ko und der MIF wt Mäuse lag bei 78% bzw. 90%.

Hinsichtlich der Anzahl an Tumoren unterscheidet sich der Wildtyp signifikant vom Knock-Out-Typ (p = 0.02048). Im Vergleich zur MIF p1g Mutante fällt der Unterschied ebenfalls signifikant aus (p = 0.00000), während der Vergleich zwischen dem Knock-Out-Typ und der Mutante keinen signifikanten Unterschied liefert (p = 0.30270).

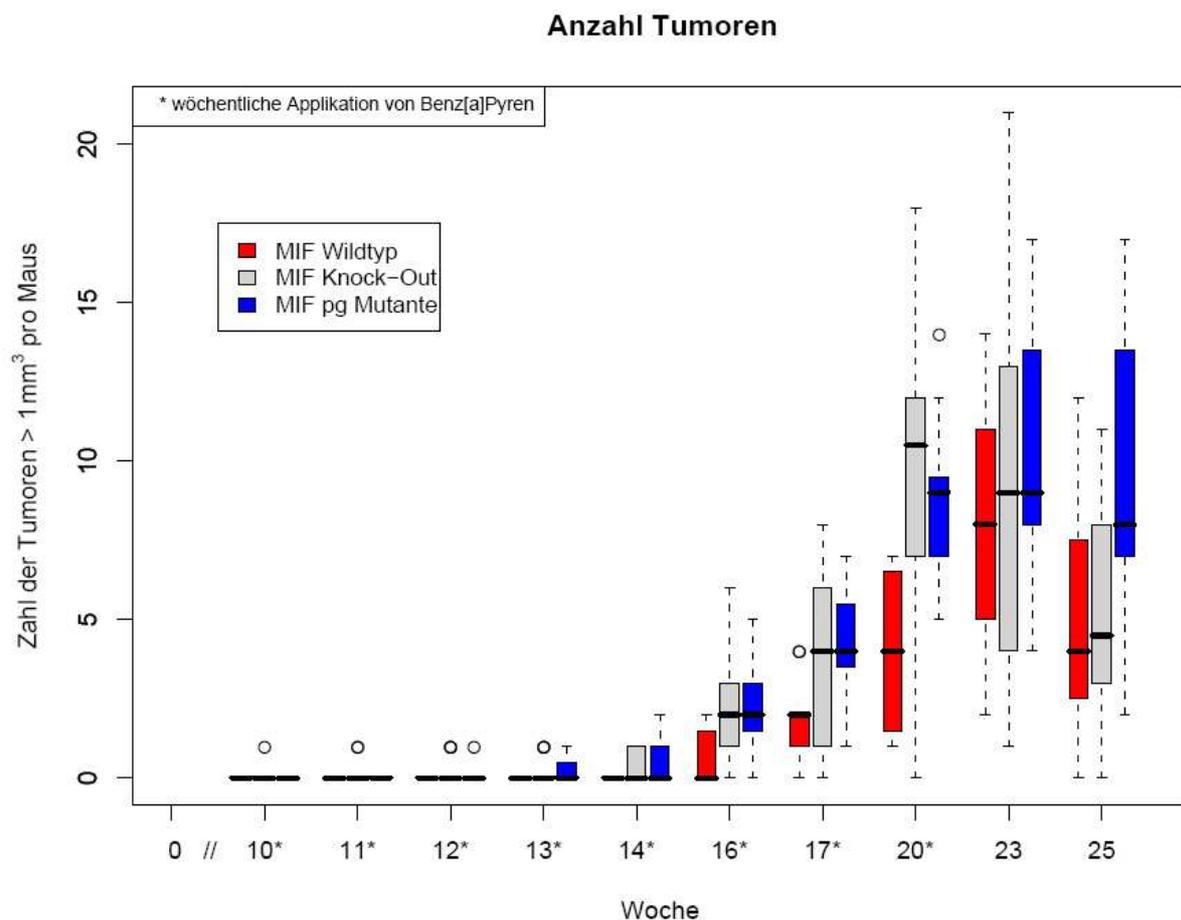


Abbildung 12: Gesamttumorzahl nach B[a]P Applikation. MIF Wildtyp (n=11), MIF Knock-Out (n=14) und MIF p1g Mäuse (n=11) wurden einmal pro Woche mit 200 µg Benzo[a]pyren behandelt über 20 Wochen. In Woche 10 trat bei MIF ko Mäusen, in Woche 12 bei MIF p1g Mäusen und in Woche 16 bei MIF wt Mäusen erstmals ein Tumor auf. MIF wt unterscheidet sich signifikant von MIF

ko ( $p = 0.020$ ) und MIF p1g ( $p < 0.000001$ ), während MIF ko und MIF p1g nicht signifikant unterschiedlich sind ( $p = 0.30$ ).

Hinsichtlich der Gesamtgröße der Tumoren fällt der Vergleich zwischen Wildtyp und Knock-Out nicht signifikant aus ( $p = 0.35057$ ). Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und p1g Mutante ( $p = 0.00803$ ), währenddessen sich Knock-Out-Typ und p1g Mutante nicht signifikant voneinander unterscheiden ( $p = 0.20744$ ).

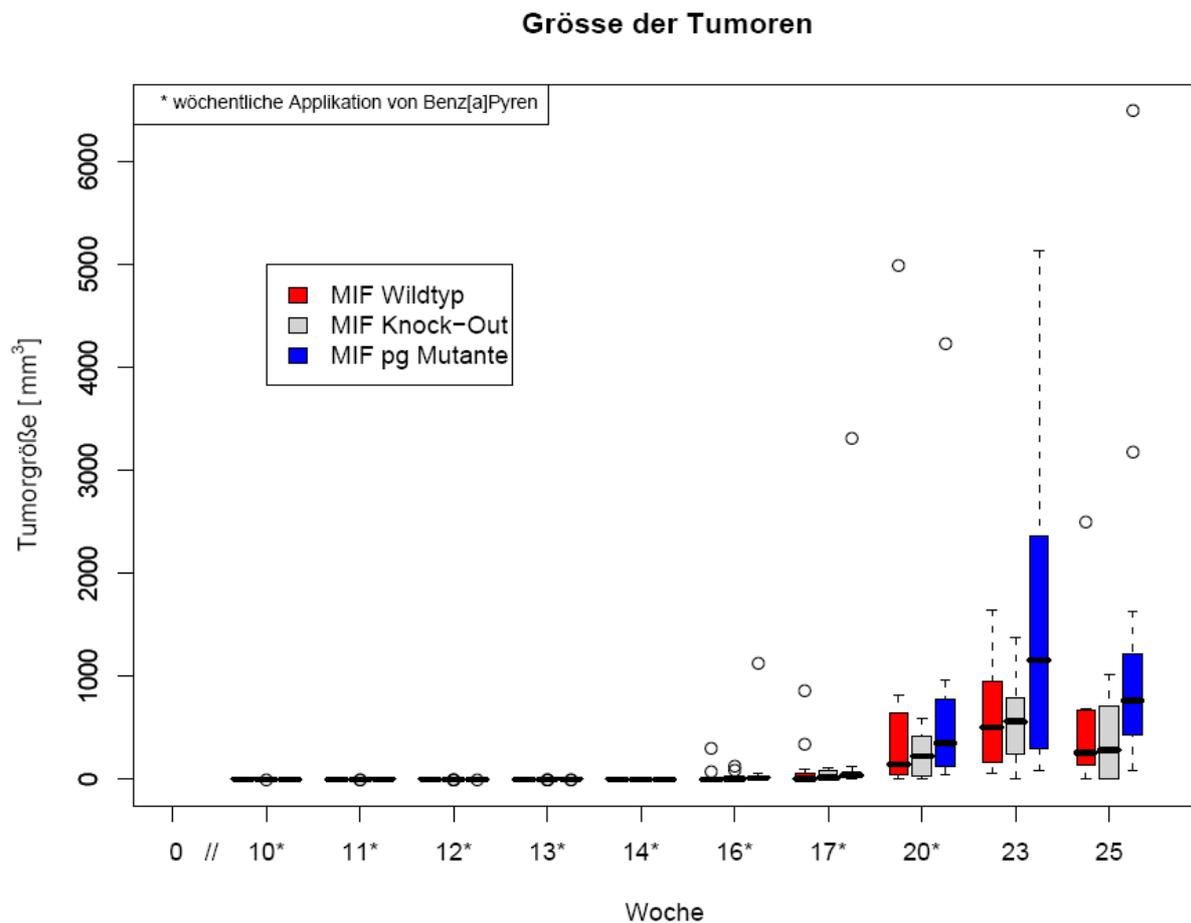


Abbildung 13: Größe in  $\text{mm}^3$  der Tumoren. MIF Wildtyp ( $n=11$ ), MIF Knock-Out ( $n=14$ ) und MIF p1g Mutanten Mäuse ( $n=11$ ) wurden einmal pro Woche mit  $200 \mu\text{g}$  Benzo[a]pyren behandelt über 20 Wochen. MIF wt unterscheidet sich nicht signifikant von MIF ko ( $p = 0.35057$ ) und signifikant von MIF p1g ( $p = 0.00803$ ). MIF ko und MIF p1g unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0.20744$ ).

## B: Tumorhistologie

Die durch Benzo[ $\alpha$ ]pyren induzierten Hauttumoren zeigten das volle Spektrum der möglichen Hauttumoren mit unterschiedlichen Malignitätsgraden. Die histologische Tumorklassifikation wurde nach WHO-Kriterien von einem „verblindeten“ Pathologen durchgeführt. Grundsätzlich konnten sie makroskopisch in benigne Tumoren (z.B. Akanthome) und maligne Tumoren (wie z. B. das spinözelluläre Karzinom) unterteilt werden. Ferner wurden die Tumoren nach dem Kriterium Durchbruch durch die Basalmembran und Invasion in die Dermis in die Kategorien invasiv und nichtinvasiv eingeteilt.

Beispielhaft seien hier HE-gefärbte Schnitte von invasiven und nicht-invasiven Hauttumoren gezeigt:



Abbildung 14: Spektrum der Benzo[ $\alpha$ ]pyren-induzierten Hauttumoren

A) Keratose, B) Papillom und C) invasiv wachsendes spinözelluläres Karzinom (HE Färbung, 40fache Vergrößerung).

Es zeigte sich, dass die Zunahme der Tumoren in der MIF ko Gruppe nicht durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der benignen oder der malignen Seite stattfand, sondern das Verhältnis im Vergleich zu MIF wt gewahrt wurde. (Siehe Tabelle I).

Tabelle I: Histopathologische Befundungsergebnisse aus dem Benz[ $\alpha$ ]pyren-Hautkarzinogenese Experiment:

Tumor Typ	MIF wt	MIF ko	MIF p1g
Benigne	53 (70%)	95 (72%)	87 (75%)
Maligne	22 (30%)	36 (28%)	29 (25%)
Ratio ben/mal	2,4	2,6	3

Als nächstes untersuchten wir die gewebliche Expression von MIF in Hautschnitten aus unbehandelter und aus BaP-behandelter Haut wie auch aus Tumormaterial. Wie die Abbildung 16 zeigt, war MIF in allen Schichten der Epidermis exprimiert, insbesondere das Stratum basale sowie das Stratum corneum zeigten deutliche und kräftige Expression von MIF Protein. Im Vergleich mit der MIF Expression in dermalen Fibroblasten war die MIF Expression in Keratinozyten wesentlich intensiver. Auffällig war auch, dass MIF in manchen Zellen eher nukleär exprimiert ist. In Abbildung 17 ist die nukleäre Expression verdeutlicht, zum Vergleich auch ein Schnitt humaner Haut sowie der nukleäre Nachweis von MIF in einer humanen Zelllinie (HACAT).

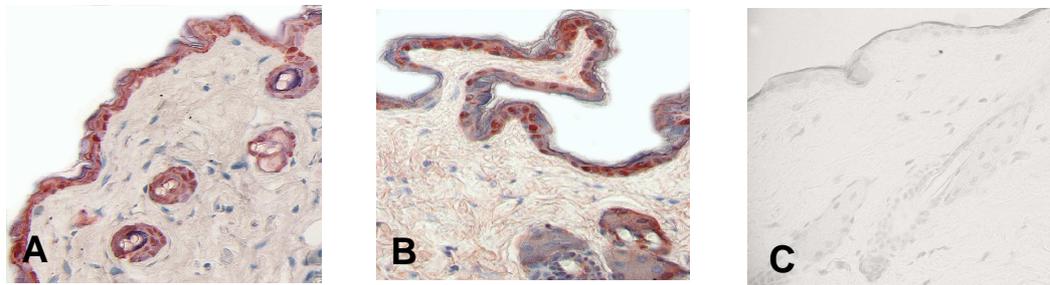


Abbildung 15: MIF Expression in der Immunhistochemie in A) MIF wt Haut, B) MIF p1g Haut und C) MIF ko Haut (400-fache Vergrößerung). Die Expression von MIF ist in den Keratinozyten wesentlich intensiver als in den Zellen der Subcutis. Die Quantität der MIF-Expression ist in MIF wt und MIF p1g vergleichbar. Die Kontrolle (MIF ko) ist negativ.

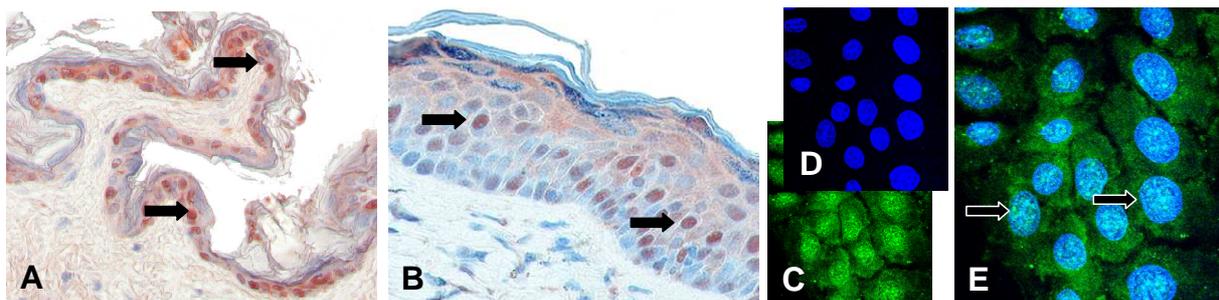


Abbildung 16: Nukleäre MIF Expression in der Immunhistochemie und -fluoreszenz. A) Murine Epidermis und B) humane Epidermis. Die Pfeile verweisen auf Keratinozyten mit prominenter nukleärer Expression von MIF. C-E: HACAT-Zelllinie. C) Immunfluoreszenz für MIF. D) Kernfärbung durch DAPI. E) Konfokale Immunfluoreszenz für MIF, Kerngegenfärbung mit DAPI.

### C: Quantifizierung von MIF durch Westernblot

Als nächstes stellten wir uns die Frage, ob die MIF Expression bei Hauttumoren gegenüber normaler Haut verändert ist und bestimmten die Proteinexpression von MIF in Lysaten von muriner normaler Haut im Vergleich mit Lysaten von benignen und malignen Tumoren aus dem Benzo[*a*]pyren-Karzinogenese-Experiment. Ferner hatten wir auch Gelegenheit, eine Lymphknotenmetastase eines malignen Hauttumors untersuchen zu können.

Insgesamt zeigte sich, dass die MIF-Expression großen Schwankungen in den einzelnen Proben unterliegt. Ein klarer Zusammenhang zwischen Grad der Malignität und der MIF-Expression lässt sich anhand dieses Materials nicht treffen.

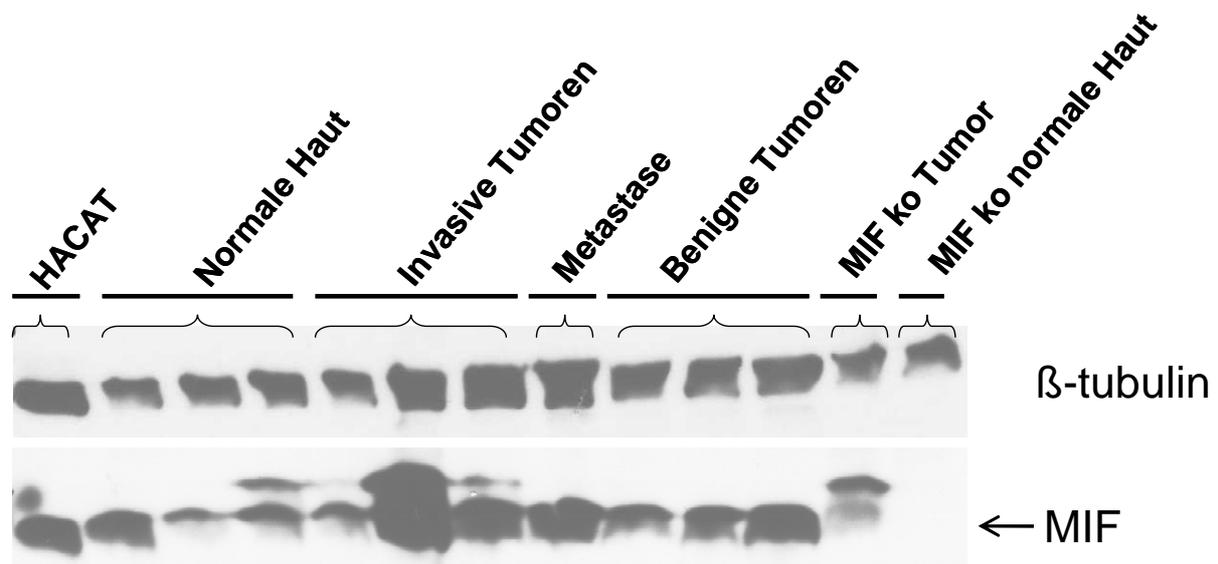


Abbildung 17: MIF Expression mittels Westernblot an muriner normaler Haut und nicht-invasiven sowie invasiven Hauttumoren. Beta-Tubulin als Ladekontrolle. Die gelegentlich auftretende zweite Bande oberhalb der MIF-Bande lässt sich anhand der MIF ko Kontrolle leicht als unspezifische Bande identifizieren. Kontrolle = Lysat der Zelllinie HACAT.

## **V – Diskussion**

### **A: Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde mit genetisch modifizierten Mäusen in einem chemischen Karzinogenese-Modell gezeigt, dass MIF als ein Tumorsuppressor in der Haut agiert. Sowohl die Zahl der Tumoren pro Maus als auch die Tumorzinzidenz sind bei Abwesenheit von MIF signifikant erhöht.

Der Phänotyp der MIF p1g Mäuse liegt dem MIF ko Phänotyp sehr nahe. Dies bedeutet, dass das N-terminale Prolin eine wichtige Rolle für die biologische Funktion von MIF, zum Beispiel für Protein-Protein-Interaktionen mit einem Rezeptor, spielen könnte. Nicht auszuschließen ist ferner die Möglichkeit, dass die enzymatische Aktivität von MIF als Tautomerase ebenfalls eine biologische Rolle spielen könnte.

### **B: MIF – ein neuer Tumorsuppressor bei der Hautkarzinogenese**

Die in dieser Arbeit gefundene verstärkte Bildung von Hauttumoren bei MIF-defizienten Mäusen ist ein überraschendes Ergebnis, denn bisher wurde MIF in fast allen untersuchten Modellen (Fibrosarkome, Urothelkarzinome, Lymphome [15, 76, 77]) als Tumorpromotor beschrieben. Dies zeigen beispielsweise die Daten von Fingerle-Rowson et al. mit Mausfibroblasten [15]. Dabei wurden Fibrosarkome durch subkutane Benz[a]pyren Injektion induziert. Bei den MIF Knock-Out Tieren entstanden weniger und kleinere Tumoren als bei den Wildtyp Tieren. Auch die Daten von Talos et al. stützen die These von MIF als Tumorpromotor im mesenchymalen Gewebe [76]. Dort wurde die Entwicklung von B-Zell-Lymphomen im E $\mu$ -Myc Mausmodell bei MIF-Defizienz gehemmt.

Die Untersuchung von Kolon-Karzinomen in einem murinen Polyposis coli Modell ((Apc)Min/+ Maus) beispielsweise zeigte eine vermehrte MIF Expression in den Adenomen sowie eine Stimulierbarkeit des Tumorwachstums durch exogenes MIF [78]. Ferner entwickelten die MIF ko Mäuse weniger und kleinere Adenome.

Diese Effekte sind aber noch nicht gut erklärt und könnten auch mit Unterschieden in der Angiogenese erklärt werden. Auch in einem Mausmodell zu

Urothelkarzinomen [77] fanden sich bei MIF ko Mäusen ein geringerer Invasionsgrad einhergehend mit einer gehemmten Angiogenese, so dass MIF in diesen beiden Geweben ebenfalls als Tumorpromotor agiert.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang ebenfalls unsere Beobachtung, dass MIF in normalen wie auch transformierten Keratinozyten nukleär lokalisiert sein kann. MIF wird in der Literatur als ein sezernierbarer Mediator beschrieben, der vorwiegend im zytosolischen Kompartiment vorliegt. In einigen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Glioblastom wird berichtet, dass die Tumorzellen eine nukleäre Expression aufweisen [79]. Nukleäre Expression ist für ein Zytokin/Chemokin ungewöhnlich und deutet darauf hin, dass MIF auch eine intrazelluläre Funktion besitzt. Nukleäres MIF könnte die Funktion von Transkriptionsfaktoren oder nukleären Regulatoren der Zellzyklusmaschinerie wie zum Beispiel den Zyklinen, CDKs und CDKIs beeinflussen.

Wichtig für die Funktion von MIF scheint sein Einfluss auf die Funktion des Tumorsuppressor p53 zu sein. MIF-Defizienz ist in vitro und in vivo mit einer vermehrten Aktivität von p53 assoziiert [15, 63]. Mögliche Interaktionen von MIF mit p53 wurden bisher auf biochemischem Wege aufgezeigt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass MIF die p53-vermittelte Apoptose und Genaktivierung hemmen kann [63]. Embryonische Mausfibroblasten von MIF Knock-Out Tieren waren resistenter gegenüber ras-vermittelter Transformation [15]. P21, ein wichtiges Effektorprotein von p53, wird dementsprechend vermehrt in MIF ko Zellen exprimiert und diese Effekte wurden in p53 defizienten Mäusen aufgehoben, was die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion belegt.

Die Interaktion von MIF und p53 könnte auch auf indirektem Wege über Jab-1 erfolgen, da Jab-1 ein wichtiger Modulator von p53 ist. Der Mechanismus dieser Interaktion beinhaltet die Jab-1 vermittelte Dislokation von p53 vom Zellkern in das Zytosol und eine posttranslationale Modifikation von p53 [64]. In Jab-1 defizienten Mäusen sind die Konzentrationen von p53 und p27 höher [44], was ebenfalls ein indirekter Hinweis für die Jab-1 vermittelte Degradation von p53 ist.

Ein anderer Mechanismus ist die Aktivität von Jab-1 im Jab-1/CSN5 Komplex, der als Koaktivator von AP-1, einem gut untersuchten Transkriptionsfaktor der Fos und Jun-Proteinfamilie [25] fungiert. AP-1 reguliert den Zellzyklus durch die direkte Bindung an AP-1 DNA-Bindungs-Domänen und die damit einhergehende

Beeinflussung der Transkription. AP-1 wird durch DNA-schädigende Einflüsse wie UV-Strahlung oder regulatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  induziert und aktiviert die Zellproliferation. Die beschriebene Hemmung von Jab-1/CSN5 durch MIF könnte eine mögliche Erklärung für die tumorsuppressive Wirkung von MIF in Keratinozyten sein.

Ein anderer Mechanismus könnte über den cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) p27 [29] vermittelt werden, welches ein wichtiger Bestandteil des G1 Checkpoints im Zellzyklus ist. P27 liegt im Zytosol in inaktiver Form vor und wird nach Aktivierung in den Nukleus transportiert, wo es die Funktion der Zyklin/CDK-Komplexe inhibiert und die Zelle zum Wachstumsstopp zwingt.

Jab-1/CSN5 besitzt die Eigenschaft nukleäres p27 aus dem Nukleus zu exportieren und zu degradieren. MIF antagonisierte in mehreren Experimenten die Wirkung von Jab-1, indem es die nukleäre Konzentration von p27 anhob und die Zahl der Zellen, die in Zellarrest gingen, erhöhte.

Am wahrscheinlichsten, so zeigen neueste Daten [80], beeinflusst Jab-1 die Zellproliferation indirekt über das Proteasom. Das Proteasom ist für die Degradation von Proteinen im Zytosol und Nukleus zuständig. Hierzu zählen neben Enzymen auch Transkriptionsfaktoren und die zellzyklussteuernden Zykline [30] sowie deren Inhibitoren, die CDKs [31]. Das Proteasom erkennt nur ubiquitylierte Proteine. Welche Proteine mit Ubiquitin markiert werden, bestimmen zwei andere, als Ubiquitin-Ligasen wirkende Proteinkomplexe, der APC/C-Komplex und der SCF-Komplex. Diesem Abbau unterliegen nicht nur die zahlreichen Zykline und CDKs sondern auch p27 [34]. Somit ist es verständlich, dass der SCF-Komplex auch als starke Einflussgröße in der Tumorentwicklung beschrieben wurde [81].

Die Fähigkeit von MIF über Jab-1/CSN5 die Aktivität des SCF-Komplexes mitzusteuern, hat Auswirkungen auf die proteasomale Degradation. Dies konnte vor allem gezeigt werden, wenn der Transkriptionsfaktor p53 genetisch ausgeschaltet war. In p53 ko Zellen erbrachte die Deletion von MIF eine Steigerung der Expression von CDC25A und CDK2, was auf eine verminderte proteasomale Aktivität zurückzuführen war [82]. Insgesamt ergibt sich ein Bild, bei dem die Kontrolle von Jab-1/CSN5 durch MIF eine wichtige Rolle für die optimale und bedarfsgerechte Aktivität des SCF-Komplexes spielt.

Die Frage, warum MIF in der Hauttumorgenese als Tumorsuppressor wirkt und in anderen Geweben als klarer Tumorpromotor, lässt sich derzeit noch nicht abschließend klären. Da das Proteasom viele Regulatoren gleichzeitig steuert, von denen manche pro-proliferativ, andere wiederum anti-proliferativ wirken, ist es nicht verwunderlich, dass das Nettoergebnis des Einflusses von MIF von gewebstypischen Faktoren abhängig sein kann.

Sind unsere Ergebnisse im Mausmodell auf den Menschen übertragbar? Die hohe evolutionäre Konservierung der beteiligten Moleküle wie MIF, p53, p27 und andere lassen durchaus erwarten, dass bei Mensch und Maus die gleichen Wirkmechanismen aktiv sind. Diese Meinung wird noch durch unsere Befunde unterstützt, dass MIF in der Maus wie im Menschen in Keratinozyten nukleär exprimiert wird.

Hautkarzinogenese-Experimente verbieten sich aus ethischen Gründen beim Menschen, daher wird man die Evidenz beim Menschen eher aus assoziativen Studien herleiten müssen.

Das übergeordnete Ziel sollte in der onkologischen Forschung immer die Erarbeitung neuer diagnostischer und therapeutischer Mittel zur besseren therapeutischen Stratifizierung und Behandlung von malignen Erkrankungen sein, damit letztendlich ein Benefit für Patienten entsteht. MIF birgt aufgrund seiner interessanten Wirkmechanismen, die teilweise p53 abhängig sind, Potential für zukünftige antineoplastische Therapien in sich. Eine genauere Erforschung seines exakten Wirkmechanismus ist allerdings erforderlich, um die Indikationen für therapeutische MIF-Hemmung oder -Stimulierung genauer zu definieren.

### **C: Die P1G Mutante in der Hauttumorgenese**

Das zweite Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die loss of enzymatic function-Mutante MIF p1g in der Hauttumorgenese einen Phänotyp aufweist, der ähnlich, nicht jedoch identisch mit dem Phänotyp der MIF ko Maus ist. Dies impliziert, dass der Verlust des enzymatischen Potentials nicht identisch mit dem kompletten Funktionsverlust von MIF ist.

Das enzymatische Zentrum von MIF beinhaltet als katalytische Base die N-terminale Aminosäure Prolin 1. Das initiierende Methionin wird beim Prozessieren des Proteins entfernt, so dass Prolin zur ersten Aminosäure im reifen Protein wird. Die Datenlage zur funktionellen Relevanz des N-terminalen Prolins ist nicht immer konsistent. In vitro Experimente, in denen Prolin 1 mit einer anderen Aminosäure ausgetauscht wurde, wiesen einen konsekutiven Verlust der Tautomerase Aktivität nach [72]. Allerdings blieben dabei die inflammatorischen Eigenschaften von MIF meistens [72, 83], aber nicht immer [71], erhalten.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die widersprüchlichen Ergebnisse ist auch, dass die Prolin 1 enthaltende katalytische Tasche von MIF ihre Wirkung gar nicht über die Tautomerase-Aktivität entfaltet, sondern eine strukturelle Rolle für die Protein-Protein-Bindung der Bindungspartner Jab-1/CSN5 und CD74 innehat. Dies wurde schon von einigen Autoren gemutmaßt [71, 84], die unter anderem eine verringerte Enzymaktivität von MIF p1g nachgewiesen haben.

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte reichen letztendlich nicht zur endgültigen Klärung der Frage nach der funktionellen Bedeutung der Tautomeraseaktivität von MIF aus. Weitere Experimente sind notwendig, um der genauen Bedeutung von Prolin 1 näher zu kommen. Dass der Phänotyp der MIF p1g Mutante sehr ähnlich dem Phänotyp der MIF ko in der Hauttumorgenese ist, könnte bereits eine wichtige Definition der Zielstruktur bei MIF für therapeutische Inhibition darstellen. Die Erfolge mit Imatinib beispielsweise in der CML Behandlung haben enorme Anstrengungen in der Entwicklung von kleinen Molekülen nach sich gezogen, die spezifische biologische Funktionen hemmen können. Erste Nachfolgemedikamente sind bereits auf dem Markt, Dutzende sind in Entwicklung. Gerade Tyrosinkinasen bieten sich als therapeutische Ziele an, aber auch MIF, welches über Jab-1/CSN5 indirekt auf das Proteasom Einfluss nimmt, ist weiter erforschungswürdig. Sollte sich die Prolin 1 Bindungstasche in Zukunft als funktioneller Angriffspunkt etablieren, wäre dies sicherlich eine lohnende Basis für die Entwicklung neuer antineoplastischer Therapiestrategien.

## Literaturverzeichnis

1. David, J.R., *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. 56(1): p. 72-7.
2. Bloom, B.R. and B. Bennett, *Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity*. Science, 1966. 153(731): p. 80-2.
3. Bernhagen, J., et al., *MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia*. Nature, 1993. 365(6448): p. 756-9.
4. Leech, M., et al., *Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. 41(5): p. 910-7.
5. Mikulowska, A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice*. J Immunol, 1997. 158(11): p. 5514-7.
6. Santos, L., et al., *Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids*. Clin Exp Immunol, 2001. 123(2): p. 309-14.
7. Bernhagen, J., et al., *An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction*. J Exp Med, 1996. 183(1): p. 277-82.
8. de Jong, Y.P., et al., *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nat Immunol, 2001. 2(11): p. 1061-6.
9. Calandra, T., et al., *Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor*. Nat Med, 2000. 6(2): p. 164-70.
10. Lanahan, A., et al., *Growth factor-induced delayed early response genes*. Mol Cell Biol, 1992. 12(9): p. 3919-29.
11. Meyer-Siegler, K.L., M.A. Bellino, and M. Tannenbaum, *Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma*. Cancer, 2002. 94(5): p. 1449-56.
12. Takahashi, N., et al., *Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth*. Mol Med, 1998. 4(11): p. 707-14.
13. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. 285(21): p. 1182-6.
14. Chesney, J., *an essential role for MIF in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma*. Mol Med, 1998(5): p. 179-189.
15. Fingerle-Rowson, G., et al., *The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(16): p. 9354-9.
16. Zhang, X.P., et al., *Cell fate decision mediated by p53 pulses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(30): p. 12245-12250.
17. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-10.
18. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. 88(3): p. 323-31.
19. Tsianos, E.V., *Risk of cancer in inflammatory bowel disease (IBD)*. Eur J Intern Med, 2000. 11(2): p. 75-78.
20. Yang, L. and Z. Pei, *Bacteria, inflammation, and colon cancer*. World J Gastroenterol, 2006. 12(42): p. 6741-6.
21. Peter, S. and C. Beglinger, *Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship*. Digestion, 2007. 75(1): p. 25-35.

22. Charlesworth, P.J. and A.L. Harris, *Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies*. Nat Clin Pract Urol, 2006. 3(3): p. 157-69.
23. Kleemann, R., et al., *Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1*. Nature, 2000. 408(6809): p. 211-6.
24. Sun, H.W., et al., *Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(11): p. 5191-6.
25. Almendral, J.M., et al., *Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1988. 8(5): p. 2140-8.
26. Lin, A., et al., *Control of AP-1 activity by signal transduction cascades*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1993. 28: p. 255-60.
27. Claret, F.X., et al., *A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors*. Nature, 1996. 383(6599): p. 453-7.
28. Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu, *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus*. J Biol Chem, 1997. 272(25): p. 16010-7.
29. Tomoda, K., Y. Kubota, and J. Kato, *Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1*. Nature, 1999. 398(6723): p. 160-5.
30. van Drogen, F., et al., *Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms*. Mol Cell, 2006. 23(1): p. 37-48.
31. Yam, C.H., et al., *Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2*. Mol Cell Biol, 1999. 19(1): p. 635-45.
32. Wei, W., et al., *The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase*. Cancer Cell, 2005. 8(1): p. 25-33.
33. Welcker, M., et al., *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(24): p. 9085-90.
34. Tsvetkov, L.M., et al., *p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27*. Curr Biol, 1999. 9(12): p. 661-4.
35. Wu, G., et al., *SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation*. Mol Cell Biol, 2001. 21(21): p. 7403-15.
36. Cardozo, T. and M. Pagano, *The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(9): p. 739-51.
37. Acquaviva, C. and J. Pines, *The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C*. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 12): p. 2401-4.
38. Nakayama, K.I. and K. Nakayama, *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(5): p. 369-81.
39. Bornstein, G., D. Ganoth, and A. Hershko, *Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(31): p. 11515-20.
40. Lyapina, S., et al., *Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome*. Science, 2001. 292(5520): p. 1382-5.
41. Cope, G.A., et al., *Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull*. Science, 2002. 298(5593): p. 608-11.
42. Wu, J.T., et al., *Neddylation and deneddylation regulate Cull1 and Cul3 protein accumulation*. Nat Cell Biol, 2005. 7(10): p. 1014-20.
43. Cope, G.A. and R.J. Deshaies, *Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels*. BMC Biochem, 2006. 7: p. 1.

44. Tomoda, K., et al., *Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice*. J Biol Chem, 2004. 279(41): p. 43013-8.
45. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. 197(11): p. 1467-76.
46. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 259-93.
47. Wraight, C.J., et al., *Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface*. J Biol Chem, 1990. 265(10): p. 5787-92.
48. Shachar, I. and R.A. Flavell, *Requirement for invariant chain in B cell maturation and function*. Science, 1996. 274(5284): p. 106-8.
49. Gore, Y., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex*. J Biol Chem, 2008. 283(5): p. 2784-92.
50. Naujokas, M.F., et al., *The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44*. Cell, 1993. 74(2): p. 257-68.
51. Denhardt, D.T., *Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling*. Biochem J, 1996. 318 ( Pt 3): p. 729-47.
52. Mitchell, R.A., et al., *Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action*. J Biol Chem, 1999. 274(25): p. 18100-6.
53. Heasley, L.E., et al., *Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer*. J Biol Chem, 1997. 272(23): p. 14501-4.
54. Donnelly, S.C. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease*. Mol Med Today, 1997. 3(11): p. 502-7.
55. Calandra, T., et al., *MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production*. Nature, 1995. 377(6544): p. 68-71.
56. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 141-79.
57. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. 87(1): p. 13-20.
58. Verma, I.M., et al., *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev, 1995. 9(22): p. 2723-35.
59. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis*. Science, 1995. 270(5234): p. 286-90.
60. Daun, J.M. and J.G. Cannon, *Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. 279(3): p. R1043-9.
61. Kastan, M.B., et al., *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*. Cancer Res, 1991. 51(23 Pt 1): p. 6304-11.
62. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-6.
63. Hudson, J.D., et al., *A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity*. J Exp Med, 1999. 190(10): p. 1375-82.
64. Lee, E.W., W. Oh, and J. Song, *Jab1 as a mediator of nuclear export and cytoplasmic degradation of p53*. Mol Cells, 2006. 22(2): p. 133-40.

65. Pastrana, D.V., et al., *Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor*. *Infect Immun*, 1998. 66(12): p. 5955-63.
66. Jaworski, D.C., et al., *Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, Amblyomma americanum*. *Insect Mol Biol*, 2001. 10(4): p. 323-31.
67. Swope, M.D. and E. Lolis, *Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme?* *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. 139: p. 1-32.
68. Zang, X., et al., *Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure*. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 44261-7.
69. Rosengren, E., et al., *The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase*. *FEBS Lett*, 1997. 417(1): p. 85-8.
70. Subramanya, H.S., et al., *Enzymatic ketonization of 2-hydroxybutyrate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases*. *Biochemistry*, 1996. 35(3): p. 792-802.
71. Swope, M., et al., *Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor*. *Embo J*, 1998. 17(13): p. 3534-41.
72. Bendrat, K., et al., *Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor*. *Biochemistry*, 1997. 36(49): p. 15356-62.
73. Fingerle-Rowson, G., et al., *A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation*. *Mol Cell Biol*, 2009. 29(7): p. 1922-32.
74. Folger, K.R., et al., *Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules*. *Mol Cell Biol*, 1982. 2(11): p. 1372-87.
75. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(14): p. 5166-70.
76. Talos, F., et al., *MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis*. *Cell Death Differ*, 2005. 12(10): p. 1319-28.
77. Taylor, J.A., 3rd, et al., *Null mutation for macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with less aggressive bladder cancer in mice*. *BMC Cancer*, 2007. 7: p. 135.
78. Wilson, J.M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis*. *Gastroenterology*, 2005. 129(5): p. 1485-503.
79. Markert, J.M., et al., *Differential gene expression profiling in human brain tumors*. *Physiol Genomics*, 2001. 5(1): p. 21-33.
80. Nemajerova, A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle*. *Cell Cycle*, 2007. 6(9): p. 1030-4.
81. Yamasaki, L. and M. Pagano, *Cell cycle, proteolysis and cancer*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(6): p. 623-8.
82. Nemajerova, A., et al., *Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice*. *Embo J*, 2007. 26(4): p. 987-97.
83. Stamps, S.L., M.C. Fitzgerald, and C.P. Whitman, *Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor*. *Biochemistry*, 1998. 37(28): p. 10195-202.

- 84. Senter, P.D., et al., *Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(1): p. 144-9.**

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Jahns  
Vornamen: Maximilian Swen Mosche Josef  
Geburtsdatum/-ort: 02.03.1979 in München  
Familienstand: verheiratet, ein Kind

## Beruflicher Werdegang als Assistenzarzt

---

03/2006 – 01/2007 Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Leitung Prof. Trümper, Universitäts-Klinikum Göttingen

- 03/2006 – 06/2006 Allgemein hämatologisch-onkologische Station
- 07/2006 – 01/2007 Rotation in die Kardiologie/Pneumologie, kardiologische IMC und allgemein-kardiologische Station

02/2007 – 09/2007 Abteilung für Innere Medizin, Leitung PD Dr. med. Beyer, Krankenhaus Neu-Mariahilf, Göttingen

10/2007 – 08/2009 Universitätsklinik für Hämatologie und hämatologisches Zentrallabor (UKH-HZL), Leitung Prof. Lämmle, Universitätsklinikum Inselspital Bern

09/2009 - dato House-Staff, Allgemeine Innere Medizin Anna-Seiler, Leitung Prof. Bürgi, Universitätsklinikum Inselspital Bern

## Schulausbildung

---

1985 – 1989 Grundschule Katholisches Familienwerk Pullach  
1989 – 1998 Humanistisches K. Wilhelms Gymnasium München.  
26.06.1998 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife (Abitur-Note 1,7, Prüfungsfächer Latein, Physik, Chemie und Religion)

## Hochschulausbildung

---

10/1999 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig – Maximilians – Universität in München

08/2001 Physikum (Note: 1,7)

08/2002 und 08/2004 Erster und Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/04 – 02/05 PJ Tertial im Fach Innere Medizin an der Tulane University Hospital, New Orleans, LA, USA

30.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note sehr gut)

07.12.2005 Approbation als Arzt (Regierung von Oberbayern)