

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl**

**Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)
im Zervixkarzinom**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Julia Kolb
aus Bad Kissingen**

Würzburg, September 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Hönig

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2010

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Zervixkarzinom (state of the art)	1
1.2	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	3
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Patientencharakteristik	7
2.2	Zellkultur.....	7
2.3	MIF-Expression auf mRNA-Ebene	8
2.3.1	<i>mRNA-Isolierung</i>	8
2.3.2	<i>cDNA-Synthese</i>	11
2.3.3	<i>RT-PCR (TaqMan®)</i>	12
2.3.4	<i>Auswertung</i>	13
2.4	MIF-Expression auf Proteinebene.....	13
2.4.1	<i>Immunhistochemie</i>	13
2.4.2	<i>Western Blot</i>	14
2.5	Bestrahlung und Zellzyklus-FACS-Analyse	19
2.5.1	<i>p53-Status der SiHa- und CaSki-Zervixkarzinomzell-Linien</i>	19
2.5.2	<i>Bestrahlung der SiHa-Zervixkarzinomzellen</i>	20
2.5.3	<i>Zellzyklus-FACS-Analyse</i>	21
2.6	Klonogenitätsassay	21
2.7	Statistik.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Expressionsstatus von MIF	23
3.1.1	<i>MIF-Überexpression auf mRNA-Ebene</i>	23
3.1.2	<i>MIF-Überexpression auf Proteinebene (Immunhistochemie)</i>	24
3.1.3	<i>MIF-Überexpression auf Proteinebene (Western Blot)</i>	26
3.2	Bestrahlung und Zellzyklus-FACS-Analyse	27
3.3	Klonogenitätsassay	28

4	Diskussion	31
4.1	Expressionsstatus von MIF im Zervixkarzinom	32
4.2	MIF als möglicher Modulator der Strahlensensitivität beim Zervixkarzinom ...	34
5	Zusammenfassung	38
6	Literaturverzeichnis	40
7	Anhang	48

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serumalbumin
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasien
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase
KCl	Kaliumchlorid
LSAB2	Labelled Streptavidin-Biotin 2 System
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MDM2	murine double minute 2

MIF	macrophage migration inhibitory factor
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
NK	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol
PBS	salziger Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLB	passive lysis buffer
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom-Protein
P/S	Penicillin-Streptomycin
RCT	Radio- und Chemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Tumorstadium (Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasen)
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom (state of the art)

Ursprünglich war das Zervixkarzinom das häufigste Karzinom des weiblichen Genitals. Die Inzidenz variiert heute weltweit zwischen fünf (Spanien) und 45 (Kolumbien) pro 100.000 Frauen pro Jahr [1]. In Deutschland lag die Inzidenz 1971 bei 35/100.000 und im Jahr 2001 bei 12/100.000. Im Vergleich zum Zervixkarzinom liegt die Inzidenz der zervikalen Präkanzerosen, der sogenannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN I – III) um das 100-fache höher [1]. Diese Verschiebung erklärt sich durch die Auswirkungen der Krebsvorsorgeuntersuchungen, die einmal pro Jahr ab dem 20. Lebensjahr erfolgen sollten. Wichtig sind hier vor allem eine vaginale Spekulumuntersuchung sowie eine Abstrichentnahme von der Portio und aus dem Zervikalkanal. Bei makroskopischen Auffälligkeiten sollten zudem eine kolposkopische Untersuchung und gegebenenfalls eine Probenentnahme erfolgen. Der dabei gewonnene Abstrich wird anschließend zytologisch untersucht und nach Papanicolaou klassifiziert. Die zervikalen intraepithelialen Neoplasien entstehen an der Grenze zwischen Plattenepithel und Zylinderepithel, die auch Transformationszone genannt wird. Diese verschiebt sich entsprechend des Einflusses von Östrogen, je nach der Lebensphase einer Frau, und liegt bei jungen Frauen zu Beginn der Geschlechtsreife peripher auf der Ektozervix, bei älteren postmenopausalen Frauen zentral in der Endozervix. Histologisch werden die zervikalen intraepithelialen Neoplasien, je nach Schweregrad der zellulären Atypien und Ausdehnung der Veränderung, in CIN I – III eingeteilt [1]. Die Altersverteilung des Zervixkarzinoms zeigt einen ersten Gipfel zwischen 35 und 39 Jahren und einen zweiten Gipfel zwischen 60 und 64 Jahren. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 52,2 Jahren. In 80 % der Fälle treten Plattenepithelkarzinome auf, wobei sich allerdings der Anteil der Adenokarzinome in den letzten 25 Jahren von 10 auf 20 % erhöht hat [1]. Die Krankheitsentstehung ist bisher nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass Zervixkarzinome von humanen Papillomaviren (HPV) mitverursacht werden. Es handelt sich dabei um kugelförmige, unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren (dsDNA), die zu den Papovaviridae gehören, und von denen insgesamt circa 200 verschiedene Typen bekannt sind. Die meisten dieser Viren sind für den Menschen rela-

tiv harmlos und können lediglich unangenehme Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) verursachen. Die Infektion mit den sogenannten Hochrisiko-Typen humaner Papillomaviren (high-risk HPV) stellt, von wenigen Ausnahmen abgesehen, eine Voraussetzung für die Entstehung des Zervixkarzinoms dar. Zu den Hochrisiko-HPV-Typen zählen unter anderem 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 und 56 [1]. Dabei nimmt man an, dass sowohl das E6- als auch das E7-Protein der high-risk HPV ihre onkogene Aktivität dadurch erreichen, dass sie mit bestimmten Proteinen der Wirtszelle interagieren und deren Funktion beeinträchtigen [2]. Nach dem heutigen Stand der Forschung geht man davon aus, dass E6 den Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 bewirkt, dadurch den programmierten Zelltod nach DNA-Schädigung inhibiert und somit zur genetischen Instabilität der Wirtszelle beiträgt [3]. Dagegen konnte gezeigt werden, dass E7 das Tumorsuppressorprotein pRb (Retinoblastom-Protein) inaktiviert und somit die Proliferation der Wirtszellen stimuliert [3]. Eine weitere Ursache der Tumorentstehung kann eine erworbene Immunschwäche sein. Auch Fettleibigkeit wird derzeit als potentieller Risikofaktor für das Adenokarzinom angesehen [4]. Als weitere Risikofaktoren werden das Rauchen, Genitalinfektionen sowie Promiskuität unterstützt durch Langzeiteinnahme von oralen Kontrazeptiva diskutiert [1].

Derzeit wichtigster präventiver Ansatz sind die seit September 2006 bzw. seit Oktober 2007 in Deutschland verfügbaren HPV-Impfstoffe, die zur Prophylaxe von hochgradigen Dysplasien der Zervix uteri und des Zervixkarzinoms, hochgradiger dysplastischer Läsionen der Vulva sowie von äußeren Genitalwarzen, die durch die Typen 6, 11, 16 und 18 des humanen Papillomavirus (HPV) verursacht werden, dienen sollen [5].

Adäquate Behandlungsmöglichkeiten richten sich vor allem nach dem Tumorstadium. In den Frühstadien und insbesondere bei prämenopausalen Patientinnen wird die Operation nach Wertheim-Meigs vorgezogen [1]. Dieses Operationsverfahren beinhaltet die Hysterektomie, die Entfernung der Tuben und einer Scheidenmanschette sowie der Ligamenta sacrouterina und der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Dabei gilt, dass bis zum Stadium Ia und in ausgewählten Einzelfällen auch Ib die Operation die Therapie der Wahl ist [6]. Bei primär operablen Patientinnen ist auch in den Stadien IIa und IIb die Operation mit paraaortaler Lymphonodektomie die bevorzugte Methode, gegebenenfalls in Kombination mit einer postoperativen Bestrahlung [1]. Im Stadium III und in vielen Fällen des Stadiums IIb stellt eine simultane Radiochemotherapie bei Fehlen

von Kontraindikationen die Behandlung der Wahl dar [1]. Bei gleichzeitiger Kombination von Radio- und Chemotherapie (RCT) nutzt man nicht nur die eigenständigen zytotoxischen Effekte beider Modalitäten, sondern man bewirkt auch eine Intensivierung der Therapie durch die kurze Gesamtbehandlungszeit und in der Regel eine spezifische Radiosensibilisierung von Tumorzellen. Bei zahlreichen Tumorentitäten ist dieses Vorgehen deshalb wirksamer als eine zeitlich getrennte (sequentielle) Radiochemotherapie. In diesem Zusammenhang kommt dem Chemotherapeutikum Cisplatin, das zu den effektivsten Radiosensitizern unter den Chemotherapeutika zählt, eine wichtige Bedeutung als Strahlensensitizer beim Zervixkarzinom zu [72]. Im Stadium IV infiltriert der Tumor die Schleimhaut von Blase oder Rektum und bzw. oder überschreitet die Grenzen des kleinen Beckens und setzt Fernmetastasen. Bei diesem fortgeschrittenen Tumorleiden wird die Radiotherapie als palliative Therapie eingesetzt [1].

Da die Behandlungsmöglichkeiten limitiert sind, gewinnen neue Therapieansätze, wie immunologische Therapien, zunehmend an klinischem Interesse. Dabei wird die herausragende Rolle verschiedener Proteine deutlich, die tumorspezifisch exprimiert sind und sich somit als geeignete therapeutische Angriffspunkte erweisen. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise Survivin [7] zu nennen, ein apoptosehemmendes Protein, das von unterschiedlichen Krebszellen gebildet wird. In aktuellen Studien wird Survivin als Zielmolekül im Rahmen der Immuntherapie beim kolorektalen Karzinom sowie beim Zervixkarzinom überprüft. Diesbezüglich läuft eine Kooperationsarbeit zwischen der Frauenklinik und der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg.

1.2 Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

MIF ist ein Zytokin, das bereits 1966 erstmals beschrieben wurde [8]. Ursprünglich nahm man an, dass MIF von aktivierten T-Lymphozyten bei Antigenkontakt freigesetzt wird und dazu fähig ist, die zufällige Bewegung und Migration von Phagozyten zu inhibieren. Diese Fähigkeit von MIF weckte besonderes Interesse im Rahmen der immunologischen Forschung. Somit war dieses niedermolekulare Glyko-Protein (12,5 kD) eines der ersten löslichen Zytokine, welches in vitro untersucht werden konnte. Neuere Arbeiten weisen in einer großen Anzahl von Geweben ein breites Expressionsmuster von MIF nach [9]. MIF wird in Zellen des Immunsystems wie zum Beispiel Monozy-

ten/Makrophagen [10], in T- und B-Lymphozyten [11, 12], in natürlichen Killerzellen (NK) [13], in Basophilen/Mastzellen [14] und auch in Eosinophilen [15] exprimiert. Des Weiteren fand man heraus, dass endokrine Organe, wie beispielsweise der Hypophysenvorderlappen [16], Produktionsorte von MIF sind.

Zudem konnte in diversen Tumoren eine MIF-Überexpression gezeigt werden [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. In gynäkologischen Tumoren wurde MIF bereits im Mamma- [24] und Ovarialkarzinom beschrieben [25]. Dabei stellte man relevante Mengen an MIF im Serum und im malignen Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen fest [25].

Die Funktionen von MIF sind vielfältig: So ist MIF als inflammatorisches Schlüsselzytokin direkt an der Pathogenese des ARDS (acute respiratory distress syndrome) beteiligt [26]. Des Weiteren spielt MIF eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale [27]. Hier konnte eine erhöhte Menge an MIF in den Luftwegen von Asthmatikern nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten Studien wesentliche Funktionen von MIF in der Antwort auf Endotoxine und im Rahmen des septischen Schocks auf [28]. Auch im Zuge der Immunantwort auf Exotoxine grampositiver Bakterien konnte die Rolle von MIF beschrieben werden [29]. Erwähnenswert ist zudem die Bedeutung von MIF als Antagonist der Glukokortikoide. Beispielsweise verhindern Glukokortikoide im Rahmen einer Entzündung die Aktivierung des nukleären Faktors κB (NF- κB), indem sie die Expression des inhibitorischen I $\kappa\text{B}\alpha$ erhöhen. Somit bleibt NF- κB im Zytosol gebunden und ist infolge dessen inaktiv. MIF wirkt dabei dem anti-entzündlichen Effekt der Glukokortikoide entgegen, indem es die durch Glukokortikoide induzierte Zunahme des I $\kappa\text{B}\alpha$ verhindert [30]. Eine MIF-Glukokortikoid-Interaktion wird auch dadurch deutlich, dass eine niedrige physiologische Glukokortikoidmenge die Freisetzung von MIF aus Monozyten und Makrophagen stimuliert [31].

Neben dem Nachweis von MIF in gynäkologischen Tumoren zeigte sich beispielsweise im Rahmen von Untersuchungen beim Prostata-Karzinom, dass MIF durchaus tumorbiologische Bedeutung hat. Eine Hemmung von MIF oder des MIF-bindenden Rezeptors CD74 [32] hatte hier eine Abschwächung der Invasion dieses Tumors zur Folge [33]. Darüber hinaus reduzierte ein *Knockdown* der MIF-Tumorzell-Linien die Tumorzellinvasivität [34].

Des Weiteren weist MIF eine Beteiligung an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung auf. So konnte MIF mit der Spezifizierung des Gewebes und der Organogenese während der Embryonalentwicklung in Zusammenhang gebracht werden [35]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass MIF in den Prozess der Proliferation und Differenzierung der Augenlinse involviert ist [36].

Hieraus ergibt sich auch weiteres tumorbiologisches MIF-Potential. Im Rahmen der Tumorentstehung supprimiert MIF proapoptische Prozesse durch Hemmung des Tumorsuppressors p53 [37] und induziert die Signaltransduktionskaskade von K-Ras und anderen Protoonkogenen [38]. Dabei ist p53 aber nicht der direkte Angriffspunkt von MIF. Vielmehr bewirkt MIF eine Reduktion der p21- und Cyclin G-Transkriptionsrate sowie eine Abnahme des murine double minute 2 (MDM2) Proteins, also eine Abnahme jener Proteine, die Zielproteine der transkriptionalen p53-Aktivität darstellen. Aktuelle Daten verweisen zudem auf die Möglichkeit einer direkten Interaktion von MIF mit p53, vermittelt über Cysteinreste [39]. Somit trägt MIF zur Tumorgenese auch durch eine direkte Hemmung von p53 bei. Des Weiteren wird die Tumprogression unter anderem durch die Induktion der Neoangiogenese z. B. über den vascular endothelial growth factor (VEGF) unterstützt [40]. Die Bedeutung von MIF für die Tumorgenese wird zudem dadurch gezeigt, dass Fibroblasten von MIF-knockout Mäusen resistent gegen eine maligne Transformation sind [41]. Ein Effekt von MIF auf die Tumorangio-genese, Tumorproliferation und Metastasierung ist außerdem durch Studien bei MIF-knockdown Neuroblastomzellen belegt [42]. Daneben zeigen weitere Untersuchungen, dass MIF bei Tumoren in der Lage ist, NK-vermittelte Zell-Lysen zu hemmen [43].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die proinflammatorischen sowie die tumorbiologischen Funktionen von MIF wahrscheinlich einerseits durch Unterhaltung chronischer Entzündungsprozesse, andererseits durch Eingriffe in den Zellzyklus zur Tumorentstehung beitragen. Der Weg von der chronischen Inflammation zur Tumorentstehung und die damit verbundenen molekularen Mechanismen, wie Proliferation, Invasion, Migration und Metastasierung, stellen wichtige Ansatzpunkte in der aktuellen Forschung dar. Die Kenntnis über die Biologie der verschiedenen Tumorarten ist diesbezüglich ganz wesentlich für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Die Rolle von MIF im Zervixkarzinom wurde bislang noch nicht untersucht. Dies ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, in der zunächst die Expression von MIF im Zervixkarzinom überprüft wird. Des Weiteren soll eine MIF-abhängige Modulation der Strahlensensitivität von Zervixkarzinomzellen untersucht werden, da beim Zervixkarzinom insbesondere die Radiotherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie von zentraler Bedeutung ist. Dies ist insofern von klinischem Interesse, da eigene, bislang nicht publizierte Daten eine mögliche MIF-abhängige Veränderung der Chemotherapiesensitivität von Ovarialkarzinomzellen zeigten. Zudem stellt sich die Frage, ob die tumorfördernden Eigenschaften von MIF wie beispielsweise die Hemmung des Tumorsuppressors p53 durch einen MIF-Inhibitor beeinflussbar sind.

2 Material und Methoden

2.1 Patientencharakteristik

Zum Nachweis der mRNA Expression von MIF im Zervixkarzinom wurde RNA aus acht Gewebeproben von Frischmaterial, aus vier Plattenepithelkarzinomen, aus einem Adenokarzinom und aus drei gesunden Zervixgeweben, sowie aus insgesamt 14 Paraffinschnitten extrahiert (siehe Anhang Tabelle 1). Diese Proben wurden zuvor von erfahrenen Pathologen des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg beurteilt und entsprechend klassifiziert.

Bei den Paraffinschnitten handelte es sich um vier Zervixdysplasien, vier Carcinomata in situ und sechs Plattenepithelkarzinome der Zervix.

Der Nachweis von MIF auf Proteinebene wurde durch eine immunhistochemische Färbung an 32 Zervixdysplasien, 23 Carcinomata in situ und CIN III und 26 Zervixkarzinomen durchgeführt (siehe Anhang Tabelle 2). Diese Proben wurden ebenfalls routinemäßig am Institut für Pathologie der Universität Würzburg beurteilt und den aufgeführten Diagnosen zugeteilt.

2.2 Zellkultur

Zum Nachweis einer möglichen MIF-abhängigen Modulation der Strahlensensitivität beim Zervixkarzinom wurden die immortalisierten Zervixkarzinomzell-Linien SiHa (ATCC, Katalognummer HTB-35, squamöses Zervixkarzinom) und CaSki (ATCC, Katalognummer CRL-1550, Metastase eines epidermoiden Zervixkarzinoms im Mesenterium) verwendet. Als Medium diente RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), wobei 10 % fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1 % Penicillin-Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,5 % Natriumpyruvat (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) zugesetzt wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank (HERAcell 150 Zellkulturinkubator, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) gehalten und je nach Dichte 1:10 gesplittet.

2.3 MIF-Expression auf mRNA-Ebene

2.3.1 mRNA-Isolierung

2.3.1.1 mRNA-Extraktion aus Paraffinschnitten

Die Durchführung dieses Verfahrens erfolgte unter Verwendung des High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Hierzu wurden zunächst Paraffinschnitte mit 1 – 10 µm Dicke angefertigt und diese mit jeweils 800 µl Xylol, dann 800 µl Ethanol absolut und schließlich 800 µl Ethanol 70 % entsprechend den Angaben des Herstellers entparaffiniert. Nach der Entfernung des 70 %igen Ethanols inkubierten die offenen Reaktionsröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) im Heizblock (Biometra® GmbH, Thermoblock TB1, Göttingen, Deutschland) für 5 – 15 min bei 55 °C zur Lufttrockenheit der Pellets. Pro entparaffiniertem Gewebepellet wurden 60 µl Lysepuffer und 10 µl 10 %iges Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt. Zwischen jedem Schritt erfolgte ein kurzes Vortexen und Zentrifugieren. Nach der Zugabe von jeweils 30 µl Proteinase K und einer Inkubation von 3 Stunden bei 55 °C wurden 200 µl Bindungspuffer und 200 µl Ethanol absolut zugegeben. Im Anschluss an die Kombination des High Pure Filterreaktionsröhrchens mit dem Sammelreaktionsröhrchen wurde das Lysat in das obere Reservoir pipettiert, für 30 s bei $8.000 \times g$ in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Vor einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 30 µl DNase Lösung (3 µl DNase Inkubationspuffer und 27 µl DNase). Nach dem Hinzufügen von 300 µl Waschpuffer I und nacheinander 300 µl und 200 µl Waschpuffer II in das obere Reservoir wurde jeweils zentrifugiert. Im Anschluss an die Überführung des High Pure Filterreaktionsröhrchens in ein neues 1,5 ml Reaktionsröhrchen und nach der Zugabe von 20 µl Elutionspuffer folgte die Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde nach wiederholtem Zentrifugieren aufgenommen, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei $8.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Das Mikrozentrifugenröhrchen enthielt nun die eluierte RNA.

2.3.1.2 mRNA-Extraktion aus Frischgewebe

Die mRNA-Isolierung aus Frischgewebe erfolgte mit dem TRIzol[®] Reagent (Gibco[®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Zu je etwa 50 – 100 µg Frischgewebe wurde 1 ml TRIzol hinzugefügt, gut gemischt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden zur Phasenseparierung 200 µl Chloroform dazugegeben, für 15 s gemischt und erneut für 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 4 °C 15 min lang bei 12.000 × g zentrifugiert, danach die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Präzipitation war es nötig, 500 µl Isopropanol hinzuzufügen und für 15 s zu mischen. Im Anschluss an eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur folgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 × g für 10 min bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstands schloss sich das Reinigen der RNA mit 1 ml Ethanol 75 % an. Sobald das RNA-Pellet luftgetrocknet war, wurde es in 50 µl Diethylpyrocarbonatwasser (DEPC-H₂O) aufgenommen. Zum DNA-Verdau und zur RNA-Konzentrierung war ein Mastermix pro Ansatz notwendig, der sich folgendermaßen zusammensetzte:

- 48,9 µl DEPC-H₂O (0,2 % Natriumazetat, 0,2 % Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCL) pH 7,4, 0,2 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA))
- 3,8 µl 3 M Na-Acetat pH 5,5 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,5 µl 1 M Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 1,8 µl DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Somit wurden 55 µl dieses Ansatzes zu je 50 µl isolierter RNA hinzugefügt und für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 3 M Na-Acetat pH 8 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 250 µl Ethanol absolut zugegeben, gemischt und für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands erfolgte ein Waschschrift mit 250 µl Ethanol 75 % und ein erneutes Zentrifugieren für 15 min bei 13.000 rpm. Im Anschluss an die Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 15 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen, 1:100 verdünnt und die RNA-Quantität im Photometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemessen (Faktor: × 40 für RNA). Zur Qualitätsbestimmung diente ein Gellauf, wofür jeweils 1

µg RNA verwendet wurde. Als Gel kam ein Agarosegel mit folgenden Bestandteilen zum Einsatz:

- 0,5 g Agarose (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 36 ml destilliertes Wasser (hauseigene Reinstwasseranlage)
- 5 ml 10 × 4-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 9 ml Formaldehyd 37 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 4 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)

Für den Gellauf wurden je Probe 12 µl eines Formaldehyd/Formamid-Mixes benötigt, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 500 µl Formamid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 200 µl Formaldehyd 37 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 150 µl 10 × MOPS-Puffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 150 µl DEPC-H₂O

Diesem Mix fügte man für den Gellauf jeweils 0,5 – 1 µg RNA und 2 µl Ladepuffer hinzu, denaturierte das Gemisch bei 70 °C für 5 min, transferierte die Proben in die Gel-taschen und ließ das Gel bei 100 V, 100 mA 20 min laufen. Der Ladepuffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 15 ml Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) 50 × Puffer (Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 25 ml destilliertes Wasser
- 60 ml Glycerin/Glycerol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 20 mg Orange G (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 50 mg Xylencyanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Bei intakter RNA waren im Gel deutlich zwei scharf getrennte Banden zu sehen, die den ribosomalen RNAs 28S und 18S entsprachen.

2.3.2 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der gesamten RNA aus Frischgewebe und Paraffinschnitten diente anschließend das RevertAidTM First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Dabei benötigte man jeweils 1 µg RNA und 1 µl Oligo dT Primer auf 11 µl DEPC-H₂O. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 70 °C in den Thermocycler (Biometra® GmbH, T-Gradient, Göttingen, Deutschland) und anschließend auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 4 µl 5 × Puffer, 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor und 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix) erfolgte ein weiterer Reaktionsschritt für 5 min bei 37 °C in dem Thermocycler und schließlich ein erneutes Abkühlen auf Eis. 100 µl des 5 × Puffer setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 250 mM Tris-HCL (pH 8,3 bei 25 °C)
- 250 mM Kaliumchlorid (KCl)
- 20 mM MgCl₂
- 50 mM DTT (Dithiothreitol)

Für die reverse Transkription wurde jeweils 1 µl RevertAid Reverse Transkriptase zugegeben und die Proben für 60 min bei 42 °C erneut in der Polymerase Kettenreaktions-Maschine (PCR-Maschine) inkubiert und anschließend für 10 min bei 70 °C inaktiviert.

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde zudem eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-PCR (GAPDH-PCR) mit dem AB Kit (AmpliAq®DNA-Polymerase with GeneAmp®, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierfür war für einen 25 µl-Ansatz folgender Mastermix nötig:

- 17,375 µl DEPC-H₂O
- 2,5 µl 10 × Puffer
- 2,5 µl dNTP 2 mM
- 0,25 µl Primer reverse 5'TCCACCACCCTGTTCTGTA-3'
- 0,25 µl Primer forward 5'ACGACAGTCCATGCCATCAC-3'
- 0,125 µl Taq-Polymerase

Nach der Zusammenstellung dieses Ansatzes wurden 24,5 µl je Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils 0,5 µl cDNA hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente H₂O. Anschließend erfolgte wiederholt ein Reaktionsschritt im Thermocycler.

Die Bedingungen für diese PCR lauteten folgendermaßen:

- 3 min 95 °C
- 30 Zyklen:
 - 30 s 95 °C
 - 30 s 59,5 °C
 - 30 s 72 °C
- 10 min 72 °C

2.3.3 RT-PCR (TaqMan®)

Zum Nachweis der mRNA Expression von MIF im Zervixkarzinom diente die relative real-time PCR (TaqMan®) (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aus cDNA der Frischgewebeproben und der Paraffinschnitte. Zunächst erfolgte eine Verdünnung der cDNA 1:10, der MIF-Primer 1:20 und der 18S-Primer 1:50 mit destilliertem Wasser. Nun wurde der Mastermix zusammengestellt, der je Probe aus 7,5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 0,9 µl Primer forward, 0,9 µl Primer reverse und aus 0,7 µl destilliertem Wasser bestand. Nach dem Pipettieren von jeweils 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA in eine 96-well-Platte wurden 10 µl Mastermix je Probe hinzugefügt.

Die Bedingungen für diese PCR im Thermocycler waren:

- 10 min 50 °C
- 3 min 95 °C
- 40 Zyklen:
 - 30 s 95 °C
 - 30 s 60 °C
 - 30 s 72 °C
- 15 s 72 °C

Dabei wurden folgende spezifische Primer angewendet:

- 18S up: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' (Nukleotide 450-469)
- 18S down: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' (Nukleotide 636-619)
- MIF up: 5'-GCCCCGGACAGGGTCTACA-3' (Nukleotide 272-289)
- MIF down: 5'-CTTAGGCGAAGGTGGAGTTGTT-3' (Nukleotide 349-328)

2.3.4 Auswertung

Zur Durchführung der Datenanalyse kam die $\Delta\Delta C_T$ Methode zur relativen Quantifizierung zur Anwendung. Dabei wurde zunächst für jede untersuchte Probe der C_T Wert des Referenzgens, das die ribosomale Untereinheit 18S darstellte, vom C_T Wert des zu untersuchenden Gens (hier gesundes Zervixgewebe, Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix) subtrahiert ($\Delta C_T = C_T \text{ MIF} - C_T \text{ 18S}$). Nach dieser Normierung wurde vom ΔC_T Wert der experimentell behandelten Proben der Mittelwert der gesunden Zervixgewebe, der hier als Kontrolle diente, subtrahiert. Es resultierte der sogenannte $\Delta\Delta C_T$ Wert der einzelnen Proben. Der relative MIF Expressionsunterschied ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.4 MIF-Expression auf Proteinebene

2.4.1 Immunhistochemie

In Paraffin eingelassene Gewebeproben von 32 Zervixdysplasien, 23 Carcinomata in situ und CIN III und 25 Zervixkarzinomen wurden in Stücke zu je 10 μm Dicke geschnitten (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), auf silanisierte Objektträger (Superfrost, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) gezogen und in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Zur Antigenmaskierung diente danach ein Reaktionsschritt in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle (Siemens, Amberg, Deutschland) bei 750 Watt für 3 x 5 min. Nach der Spülung im destillierten Wasser wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation der Schnitte für 10 min in H_2O_2 (3 % in Methanol) geblockt. Im Anschluss an einen erneuten Waschschrift zunächst mit destilliertem Wasser und dann im salzigen Phosphatpuffer (PBS) (Dulbecco's PBS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) erfolgte ein Blocken der Schnitte für 15 min mit 1 %igem Ziegennormalserum in PBS. Anschließend inkubierten die Objektträger mit dem

monoklonalen Anti-human MIF-Antikörper (AK) (Klon 12302, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA, 1:100 gelöst in PBS) für 45 – 60 min bei Raumtemperatur. Dann wurden die Objektträger mit PBS gespült und die AK-Bindung mit dem Labelled Streptavidin-Biotin 2 System Horseradish Peroxidase (LSAB2 HRP)-Kit (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) entsprechend der Vorgaben detektiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit PBS. Gefärbt wurde mit dem 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Kitsystem (ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit PBS wurden die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt und die Objektträger zunächst im destillierten Wasser und schließlich im Leitungswasser für 5 min gebläut. Die Schnitte wurden dann in aufsteigender Alkoholreihe zum absoluten Alkohol dehydriert und über Xylol als Intermedium mit Vitro Clud (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläschen (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

2.4.2 Western Blot

Mittels Western Blot wurden zwei verschiedene Zervixkarzinomzell-Linien, SiHa und CaSki, auf Proteinebene nach ihrem MIF-Expressionsstatus untersucht.

2.4.2.1 Gele

Trenngel (Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel – 15 % 5 ml)

- 1,1 ml H₂O
- 2,5 ml 30 % Acrylamidmix (Rotiphorese®Gel30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 1,3 ml 1,5 M TRIS-HCL pH 8,8 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,05 ml 10 % SDS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,05 ml 10 % Ammoniumpersulfat (APS) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,002 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Sammelgel (SDS-Polyacrylamidgel – 5 % 3 ml)

- 2,1 ml H₂O
- 0,5 ml 30 % Acrylamidmix (Rotiphorese®Gel30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,38 ml 1 M Tris-HCL pH 6,8 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,03 ml 10 % SDS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,03 ml Ammoniumpersulfat (APS) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,003 ml TEMED (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

2.4.2.2 Puffer

Laemmli-Ladepuffer (Endkonzentrationen)

- 100 mM Tris-HCL pH 6,8 (2 ml 0,5 M) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 4 % SDS (400 mg) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,2 % Bromphenol-Blau (20 mg) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 20 % Glycerol (2 ml) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- auf 9 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- zum Gebrauch 10 % β -Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugeben, etwa 3 μ l für 20 μ g Protein

5 × Laufpuffer (Endkonzentrationen)

- 25 mM Tris (9 g) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 193 mM Glycin (43,2 g) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,5 % SDS (3 g) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Auf 600 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- pH 8,3 einstellen

10 × Transferpuffer (Endkonzentrationen)

- 25 mM Tris (30,3 g) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 192 mM Glycin (144 g) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Auf 1.000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- pH 8,8 einstellen

2.4.2.3 Zell-Lyse

Zur Gewinnung der Proteine musste zuvor eine Lyse der SiHa- und der CaSki-Zellen (jeweils 1 Mio Zellen) vorgenommen werden. Zum Ablösen der Zellen diente jeweils 2 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Anschließend wurden die nun gelösten Zellen mit Medium aufgenommen und bei 1.400 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach drei Waschschritten mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) erfolgte die Aufnahme der Pellets der SiHa- und der CaSki-Zellen in jeweils 100 µl Lysepuffer.

Der Lysepuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 10 ml 0,5 M TRIS-HCL (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 ml 1,2 M NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 ml 100 mM EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 µl Nonidet P40 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Nach Auffüllen des Lysepuffers auf 100 ml mit H₂O wurden pro 1 ml Lysepuffer folgende Proteinaseinhibitoren hinzugefügt:

- 2 µl 10 mg/ml Aprotinin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 2 µl 5 mg/ml Leupeptin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 5,7 µl 100 mM Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Die in jeweils 100 µl Lysepuffer aufgenommenen Zervixkarzinomzellen inkubierten schließlich für 20 min auf Eis, bevor bei 1.400 rpm für 20 min im Reaktionsröhrchen zentrifugiert wurde. Im Überstand befanden sich nun die extrahierten Proteine.

Die Messung der Proteinkonzentration in diesen Lysaten erfolgte nach Bradford mit Roti®-Quant (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstelleranweisung in dem dafür vorgesehenen Messgerät (TECAN, sunrise Absorbance Reader, Crailsheim, Deutschland).

2.4.2.4 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben wurden der Heizblock auf 95 °C vorgeheizt und anschließend 3 µl Laemmli-Ladepuffer in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, schließlich jeweils 10 µg Protein der Proben dazugegeben, anzentrifugiert und danach für 5 min bei 95 °C in den Heizblock gestellt. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis und erneutem Zentrifugieren konnte der Gellauf stattfinden. Vor dem Pipettieren der Proben in die Geltaschen erleichterte eine Spülung der Taschen mit Laufpuffer den Vorgang. In eine Tasche wurde der Standard 8 µg (Fermentas Page Ruler #SM0671, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 120 V für 1 h 15 min.

2.4.2.5 Blot

Zum Blot wurde das Elektrophorese System (Biometra® GmbH, Göttingen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet und der Blot bei 150 V für 1,5 h durchgeführt.

2.4.2.6 Proteindetektion und Detektion der Antikörper

Für die Antikörper-Markierung wurde zunächst der PBS-Puffer mit Tween® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in einer Schale vorgelegt und die Membran hinzugefügt. Nach dem Entfernen des Puffers konnte die Membran mit 0,2 %iger Ponceau-Rot-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt werden. Im Anschluss an die Entfernung des Farbstoffs inkubierte die Membran erneut im Puffer. Daraufhin wurde die Membran zusammen mit 5 ml ROTI®-BLOCK (Artikelnr. A151, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zum Abblocken unspezifischer Bindungen in ein 50 ml Reaktionsröhrchen gegeben. Nach 45 min wurde der ROTI®-BLOCK entfernt und ein Waschschrift der Membran mit PBS schloss sich für 5

min an. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Anti-human MIF Antikörper (Klon 12302, Katalognummer MAB289, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) 1:1.000 verdünnt eingesetzt. In TS-TMBSA erfolgte über Nacht eine Inkubation mit der Membran.

TS-TMBSA setzte sich nach Protokoll zusammen aus:

- 5 ml 10 mM TRIS-HCL (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 15 ml 150 mM Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 µl 0,1 % Tween®20 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 g 2 % Bovines Serumalbumin (BSA) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 5 ml 0,01 % Natriumazid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Nach der Inkubation erfolgten die Entfernung des Antikörpers und eine viermalige Spülung der Membran für jeweils 5 min mit PBS + 0,05 % Tween. Anschließend wurde 2 % Milchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in PBS angesetzt, in diese Lösung als sekundärer Antikörper Anti-Maus-HRP (Katalognummer 31334248, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) 1:5.000 verdünnt dazugegeben und dieses Gemisch zur Membran hinzugefügt. Nach etwa 1 h Inkubationszeit wurde der sekundäre Antikörper wieder entfernt und die Membran vier Mal für 5 min mit PBS-0,05 % Tween gewaschen.

Zur Filmentwicklung der MIF-Antikörper-Markierung wurde folgende Entwicklungslösung zusammengestellt:

- 1 ml Solution A (4 °C): 200 ml 0,1 M TRIS-HCL (pH 8,6) + 50 mg Luminol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland, A4685)
- 0,1 ml Solution B (Raumtemperatur im Dunkeln): 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 0,3 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Nach einer Inkubation der Membran für 2 min in der Entwicklungslösung und Einlegen der Membran in die Filmkassette wurde der Film in der Dunkelkammer für 1 min aufgelegt und danach für 3 min in das Entwicklungsbad gegeben. Nach kurzem Spülen des Films mit destilliertem Wasser und Fixierung in entsprechender Lösung (Dauer ca. 7 min) wurde der Film erneut mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Im Anschluss daran lagerte der Film kurz in destilliertem Wasser und danach für 7 min in einem Fixierbad. Daraufhin musste der Film erneut kurz mit destilliertem Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt werden.

Zum Nachweis identischer Proteinmengen erfolgte über Nacht eine Inkubation der Nitrozellulosemembran (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit dem von der Ziege stammenden β -Actin-Antikörper (1:1.000 verdünnt) (Katalognummer sc-1616, Santa Cruz Biotechnology®, Inc., Heidelberg, Deutschland). Nach der Entfernung des Antikörpers am folgenden Tag und einem Waschschrift der Membran 4-mal für jeweils 5 min mit PBS-Tween wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt. Dabei war es erforderlich, den Anti-goat-HRP (Katalognummer 605-4302, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA) 1:5.000 zu verdünnen, diesen der Membran zusammen mit Milchpulver zuzugeben und für etwa 1 h zur Inkubation stehen zu lassen. Nach der Inkubation wurde der sekundäre Antikörper entfernt und die Membran 4-mal für jeweils 5 min mit PBS-Tween gespült. Die Filmentwicklung mit der β -Actin-Markierung lief in der oben beschriebenen Weise ab.

2.5 Bestrahlung und Zellzyklus-FACS-Analyse

2.5.1 p53-Status der SiHa- und CaSki-Zervixkarzinomzell-Linien

Die zentrale Frage im Rahmen der Bestrahlung der Zervixkarzinomzellen war jene nach einer möglichen Modulation der Strahlensensitivität durch MIF.

Vor der Bestrahlung der Tumorzellen wurde der p53-Status, ein molekularer Indikator für das Ansprechen von Radio- und Chemotherapie [44], der SiHa- und CaSki-Zervixkarzinomzell-Linien anhand eines Reporter-gen-Assays überprüft. Hierfür diente als Reporter-gen das Firefly-Luziferase-Gen (Dr. Wischhusen, Würzburg, Deutschland) und pcDNA-p53 als Wildtyp-Plasmid zur Wiederherstellung der p53-Aktivität in evtl. mutierten Zellen. Zunächst wurden 8.000 Zellen pro well in einer 96-well-Platte in 200

μl Medium pro well ausgesät. Zur transienten Transfektion (ExGen 500, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) waren zwei Ansätze nötig. Der Reporter-Gen-Ansatz bestand aus 0,3 μg Gesamt-Plasmid, 0,25 μg Reporter-Gen-Plasmid (p53-luc) und 0,025 μg Renilla-Luziferase-Plasmid (RL-pcDNA3.1-lux) (0,025 μg pcDNA3.1). Zur Wiederherstellung der p53-Aktivität waren 0,3 μg Gesamt-Plasmid, 0,25 μg Reporter-Gen-Plasmid (p53-luc), 0,025 μg Renilla-Luziferase-Plasmid (RL-pcDNA3.1-lux) (1:10) und 0,025 μg pcDNA3.2-p53 (Wildtyp-Plasmid) (1:10) nötig. Nach Pipettieren von 20 μl NaCl 150 mM zu 0,3 μg Plasmid, Zentrifugieren und Zugabe von 0,99 μl ExGen erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig geschüttelt, bei $280 \times g$ für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und schließlich für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS dienten 20 μl passive lysis buffer (PLB) zur Lyse der Zellen. Die Messung fand im Luminometer (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland) statt, nachdem bei Raumtemperatur 20 min lang eine Inkubation durchgeführt, anschließend die Zellen geschüttelt und in eine 96-well-Luziferase-Platte (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) transferiert worden waren.

2.5.2 Bestrahlung der SiHa-Zervixkarzinomzellen

Im Anschluss daran wurden die SiHa-Zervixkarzinomzellen mit einer Strahlendosis von 0 Gy bis 15 Gy in An- und Abwesenheit eines präklinisch evaluierten small molecule MIF-Inhibitors bestrahlt.

Nach einem Waschschrift mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und Aufnahme der gelösten Zellen in Medium erfolgte eine Übertragung der Zellen in ein Reaktionsröhrchen und ein Zentrifugieren desselben für 4 min bei 1.500 rpm. Die Zellen wurden nach Verwerfen des Zellüberstands mit 10 ml Medium aufgenommen, davon jeweils 1,5 ml in je 2 Filterkulturflaschen gegeben und jede Filterkulturflasche mit 8,5 ml Medium ergänzt, wobei in eine Filterkulturflasche zusätzlich 10 μl MIF-Inhibitor pipettiert wurden. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 48 Stunden mit dem MIF-Inhibitor fand eine Bestrahlung von insgesamt jeweils einer Million Zellen mit einer Strahlendosis von 2,5, 5, 10 und 15 Gy statt. Nun wurden die Zellen bei 2.000 rpm für 4 min zentrifugiert, mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

Nach Entfernung des Zellüberstands wurden die Zellen jeweils mit 5 ml Medium aufgenommen, in kleine Filterkulturflaschen übertragen und zur Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Brutschrank gestellt. Als Kontrolle dienten nicht bestrahlte Zellen, die mit bzw. ohne MIF-Inhibitor inkubierten.

2.5.3 Zellzyklus-FACS-Analyse

24 Stunden nach der Bestrahlung wurden alle Zellen nach einem Waschschrift mit PBS abgelöst und mit 1 ml eiskaltem Ethanol 75 % für 20 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit kaltem PBS erfolgte die Färbung der Zellen mit Propidiumjodid/RNaseA-Lösung (Propidiumjodid, #P4170, Sigma, Deisenhofen, Deutschland; RNaseA, #109169, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für die Zellzyklus-FACS-Analyse (FACS = Fluorescence activated cell sorting), indem die Zellen für 20 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubierten. Propidiumjodid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure, wobei Zell- bzw. DNA-Konzentration und Farbstoffkonzentration voneinander abhängig sind. Daraufhin fand die Messung der einzelnen Zellzyklusphasen im Durchflusszytometer (FACS-Calibur, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) statt.

2.6 Klonogenitätsassay

Zusätzlich zum FACS wurde ein Klonogenitätsassay durchgeführt. Für diesen Versuch wurden jeweils 500 vorbestrahlte Zellen in 200 µl Medium pro well als Triplikate in einer 96-well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Dabei erfolgte in einem Triplikat mit MIF-Inhibitor nach Bestrahlung eine erneute Zugabe des MIF-Inhibitors. Diese Gruppe wurde mit einem Triplikat ohne zusätzlichen MIF-Inhibitor sowie einem Triplikat ohne MIF-Inhibitor verglichen. Nach Inkubation des Ansatzes für 7 Tage bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde der Zellüberstand abgenommen, die 96-well-Platte einmal mit Leitungswasser gewaschen und in jedes well 50 µl Kristallviolettlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) (0,5 % in Methanol) pipettiert. Unter leichtem Schütteln wurde die Platte daraufhin mit dem Farbstoff inkubiert, anschließend 3-mal unter fließendem Wasser ausgewaschen und bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen. In der mikroskopischen Auswertung zählten Zellverbände mit mehr als 40 Zellen als Kolonien. Auf diesem Weg konnte der Einfluss der Bestrahlung auf das Zellwachstum beobachtet werden.

2.7 Statistik

Zur Korrelation von immunhistochemischen mit klinischen Parametern erfolgte die Auswertung verschiedener Tumorcharakteristika. Dabei spielte das Tumorstadium (TNM), das histologische Grading (G1-3) und das Alter der Patientinnen eine Rolle (siehe Patientencharakteristik).

Zum Nachweis der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test (SPSS 15.0 für Windows) als nichtparametrischer Test durchgeführt (Signifikanzniveau $p = 0,05$).

Auch wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem histochemischen MIF-Score und dem histologischen Grading anhand einer Korrelationsanalyse nach Spearman (SPSS 15.0 für Windows) untersucht. Daneben wurde mit dem gleichen Verfahren die Beziehung zwischen dem Tumorstadium (TNM) und dem MIF-Score näher beleuchtet.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsstatus von MIF

3.1.1 MIF-Überexpression auf mRNA-Ebene

MIF ist im Zervixkarzinom auf mRNA-Ebene überexprimiert. Die RT-PCR aus drei gesunden Gewebeproben der Zervix, aus vier Plattenepithelkarzinomen und aus einem Adenokarzinom der Zervix zeigte eine signifikante Überexpression der MIF mRNA im Zervixkarzinom gegenüber gesundem Zervixgewebe (MIF relative Expression 90,41 zu 4,51, $p < 0,01$, siehe Abb. 1).

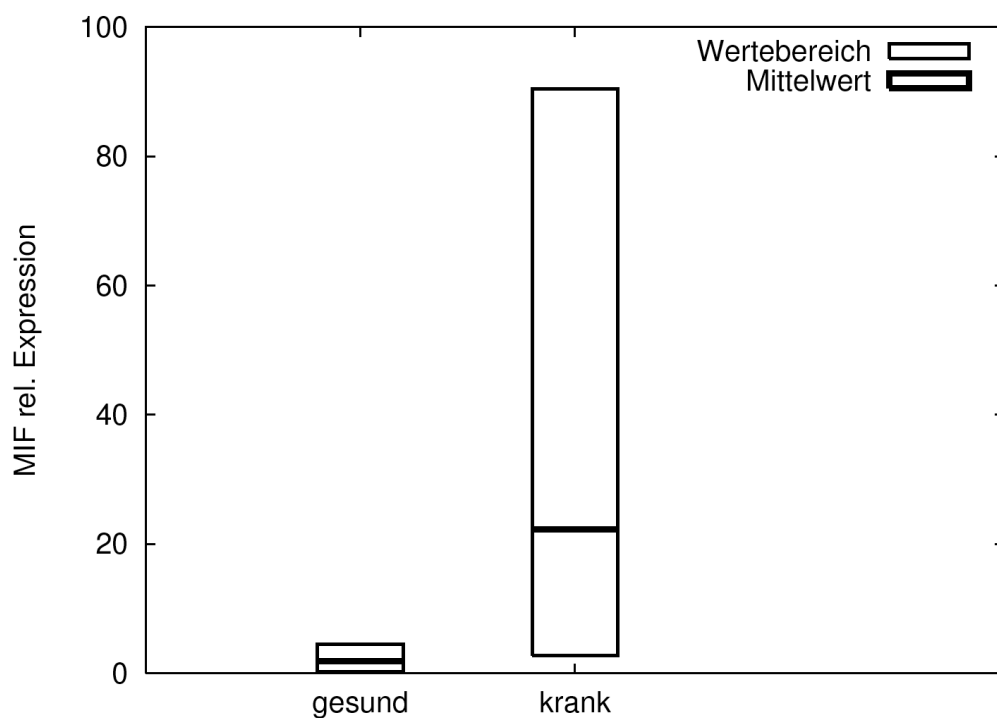


Abbildung 1

Die mRNA Isolierung aus den 14 Paraffinschnitten unter Verwendung des High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) konnte keine verwertbaren Ergebnisse erbringen.

3.1.2 MIF-Überexpression auf Proteinebene (Immunhistochemie)

Die Immunhistochemie zeigte eine Überexpression des MIF-Proteins im Zervixkarzinom (n = 25) im Vergleich zu CIN III/CIS (n = 23) und Dysplasie (n = 32). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (MIF relative Expression 43,10 zu 16,00, $p < 0,000$, siehe Abb. 2). Ebenso zeigte sich eine MIF-Proteinüberexpression in CIN III/CIS-Läsionen im Vergleich zu Dysplasie (MIF relative Expression 33,83 zu 23,81, $p < 0,014$, siehe Abb. 2).

Für eine semiquantitative Evaluation der MIF-Expression wurde eine Score-Skala von 0 bis 3 definiert (Score 0 zeigte mikroskopisch 0 bis 20 %, Score 1 zeigte 21 bis 50 %, Score 2 zeigte 51 bis 80 % und Score 3 zeigte über 80 % der gefärbten MIF-haltigen Zellen). Beispiele sind in Abb. 3 dargestellt.

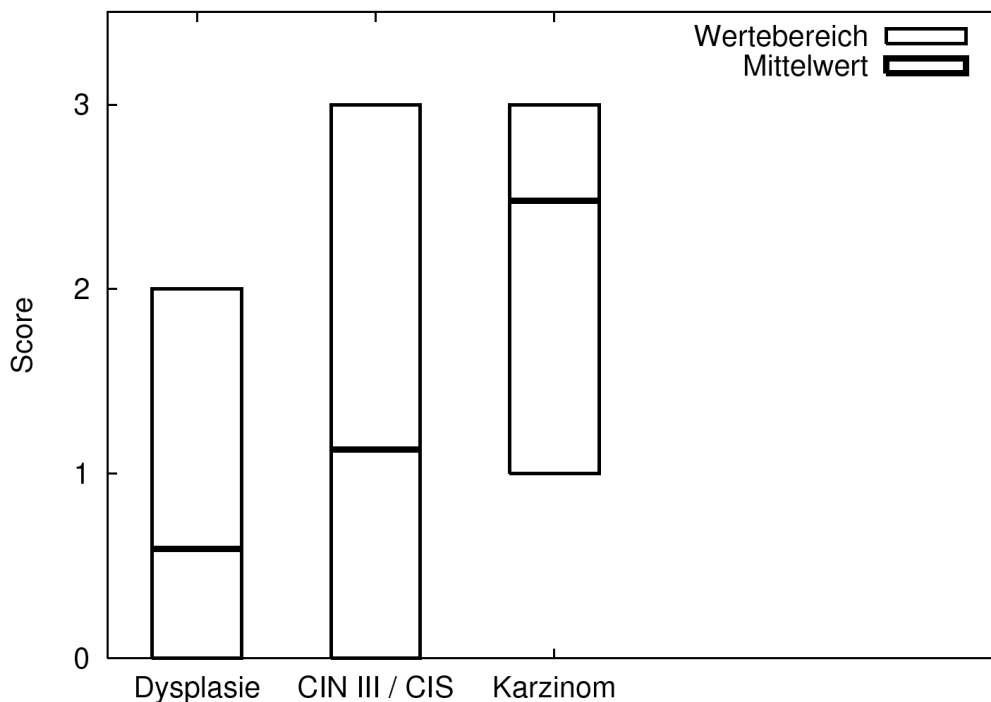


Abbildung 2

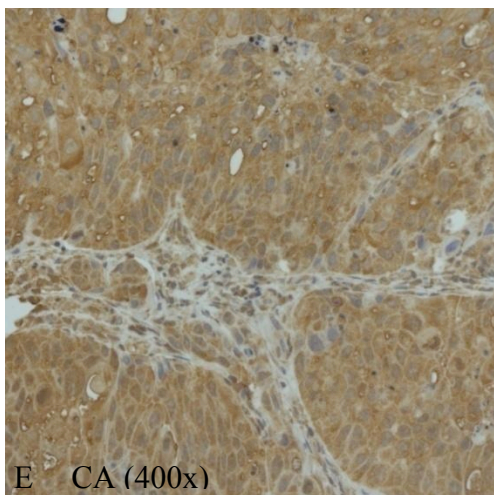
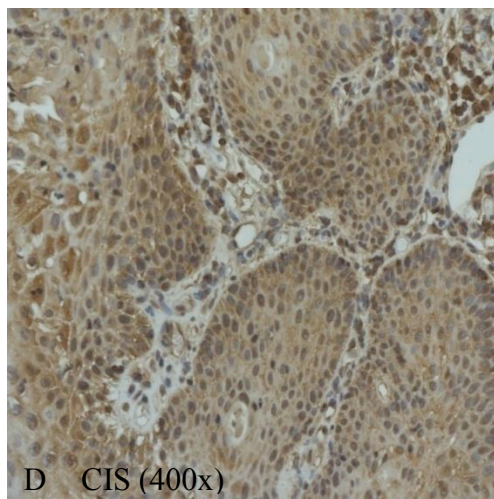
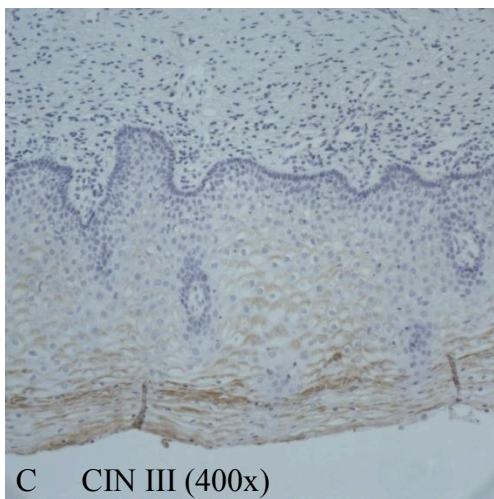
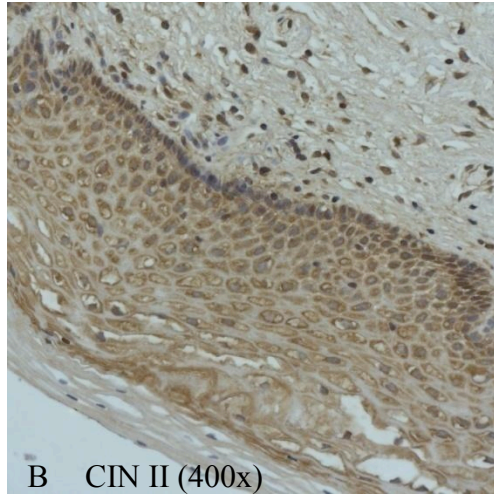
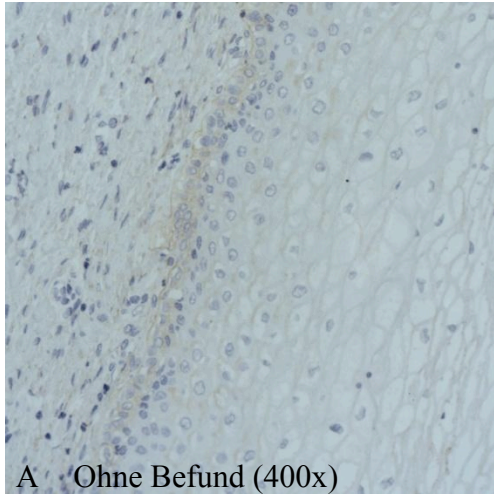


Abbildung 3. Expression von MIF in gesundem Zervixgewebe und CIN II (A Score 0, B Score 1), in CIN III und CIS (C Score 1, D Score 2) und im Zervixkarzinom (E Score 3). Die Expression von MIF ist im Zytoplasma lokalisiert.

Die Auswertung verschiedener Tumorcharakteristika ergab im untersuchten Kollektiv keine signifikante Korrelation von immunhistochemischen mit klinischen Parametern. Auch wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen MIF-Score und dem histologischen Grading anhand einer Korrelationsanalyse nach Spearman (SPSS 15.0 für Windows) nachgewiesen. Daneben ließ sich mit dem gleichen Verfahren ebenfalls keine signifikante Beziehung zwischen dem Tumorstadium und dem MIF-Score nachweisen.

3.1.3 MIF-Überexpression auf Proteinebene (Western Blot)

Die MIF-Überexpression in Zervixkarzinomzellen wurde auf Proteinebene anhand eines Western Blots aus zwei Zervixkarzinomzell-Linien gezeigt (siehe Abb. 4).

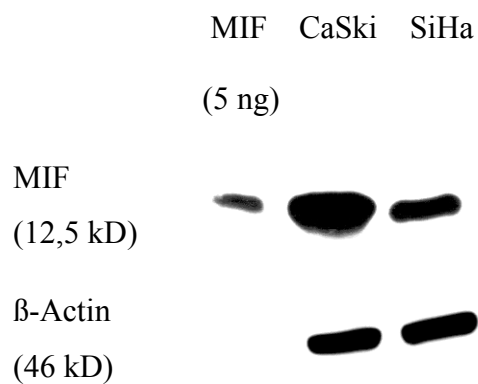


Abbildung 4

3.2 Bestrahlung und Zellzyklus-FACS-Analyse

Die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Bestrahlung in An- und Abwesenheit des MIF-Inhibitors zeigen die Abbildungen 5 und 6. Die beiden Abbildungen lassen erkennen, dass sich die Zervixkarzinomzellen nach der Bestrahlung hauptsächlich in der G0/G1- (blau) und G2/M-Phase (rosa) des Zellzyklus verteilen. Bei 0 Gy und 2,5 Gy sind 58 – 65 % der zervikalen Tumorzellen mit MIF-Inhibitor in der G0/G1-Phase im Vergleich zu den Kontrollen ohne MIF-Inhibitor, bei denen 63 – 67 % in der G0/G1-Phase sind. Ein größerer Unterschied ist bei 5 Gy zu erkennen. Hier befinden sich 41,46 % der Tumorzellen mit MIF-Inhibitor in der G0/G1-Phase, gegenüber 53,44 % der Kontrollzellen. Ab einer Strahlendosis von 10 Gy ist bei beiden Gruppen die Mehrheit der Tumorzellen in der strahlensensiblen G2/M-Phase angesiedelt. Allerdings zeigt sich, dass sich deutlich mehr Tumorzellen nach MIF-Inhibitorbehandlung in dieser Phase befinden (62,8 % mit MIF-Inhibitor zu 51,31 % ohne MIF-Inhibitor).

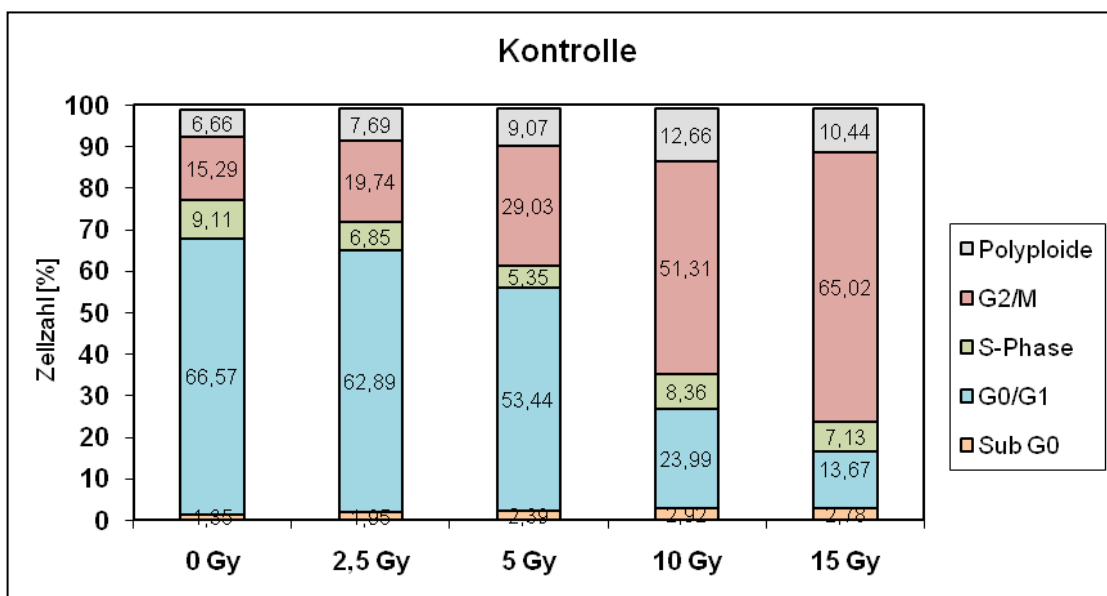


Abbildung 5

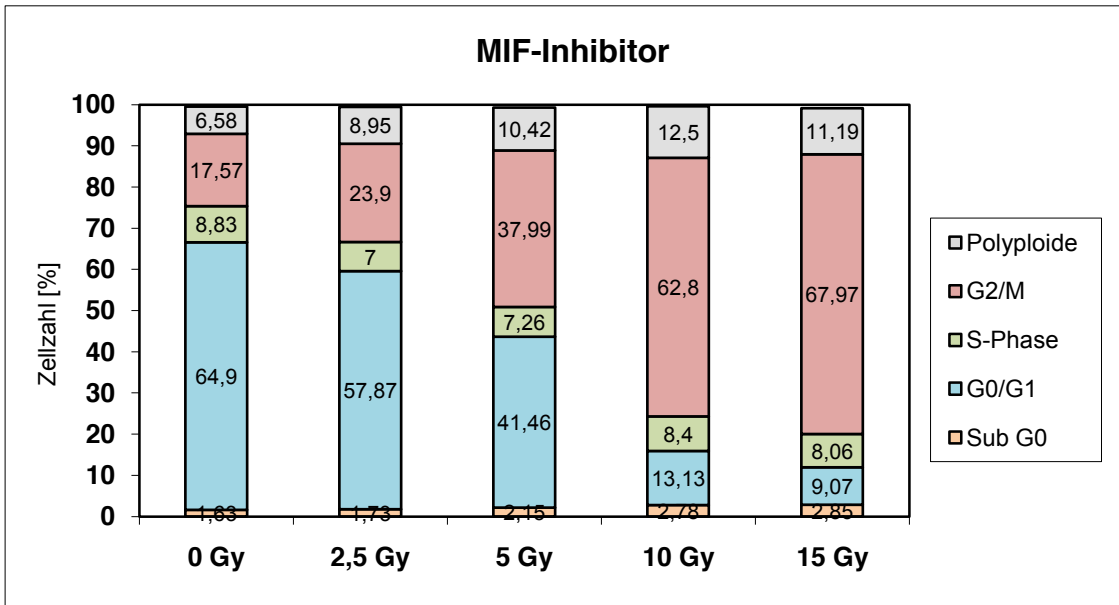


Abbildung 6

3.3 Klonogenitätsassay

Im Anschluss an die Bestrahlung der SiHa-Zervixkarzinomzellen wurde neben der Zellzyklus-FACS-Analyse ein Klonogenitätsassay durchgeführt, um die Sensibilität der Tumorzellen auf die Bestrahlung und die daraus resultierende Bestrahlungstoxizität zu beurteilen.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die Abnahme der überlebenden zervikalen Tumorzellen in Abhängigkeit vom MIF-Inhibitor mit steigender Strahlendosis. Im Bereich von 5 Gy erhöht sich mit MIF-Inhibitor die strahleninduzierte Toxizität deutlich. Die Zervixkarzinomzellen mit MIF-Inhibitor (rot) wiesen eine stärkere Reduktion der Zellzahl als die Tumorzellen ohne MIF-Inhibitor (grün) auf (40 % überlebende Zellen mit MIF-Inhibitor zu 50 % ohne MIF-Inhibitor, 30 % überlebende Tumorzellen mit zusätzlicher MIF-Inhibitorgabe, siehe Abb. 7 und 8).

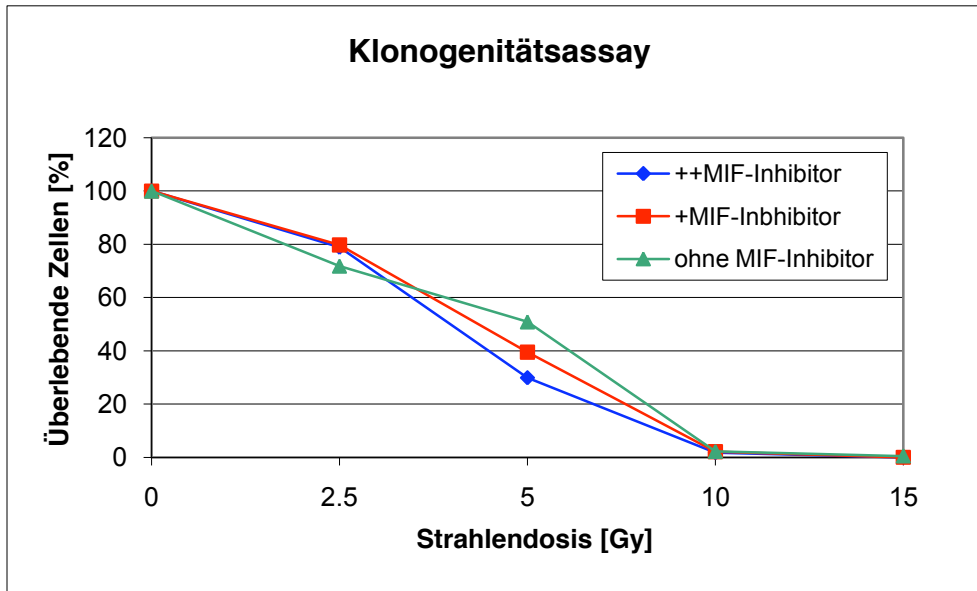
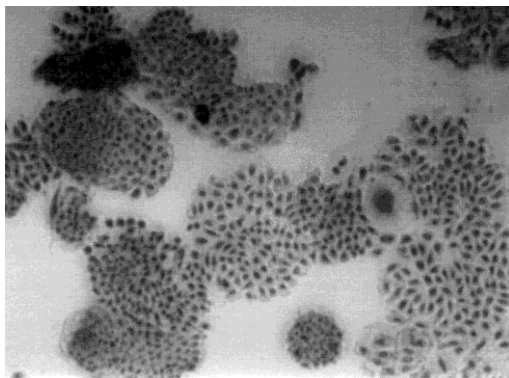
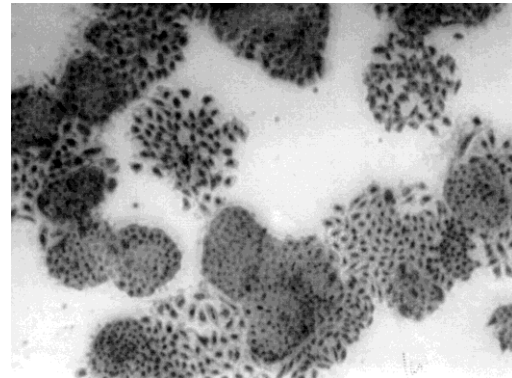


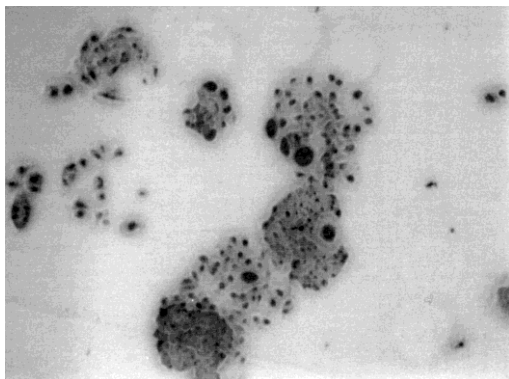
Abbildung 7



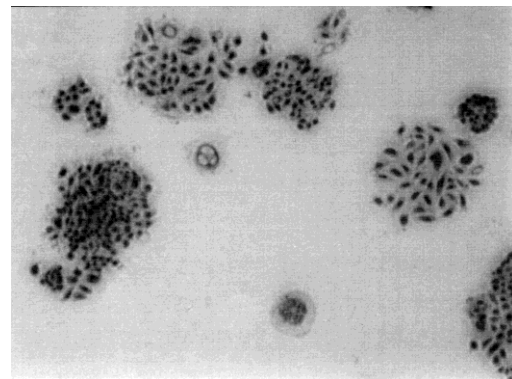
0 Gy ohne MIF-Inhibitor



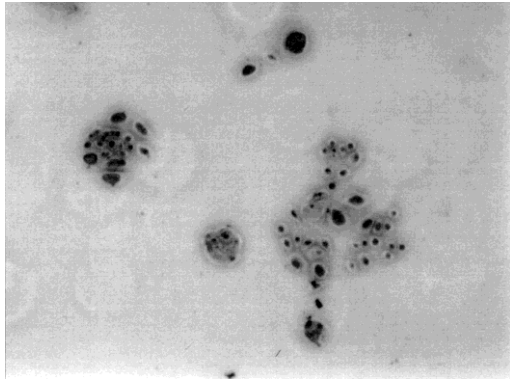
0 Gy mit MIF-Inhibitor



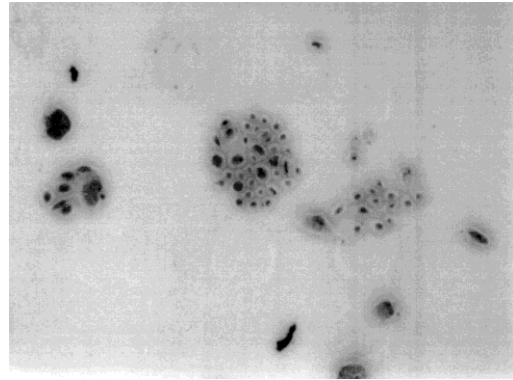
2,5 Gy ohne MIF-Inhibitor



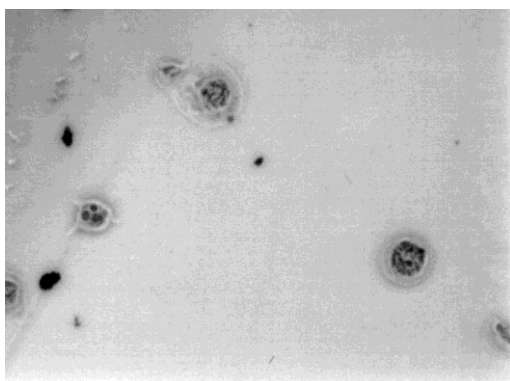
2,5 Gy mit MIF-Inhibitor



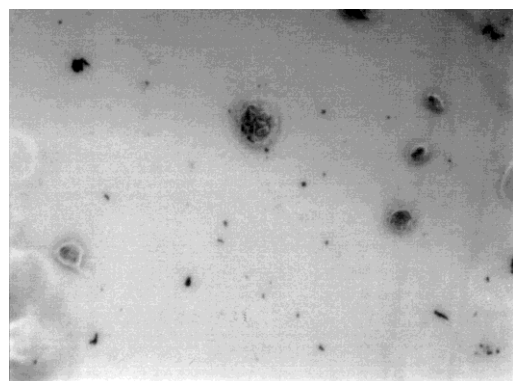
5 Gy ohne MIF-Inhibitor



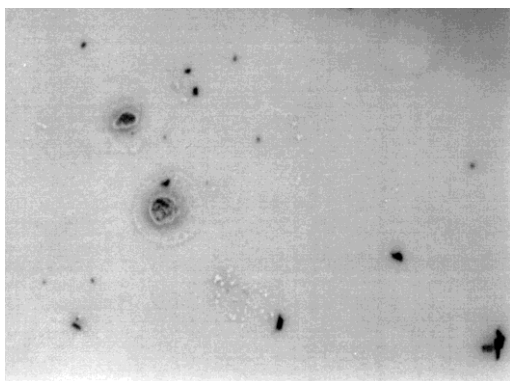
5 Gy mit MIF-Inhibitor



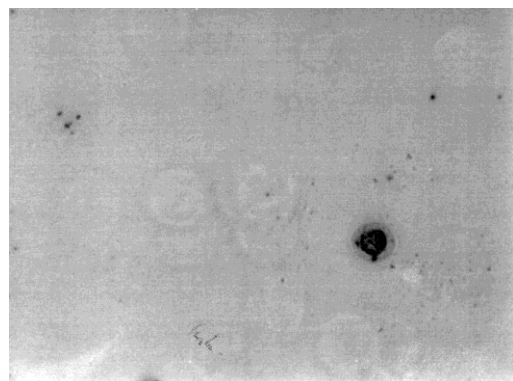
10 Gy ohne MIF-Inhibitor



10 Gy mit MIF-Inhibitor



15 Gy ohne MIF-Inhibitor



15 Gy mit MIF-Inhibitor

Abbildung 8

4 Diskussion

Früher begrenzten vor allem Infektionskrankheiten die Lebenszeit vieler Menschen. Dank der Entdeckung der Antibiotika, der Einführung essentieller Hygienemaßnahmen, der Verbesserung des allgemeinen Lebensstandards und des gezielten Einsatzes von Schutzimpfungen rücken diese Erkrankungen zunehmend in den Hintergrund [45]. Dagegen gewinnen heute im Wandel der Zeit, in der sich die durchschnittliche Lebenserwartung durch den medizinischen Fortschritt kontinuierlich erhöht, maligne Krankheiten immer mehr an Bedeutung [46].

Die zahlreichen Mechanismen, die letztendlich zur Tumorentstehung führen, sind vielfältig und Gegenstand aktueller Forschungen. Der Grundgedanke der Tumorgenese beinhaltet die Häufung von DNA-Schäden und die höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Neumutationen durch häufigere Zellteilungen im Laufe des verlängerten Lebens [47]. Jedoch führt nicht jeder DNA-Schaden zur Entstehung eines Tumors, da Körperzellen eine Reihe von Schutzmechanismen besitzen, die zum einen den Schaden erkennen und zum anderen die fehlerhafte DNA reparieren oder eliminieren können [47]. Erst wenn diese Schutzvorrichtungen versagen, ist der Weg zur Tumorentstehung gebahnt [48].

So geht man heute davon aus, dass auch bei der Entstehung des Zervixkarzinoms bestimmte Schutzvorrichtungen scheitern und sich dieser Tumor somit ungehindert entwickeln kann [2, 3].

Die Identifizierung bestimmter humaner Papillomaviren als Mitverursacher des Zervixkarzinoms machte die Entwicklung der HPV-Impfstoffe zur Prävention der zervikalen Tumorentstehung möglich [49]. Die Folgen dieser Impfstoffeinführung werden sich in den nächsten Jahren auf die Inzidenz der Zervixkarzinome auswirken. Erwartet wird ein enormer Rückgang dieser Erkrankung, deren Auftreten bereits dank der Vorsorgeuntersuchungen stark gesenkt werden konnte [50]. Entwickelt sich dennoch ein Zervixkarzinom, so sind die Behandlungsmöglichkeiten, insbesondere bei einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium, begrenzt. Neue Therapieansätze, wie immunmodulatorische Therapien, rücken hier in das klinische Interesse.

Aktuell stellen Proteine, die in Tumoren hochreguliert sind, eine immer größere Bedeu-

tung in der medizinischen Forschung dar. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) ist eines dieser Proteine, welches eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Zellen spielt [36]. Dieses Protein reguliert durch eine Reihe von Effekten auf die Signaltransduktion die Tumorgenese. Takahashi et al. 1998 konnten diese Wirkung von MIF, beispielsweise im Rahmen des Dickdarmkarzinoms, nachweisen, indem sie zunächst herausfanden, dass MIF auf mRNA- und auf Proteinebene in den Tumorzellen überexprimiert war [51]. Des Weiteren entdeckten sie eine mögliche Induktion des Tumorzellwachstums durch MIF zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren [51].

Welche Rolle MIF im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom spielt, ist bislang noch nicht untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst die Expression von MIF im Zervixkarzinom auf mRNA- und auf Proteinebene überprüft. Da beim Zervixkarzinom besonders die Radiotherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie von Bedeutung ist, interessierte die Frage nach einer möglichen Modulation der Strahlensensitivität durch MIF. Daher wurden Zervixkarzinomzellen, die MIF exprimieren, unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt und anschließend das Wachstumsverhalten dieser Zellen mithilfe eines Klonogenitätsassays beobachtet.

4.1 Expressionsstatus von MIF im Zervixkarzinom

In gynäkologischen Tumoren wurde MIF bereits im Mamma- [24] und im Ovarialkarzinom beschrieben [25]. Ob auch relevante Mengen von MIF im Zervixkarzinom nachweisbar sind, wurde zunächst auf mRNA-Ebene überprüft. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass MIF im Zervixkarzinom überexprimiert wird, während MIF im gesunden Gewebe der Zervix kaum nachweisbar ist. Auch die Forschungsergebnisse von Takahashi et al. 1998 [51] beim Kolonkarzinom und von Agarwal et al. 2007 [18] beim Ovarialkarzinom zeigten eine erhöhte MIF-Expression in den jeweiligen Tumoren im Gegensatz zu den gesunden Geweben.

Neben dem Nachweis der MIF-Überexpression im Zervixkarzinom auf mRNA-Ebene wurde die MIF-Expression auf Proteinebene durch Immunhistochemie in zervikalen Tumorzellen untersucht. Auch die immunhistochemische Analyse erbrachte, dass MIF

im Zervixkarzinom überexprimiert ist. Takahashi et al. 1998 konnten in einer immunhistochemischen Färbung beim Kolonkarzinom ebenso zeigen, dass MIF vor allem im Zytoplasma der Kolonkarzinomzellen zu finden war [51].

Des Weiteren ergab eine Western Blot Analyse, dass MIF Protein in zervikalen Tumorzellen überexprimiert wird. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Zell-Linien, SiHa und CaSki, untersucht. Bei beiden Zervixkarzinomzell-Linien konnte eine MIF-Überexpression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch Takahashi et al. 1998, indem sie beim Kolonkarzinom mithilfe eines Western Blots eine erhöhte MIF-Expression zeigen konnten [51].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MIF sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene im Zervixkarzinom überexprimiert ist. Jedoch bleibt weiterhin unklar, welche genaue Rolle MIF bei der malignen Transformation spielt. Neben seiner möglichen enzymatischen Aktivität als Tautomerase [52] könnte MIF ebenso über einen Rezeptor in der Zellmembran in die Zielzelle eindringen und auf diese Weise wirken. Unter Tautomerasen versteht man eine spezielle Gruppe von Isomerasen, welche die Umwandlung von Ketonen in ihre Enol-Tautomere und umgekehrt katalysieren. So konnten Sugimoto et al. 1996 eine Kristallstruktur, die Bestandteil der Isomerasen ist, auch bei MIF nachweisen [53]. Als möglicher Rezeptor für MIF wurde CD74 identifiziert [32]. CD74 stellt eine unvariable Kette des MHC-II-Komplexes dar, welche auch an der Zelloberfläche exprimiert wird [32]. Dabei besitzt CD74 selbst keine Signaltransduktionsdomäne und assoziiert mit dem Adhäsionsmolekül CD44, das in der Lage ist, Tyrosinkinase zu aktivieren [54]. Die Frage, ob exogen zugeführtes rekombinantes MIF oder endogen exprimiertes MIF seine Wirkung entfalten kann, klärten Hudson et al. 1999 [37]. Im Rahmen ihrer Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass MIF in beiden Fällen eine Umgehung des durch p53 induzierten Wachstumsstopps, der Seneszenz und der Apoptose bewirkt, indem es, wie bereits erwähnt, die transkriptionale Aktivität von p53 supprimiert. Das Protein p53 besitzt eine Schlüsselrolle in den Mechanismen der Wachstumshemmung und der durch genotoxischen Stress verursachten Apoptose [55, 56]. Fehlt den Zellen p53, können sie sich trotz beschädigter DNA vermehren [57]. Auf diese Weise kann auch die Mutation an die nächste Generation weitergegeben werden. Zudem wird der Eintritt der Zellalterung durch p53 gesteuert [58]. Die Replikationsfähigkeit normaler somatischer Zellen ist zeitlich begrenzt [59]. Dage-

gen ist die Immortalität eine wesentliche Eigenschaft maligner Zellen [59], die durch eine Hemmung von p53 begünstigt wird. Der hemmende Effekt von MIF auf p53 könnte somit möglicherweise zur Tumorentstehung beitragen [60, 61]. Ein weiterer Hinweis darauf ergibt sich aus der Tatsache, dass eines der häufigsten Ereignisse bei menschlichen Tumoren [37] der Verlust der p53-Funktion ist.

4.2 MIF als möglicher Modulator der Strahlensensitivität beim Zervixkarzinom

Bislang nicht publizierte Daten aus dem Labor Wischhusen zeigen eine mögliche MIF-abhängige Veränderung der Chemotherapiesensitivität von Ovarialkarzinomzellen. Da beim Zervixkarzinom besonders die Radiotherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie von zentraler Bedeutung ist, rückt die Frage nach einer möglichen Modulation der Strahlensensitivität durch MIF in das klinische Interesse.

Ionisierende Strahlen wie Röntgenstrahlen führen unter anderem zu DNA-Doppelstrangbrüchen, den schwersten Schädigungen der DNA [62, 63]. Die durch ionisierende Strahlen induzierten Doppelstrangbrüche sind wiederum zytotoxisch [64].

Im Versuch wurden die zervikalen Tumorzellen, wie oben erwähnt, in An- und Abwesenheit eines präklinisch evaluierten MIF-Inhibitors bestrahlt. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine orale Behandlung mit MIF-Inhibitor bei rheumatoider Arthritis zu einer signifikanten Abnahme der Gelenkschwellungen führte [65]. Histologische Analysen erbrachten zudem eine reduzierte Inflammation und Zerstörung der Gelenke. Da MIF, wie bereits erwähnt, aber nicht nur bei entzündlichen Erkrankungen, sondern auch bei Tumoren eine Rolle zu spielen scheint, stellt sich die Frage, ob der MIF-Inhibitor ebenfalls eine besondere Stellung in der Therapie des Zervixkarzinoms einnimmt. Anhand des Bestrahlungsversuchs konnte nachgewiesen werden, dass sich die Tumorzellen nach der Bestrahlung hauptsächlich in der G₀/G₁- und G₂/M-Phase des Zellzyklus verteilen. Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen sind unterschiedlich strahlensensibel. So reagieren Zellen in der G₂- und M-Phase wesentlich sensibler auf Bestrahlung als Zellen in der G₁- und G₀-Phase [66, 67]. Mit der Zugabe des MIF-Inhibitors wurden die Tumorzellen strahlensensibler, was am deutlichsten ab einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy zu sehen war.

Ein ähnliches Ergebnis erbrachte zudem der Klonogenitätsassay, der im Anschluss an die Bestrahlung der SiHa-Zervixkarzinomzellen durchgeführt worden war. Klonogenitätsassays werden zur Messung der intrinsischen Radiosensitivität, der zelleigenen, inneren Strahlenempfindlichkeit, eingesetzt [68]. Dabei betrachtet man den Zusammenhang von applizierter Strahlendosis und überlebenden Zellen. Mit überlebenden Zellen sind diejenigen gemeint, die noch proliferieren und somit Klone ausbilden können. Diese Fähigkeit wird als Klonogenität bezeichnet. Sobald die Reparaturvorgänge der bestrahlten Zellen nicht mehr greifen, können die DNA-Schäden nicht mehr behoben werden und die Zellen werden an ihrer Proliferation gehindert. Eine wichtige Schlüsselfunktion bei diesen Abläufen wird, wie bereits erwähnt, dem Tumorsuppressorprotein p53 zugeschrieben, das an der Steuerung des Zellzyklus und der Apoptose ebenso beteiligt ist, wie an der DNA-Reparatur [55 – 58].

Bei diesem Versuch wurde eine starke Reduktion der einzelnen Zellklone mit steigender Strahlendosis deutlich. Ein Unterschied im Zellwachstum der Tumorzellen, die zusätzlich den MIF-Inhibitor erhalten hatten, wurde ebenfalls ab 5 Gy ersichtlich. Hier überlebten nach der Bestrahlung erheblich mehr zervikale Tumorzellen ohne MIF-Inhibitor, im Gegensatz zu den Tumorzellen, denen der MIF-Inhibitor hinzugefügt worden war.

Eine denkbare Ursache für die erhöhte Strahlensensitivität mit dem MIF-Inhibitor stellt möglicherweise die Interaktion zwischen MIF und p53 dar. Hudson et al. 1999 gelang es, durch eine Hemmung von MIF bzw. des MIF-Rezeptors CD74 die MIF-induzierte p53-Hemmung aufzuheben. Demzufolge könnte man annehmen, dass der MIF-Inhibitor die p53-Funktion wieder herstellt und p53 ungehindert auf die strahleninduzierte DNA-Schädigung der Tumorzellen reagieren und diese zur Apoptose führen kann [37]. Auf diese Weise wären Tumorzellen mit MIF-Inhibitor einer Bestrahlungstherapie zugänglicher. Somit könnte der MIF-Inhibitor die Rolle eines Radiosensitizers übernehmen. Bestrahlungssensitizer kennt man aus In-vitro-Studien bei verschiedenen Tumorzell-Linien. Dabei erbrachte die Kombination aus Interferon- α oder Interferon- β mit Retinoiden und niedrigen Einzeit-Strahlendosen eine signifikant erhöhte Strahlenzytotoxizität [69, 70, 71]. Die Möglichkeit, durch Inhibitoren die Strahlensensitivität von Tumoren zu erhöhen, wurde bereits bei Altundag et al. 2004 beschrieben [72]. Hier wurden Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitoren eingesetzt, um die malignen Zellen der Kopf- und Halstumoren strahlensensibler reagieren zu lassen. Neuere Arbeiten zeigten,

dass COX-2 Inhibitoren beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Proliferation hemmen und die Apoptose induzieren [73]. Diese Effekte wurden mit der Induktion der p21-Expression durch COX-2 Inhibitoren assoziiert. p21 spielt aber auch bei der Interaktion zwischen MIF und p53 eine Rolle. Im Rahmen der Tumorentstehung supprimiert MIF, wie oben bereits erwähnt, proapoptotische Prozesse durch Hemmung des Tumorsuppressors p53 [37]. Dabei ist p53 jedoch nicht der direkte Angriffspunkt von MIF. Vielmehr bewirkt MIF unter anderem eine Reduzierung der p21-Transkriptionsrate. Somit stellt sich die Frage, ob die MIF-Inhibitoren und die COX-2 Inhibitoren in ähnlicher Weise wirken. Zudem interessiert, ob die MIF-Inhibitoren beim Zervixkarzinom, ähnlich wie COX-2 Inhibitoren bei Kopf- und Halstumoren, als Radiosensitizer eingesetzt werden könnten. Bislang diente Cisplatin im Rahmen der kombinierten Radiochemotherapie beim Zervixkarzinom als Chemotherapeutikum und als Radiosensitizer [72, 74]. Wird allerdings eine Patientin lediglich bestrahlt, fehlt der radiosensibilisierende Effekt des Cisplatin. In diesem Fall könnte möglicherweise der MIF-Inhibitor als Bestrahlungssensitizer fungieren. Zugleich würden damit die Nebenwirkungen von Cisplatin entfallen, wie zum Beispiel Nephrotoxizität, Knochenmarksuppression und Ototoxizität. Daneben wäre zu überlegen, ob eine Verstärkung der Radiotherapie durch Radiosensitizer eine Reduzierung der Bestrahlungsdosis ermöglichen könnte und somit ebenfalls eine Reduzierung von deren gastroenterologischen und hämatologischen Nebenwirkungen [75].

In aktuellen Studien werden therapeutische Strategien, die spezifisch auf die veränderte Tumorumgebung wirken, in Kombination mit einer Radiochemotherapie bei einem lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinom untersucht [76]. Dabei handelt es sich wie bei MIF um nicht zytotoxische Agenzien, die mit einer Radiochemotherapie kombiniert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die lokale Kontrolle über das Zervixkarzinom und das Überleben der Patienten mit einem weit fortgeschrittenen Zervixkarzinom zu verbessern. Daher stellt sich die Frage, ob auch MIF in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte.

Des Weiteren interessiert, welche Stellung MIF, neben der Bedeutung als Angriffspunkt des MIF-Inhibitors, noch einnehmen könnte. Der Nachweis, dass MIF überwiegend in Tumoren und somit auch im Zervixkarzinom überexprimiert ist, führt zudem zu der Frage, ob MIF als geeigneter Tumormarker für das Zervixkarzinom dienen könnte. Be-

reits beim Ovarialkarzinom wurde MIF bei Mor et al. 2005 als möglicher Serumproteinmarker in der Früherkennung des Ovarialkarzinoms in Betracht gezogen [77]. Darüber hinaus konnten Lee et al. 2008 zeigen, dass MIF ebenfalls als früher diagnostischer Marker beim kolorektalen Karzinom in Frage kommen könnte [78]. Camlica et al. 2008 war es außerdem möglich, einen scheinbaren diagnostischen Nutzen von MIF, vor allem in Kombination mit dem Tumormarker CEA, beim Magenkarzinom herauszustellen [79]. Auch Meyer-Siegler et al. 2002 prüften die Bedeutung von MIF als Biomarker in der Früherkennung des Prostatakarzinoms [80].

Die erzielten Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass MIF ein wesentlicher Bestandteil in der Tumorumgebung ist und eine Rolle in der Tumorgenese und Tumorprogression spielen könnte. Weitere Studien sind nötig, um die Bedeutung von MIF als potentiellen Angriffspunkt in der Therapie des Zervixkarzinoms und als möglichen Screeningparameter zu erörtern.

5 Zusammenfassung

Der Prozess der Entzündung und die Entstehung von Neoplasien sind durch komplexe Abläufe innerhalb des Organismus gekennzeichnet, die einer angemessenen Kontrolle des Zellzyklus und der Proliferation bedürfen. Dabei spielt eine Reihe von Eiweißstoffen, sowohl im Entzündungsgeschehen als auch in der Entstehung von Malignomen, eine wesentliche Rolle. Das proinflammatorische Zytokin Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) ist eines dieser Proteine, welches einen bedeutenden Beitrag in der Proliferation und Differenzierung von Zellen leistet. MIF stimuliert die Tumorzellproliferation, die Migration und die Metastasierung, fördert die Tumorangiogenese und hemmt die p53-vermittelte Apoptose. Aufgrund einer vermehrten Expression von MIF in diversen malignen Tumoren interessierte das Vorkommen von MIF im Zervixkarzinom. In der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsstatus von MIF im Zervixkarzinom auf mRNA- und Proteinebene mittels Western Blot und Immunhistochemie untersucht.

Zum Nachweis der mRNA Expression von MIF im Zervixkarzinom wurde RNA aus drei gesunden Gewebeproben der Zervix, aus vier Plattenepithelkarzinomen und aus einem Adenokarzinom der Zervix isoliert. Dabei zeigte sich eine signifikante Überexpression der MIF mRNA im Zervixkarzinom gegenüber dem gesunden Zervixgewebe. Des Weiteren konnte im Rahmen einer Western Blot Analyse ebenfalls eine Überexpression von MIF Protein in zervikalen Tumorzellen, SiHa und CaSki, nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich auch immunhistochemisch eine MIF Überexpression. Dabei wurden Paraffinschnitte von Zervixkarzinomen (n = 25), Carcinomata in situ und CIN III (n = 23) und Zervixdysplasien (n = 32) immunhistochemisch gefärbt.

Da beim Zervixkarzinom besonders die Radiotherapie meist in Kombination mit einer Chemotherapie von zentraler Bedeutung ist, rückte die Frage nach einer möglichen Modulation der Strahlensensitivität durch MIF in das klinische Interesse. Daher wurden Zervixkarzinomzellen mit einer Strahlendosis von 2,5 bis 15 Gy in An- und Abwesenheit eines MIF-Inhibitors bestrahlt und anschließend die Bestrahlungszytotoxizität dieser Zellen mithilfe eines Klonogenitätsassays näher beleuchtet. Mit steigender Strahlendosis nahmen die überlebenden zervikalen Tumorzellen in Abhängigkeit vom MIF-

Inhibitor ab. Eine mögliche Bedeutung von MIF bzw. des MIF-Inhibitors, sowohl als Radiosensitizer im Rahmen der Strahlentherapie des Zervixkarzinoms als auch als Screeningparameter, bedarf noch weiterer Studien.

6 Literaturverzeichnis

- [1] M. W. Beckmann. S2-Leitlinien Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms. Darmstadt: Zuckschwerdt-Verlag 2004.
- [2] H. Furumoto, M. Irahara. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest*, 49 (3 – 4): 124 – 133, 2002.
- [3] I. N. Mammias, G. Sourvinos, A. Giannoudis und D. A. Spandidos. Human Papilloma Virus (HPV) and Host Cellular Interactions. *Pathol Oncol Res*, Epub ahead of print, 2008.
- [4] J. V. Jr. Lacey, C. A. Swanson, L. A. Brinton, S. F. Altekruse, W. A. Barnes, P. E. Gravitt, M. D. Greenberg, O. C. Hadjimichael, L. McGowan, R. Mortel, P. E. Schwartz, R. J. Kurman und A. Hildesheim. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer*, 98 (4): 814 – 821, 2003.
- [5] Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut: Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren – Empfehlung und Begründung.
URL: http://www.rki.de/cIn_151/nn_205760/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausschnitte/HPV_STIKO_12_07,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/HPV_STIKO_12_07.pdf.
[Stand: März 2007].
- [6] A. Steren, H. N. Nguyen, H. E. Averette, R. Estape, R. Anqioli, D. M. Donato, M. A. Penalver und B. U. Sevin. Radical hysterectomy for stage Ib adenocarcinoma of the cervix: the University of Miami experience. *Gynecologic Oncology*, 48 (3): 355 – 359, 1993.
- [7] M. H. Andersen, R. B. Soerensen, J. C. Becker und P. T. Straten. HLA-A24 and survivin: possibilities in therapeutic vaccination against cancer. *J Transl Med*, 4: 38, 2006.
- [8] B. R. Bloom und B. Bennett. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153 (731): 80 – 82, 1966.
- [9] M. Bacher, A. Meinhardt, H.Y. Lan, W. Mu, C. N. Metz und J. A. Chesney. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol*, 150 (1): 235 – 246, 1997.
- [10] T. Calandra, J. Bernhagen, R. A. Mitchell und R. Bucala. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*, 179 (6): 1895 – 1902, 1994.

- [11] M. Bacher, C. N. Metz, T. Calandra, K. Mayer, J. Chesney, M. Lohoff, D. Gemsa, T. Donnelly und R. Bucala. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in t-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (15): 7849 – 7854, 1996.
- [12] A. Takahashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, K. Ogasawara, J. Nishihira und K. Onoe. Antisense macrophage migration inhibitory factor (mif) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol Immunol*, 43 (1): 61 – 67, 1999.
- [13] R. S. Apte, D. Sinha, E. Mayhew, G. J. Wistow und J. Y. Niederkorn. Cutting edge: Role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting nk cell activity and preserving immune privilege. *J Immunol*, 160 (12): 5693 – 5696, 1998.
- [14] H. Chen, M. Centola, S. F. Altschul und H. Metzger. Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J Exp Med*, 188 (9): 1657 – 1668, 1998.
- [15] A. G. Rossi, C. Haslett, N. Hirani, A. P. Greening, I. Rahmann und C. N. Metz. Human circulating eosinophiles secrete macrophage migration inhibitory factor (mif). Potential role in asthma. *J Clin Invest*, 101 (12): 2869 – 2874, 1998.
- [16] J. Bernhagen, T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey und W. Voelter. Mif is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365 (6448): 756 – 759, 1993.
- [17] J. M. Wilson, P. L. Coletta, R. J. Cuthbert, N. Scott, N. MacLennan, G. Hawcroft, L. Leng, J. B. Lubetsky, K. K. Jin, E. Lolis, F. Medina, J. A. Brieva, R. Poulson, A. F. Markham, R. Bucala und M. A. Hull. Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology*, 129 (5): 1485 – 1503, 2005.
- [18] R. Agarwal, D. H. Whang, A. B. Alvero, I. Visintin, Y. Lay, E. A. Segal, P. Schwartz, D. Ward, T. Rutherford und G. Mor. Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 196 (4): 348.e1 – 348.e5, 2007.
- [19] T. Shimizu, R. Abe, H. Nakamura, A. Ohkawara, M. Suzuki und J. Nishihira. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 264 (3): 751 – 758, 1999.
- [20] J. Chesney, C. Metz, M. Bacher, T. Peng, A. Meinhardt und R. Bucala. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*, 5 (3): 181 – 191, 1999.
- [21] M. Bacher, J. Schrader, N. Thompson, K. Kuschela, D. Gemsa, G. Waeber und J. Schlegel. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor gene and

- protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Am J Pathol*, 162 (1): 11 – 17, 2003.
- [22] E. S. White, K. R. Flaherty, S. Carskadon, A. Brant, M. D. Iannettoni, J. Yee, M. B. Orringer und D. A. Arenberg. Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res*, 9 (2): 853 – 860, 2003.
- [23] Y. Ren, H. T. Tsui, R. T. Poon, I. O. Ng, Z. Li, Y. Chen, G. Jiang, C. Lau, W. C. Yu, M. Bacher und S. T. Fan. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 107 (1): 22 – 29, 2003.
- [24] X. D. Xu, C. Yao, Y. Lin, L. P. Wang, L. L. Ma und S. M. Wang. The relationship between expression of macrophage migration inhibitory factor and prognosis of breast cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 88 (8): 520 – 523, 2008.
- [25] M. Krockenberger, Y. Dombrowski, C. Weidler, M. Ossadnik, A. Hönig, S. Häusler, H. Voigt, J. C. Becker, L. Leng, A. Steinle, M. Weller, R. Bucala, J. Dietl und J. Wischhusen. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) contributes to the immune escape of ovarian cancer by downregulating NKG2D. *J Immunol*, 180 (11): 7338 – 7348, 2008.
- [26] S. C. Donnelly, C. Haslett, P. T. Reid, I. S. Grant, W. A. Wallace, C. N. Metz, L. J. Bruce und R. Bucala. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, 3 (3): 320 – 323, 1997.
- [27] Y. Mizue, S. Ghani, L. Leng, C. McDonald, P. Kong, J. Baugh, S. L. Lane, J. Craft, J. Nishihira, S. C. Donnelly und R. Bucala. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (40): 14410 – 14415, 2005.
- [28] J. Bernhagen, T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey, W. Voelter, K. R. Manoque, A. Cerami und R. Bucala. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365 (6448): 756 – 759, 1993.
- [29] T. Calandra, L. A. Spiegel, C. N. Metz und R. Bucala. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (19): 11383 – 11388, 1998.
- [30] J. M. Daun, J. G. Cannon. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279 (3): R1043 – R1049, 2000.
- [31] T. Calandra, J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami und R. Bucala. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cyto-

- kine production. *Nature*, 377 (6544): 68 – 71, 1995.
- [32] L. Leng, C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell und R. Bucala. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 197 (11): 1467 – 1476, 2003.
- [33] K. L. Meyer-Siegler, K. A. Iczkowski, L. Leng, R. Bucala und P. L. Vera. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD 74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol*, 177 (12): 8730 – 8739, 2006.
- [34] T. Hagemann, J. Wilson, H. Kulbe, N. F. Li, D. A. Leinster, K. Charles, F. Klemm, T. Pukrop, C. Binder, F. R. Balkwill. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B und JNK. *J Immunol*, 175 (2): 1197 – 1205, 2005.
- [35] S. Kobayashi, K. Satomura, J. M. Levsky, T. Sceenath, G. J. Wistow und I. Semba. Expression pattern of macrophage migration inhibitory factor during embryogenesis. *Mech Dev*, 84 (1 – 2): 153 – 156, 1999.
- [36] G. J. Wistow, M. P. Shaughnessy, D. C. Lee, J. Hodin und P. S. Zelenka. A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (4): 1272 – 1275, 1993.
- [37] J. D. Hudson, M. A. Shoaibi, R. Maestro, A. Carnero, G. J. Hannon, and D. H. Beach. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*, 190 (10): 1375 – 1382, 1999.
- [38] R. A. Mitchell. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumorigenesis. *Cell Signal*, 16 (1): 13 – 19, 2004.
- [39] H. Jung, H. A. Seong und H. Ha. Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity. *J Biol Chem*, 283 (29): 20383 – 20396, 2008.
- [40] Y. Ren, H. M. Chan, Z. Li, C. Lin, J. Nicholls, C. F. Chen, P. Y. Lee, V. Lui, M. Bacher und B. K. Tam. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma. *Oncogene*, 23 (23): 4146 – 4154, 2004.
- [41] O. Petrenko, G. Fingerle-Rowsen, T. Peng, R. A. Mitchell und C. N. Metz. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation. *J Biol Chem*, 278 (13): 11078 – 11085, 2003.
- [42] Y. Ren, H. M. Chan, J. Fan, Y. Xie, Y. X. Chen, W. Li, G. P. Jiang, Q. Liu, A. Meinhardt und P. K. Tam. Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro

- and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma. *Oncogene*, 25 (25): 3501 – 3508, 2006.
- [43] A. C. Repp, E. S. Mayhew, S. Apte und J. Y. Niederkorn. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol*, 165 (2): 710 – 715, 2000.
- [44] R. G. Bristow, S. Benchimol und R. P. Hill. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol*, 40 (3): 197 – 223, 1996.
- [45] Statistisches Bundesamt: Letztmalig Ergebnisse der amtlichen Statistik zu meldepflichtigen Krankheiten für das Berichtsjahr 2000. In: *Wirtschaft und Statistik* 1/2002, S. 61.
- [46] Statistisches Bundesamt: II. Lebensqualität, Gesundheit und Ernährung. In: *Nachhaltige Entwicklung in Deutschland, Indikatorenbericht 2008*, S. 43.
- [47] J. de Boer und J. H. Hoeijmakers. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21 (3): 453 – 460, 2000.
- [48] N. Bock, H. Meden, M. Regenbrecht, B. Jünemann, J. Wangerin und D. Marx. Expression of the mismatch repair protein hMSH2 in carcinoma in situ and invasive cancer of the breast. *Anticancer Res*, 20 (1A): 119 – 124, 2000.
- [49] H. zur Hausen. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*, 384 (2): 260 – 265, 2009.
- [50] J. Monsonégo. Cervical cancer prevention: the impact of HPV vaccination. *Gynecol Obstet Fertil*, 34 (3): 189 – 201, 2006.
- [51] N. Takahashi, J. Nishihira, Y. Sato, M. Kondo, H. Ogawa, T. Ohshima, Y. Une und S. Todo. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*, 4 (11): 707 – 714, 1998.
- [52] H. Sugimoto, M. Taniguchi, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki und J. Nishihira. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 38 (11): 3268 – 3279, 1999.
- [53] H. Sugimoto, M. Suzuki, A. Nakagawa, I. Tanaka und J. Nishihira. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett*, 389 (2): 145 – 148, 1996.

- [54] X. Shi, L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. W. Murphy, E. Lolis, P. Noble, W. Knudson und R. Bucala. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 25 (4): 595 – 606, 2006.
- [55] A. R. Clarke, C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper und A. H. Wyllie. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362 (6423): 849 – 852, 1993.
- [56] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein und R. W. Craig. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51 (23 Pt 1): 6304 – 6311, 1991.
- [57] S. D. Griffiths, A. R. Clarke, L. E. Healy, G. Ross, A. M. Ford, M. L. Hooper, A. H. Wyllie und M. Greaves. Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene*, 14 (5): 523 – 531, 1997.
- [58] G. Ferbeyre, E. de Stanchina, A. W. Lin, E. Querido, M. E. McCurrach, G. J. Hannon und S. W. Lowe. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol*, 22 (10): 3497 – 3508, 2002.
- [59] L. Freitag, P. Litterst, B. Obertriffter, V. Velehorsch, H. P. Kemmer, A. Linder und I. Brightman. Telomerase in lung cancer. Testing the activity of the „immortality enzyme“ bronchial biopsies increases the diagnostic yield in cases of suspected peripheral bronchogenic carcinomas. *Pneumologie*, 54 (11): 480 – 485, 2000.
- [60] S. Venkatachalam, Y. P. Shi, S. N. Jones, H. Vogel, H. Bradley, D. Pinkel und L. A. Donehower. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J*, 17 (16): 4657 – 4667, 1998.
- [61] G. Fingerle-Rowson, O. Petrenko, C. N. Metz, T. G. Forsthuber, R. Mitchell, R. Huss, U. Moll, W. Müller und R. Bucala. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (16): 9354 – 9359, 2003.
- [62] P. L. Olive, J. P. Banáth und R. E. Durand. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the „comet“ assay. *Radiat Res*, 122 (1): 86 – 94, 1990.
- [63] P. L. Olive und J. P. Banáth. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol*, 64 (4): 349 – 358, 1993.

- [64] G. Obe, C. Johannes und D. Schulte-Frohlinde. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis*, 7 (1): 3 – 12, 1992.
- [65] E. Morand, P. Tapley, P. Hall, L. di Nezza, T. Gilbert, Y. Yang et al. Efficacy of a novel, orally active MIF antagonist in a model of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 54 (Suppl 2): 1036, 2005.
- [66] T. M. Pawlik und K. Keyomarsi. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59 (4): 928 – 942, 2004.
- [67] Frank Lohr, Frederik Wenz, *Strahlentherapie kompakt*, 2. Auflage, 2007, Urban & Fischer, S. 309, ISBN 9783437232916.
- [68] P. L. Olive, J. P. Banáth und H. S. MacPhail. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res*, 54 (14): 3939 – 3946, 1994.
- [69] T. F. DeLaney, N. Afridi, A. G. Taghian, D. A. Sanders, N. S. Fuleihan, D. V. Faller und C. P. Noqueira. 13-cis-retinoic acid with alpha-2a-interferon enhances radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Res*, 56 (10): 2277 – 2280, 1996.
- [70] W. Hoffmann, M. A. Bläse, L. Santo-Hoeltje, C. Herskind, M. Bamberg und H. P. Rodemann. Radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells in vitro is modulated by all-trans and 13-cis-retinoic acid in combination with interferon-alpha. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 45 (4): 991 – 998, 1999.
- [71] H. Schmidberger, M. Rave-Fränk, J. Lehmann, S. Schweinfurth, E. Rehring, K. Henckel und C. F. Hess. The combined effect of interferon beta and radiation on five human tumor cell lines and embryonal lung fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 43 (2): 405 – 412, 1999.
- [72] O. Altundag, K. Altundag, P. Morandi und M. Gunduz. Cyclooxygenase-2 inhibitor and cisplatin combination as a radiosensitizer in the treatment of head and neck cancer patients. *Ann Oncol*, 15 (9): 1444 – 1445, 2004.
- [73] S. Han und J. Roman. COX-2 inhibitors suppress lung cancer cell growth by inducing p21 via COX-2 independent signals. *Lung Cancer*, 51 (3): 283 – 296, 2006.
- [74] Z. Ozsaran, D. Yalman, V. Yürüt, A. Aras, A. Ozsaran, M. Hanhan und A. Haydaroglu. Radiochemotherapy for patients with locally advanced cervical cancer: early results. *Eur J Gynaecol Oncol*, 24 (2): 191 – 194, 2003.

- [75] N. Carballo, L. González-Cortijo, A. González-Martín, A. Rojo und L. Chiva. Indications for adjuvant radiotherapy treatment after surgery and novel modalities for treatment. *Gynecol Oncol*, 110 (3 Suppl 2): S41 – S44, 2008.
- [76] F. G. Herrera, L. Vidal, A. Oza, M. Milosevic und A. Fyles. Molecular targeted agents combined with chemo-radiation in the treatment of locally advanced cervix cancer. *Rev Recent Clin Trials*, 3 (2): 111 – 120, 2008.
- [77] G. Mor, I. Visintin, Y. Lai, H. Zhao, P. Schwartz, T. Rutherford, L. Yue, P. Bray-Ward und D. C. Ward. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (21): 7677 – 7682, 2005.
- [78] H. Lee, H. Rhee, H. J. Kang, H. S. Kim, B. S. Min, N. K. Kim und H. Kim. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 129 (5): 772 – 779, 2008.
- [79] H. Camlica, D. Duranyildiz, H. Oguz, E. N. Oral und V. Yasasever. The Diagnostic Value of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res*, 14 (1): 79 – 83, 2008.
- [80] K. L. Meyer-Siegler, M. A. Bellino und M. Tannenbaum. Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 94 (5): 1449 – 1456, 2002.

7 Anhang

Tabelle 1: Gewebeproben aus Frischmaterial

	Gesund	Plattenepithel-CA	Adeno-CA
N	3	4	1
Alter (MW)	45	57	51
TNM:			
T1a		0	
T1b		1	1
T2a		1	0
T2b		2	0
Grading:			
G1		0	0
G2		2	0
G3		2	1

N = Anzahl, MW = Mittelwert, TNM = Tumorstadium

Tabelle 2: Gewebeproben zur Immunhistochemie

	Dysplasie	CIS/CIN III	Karzinom
N	32	23	25
Alter (MW)	39	42	56
TNM:			
T1a			1
T1b			10
T2a			2
T2b			7
T3a			1
T3b			3
T4			1
Grading			
G1			1
G2			13
G3			11

N = Anzahl, MW = Mittelwert, TNM = Tumorstadium