

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie, Campus Charité Mitte  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die diagnostische Validität des Macrophage Migration Inhibitory  
Factor (MIF) im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (PCa)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Michael  
aus Bernau bei Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Jung  
2. Prof. Dr. K. Miller  
3. Prof. Dr. R. Lichtinghagen

Datum der Promotion: 07.12.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>4</b>
<b>3.3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>5</b>
3.3.1	Probanden	5
3.3.2	Methoden	6
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>6</b>
3.4.1	MIF im Serum von Patienten mit PCa, BPH und gesunden Probanden	6
3.4.2	Korrelation von Serum MIF, Alter, Prostatavolumen, tPSA, CRP	7
3.4.3	Diagnostische Validität von Serum-MIF	7
3.4.4	Serum-MIF im %fPSA-basierten ANN	8
3.4.5	Elimination von Serum MIF nach Prostatektomie	8
<b>3.5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>14</b>
<b>5.1</b>	<b>Publikation 1</b>	<b>14</b>
<b>5.2</b>	<b>Publikation 2</b>	<b>17</b>
<b>5.3</b>	<b>Publikation 3</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>ANTEILSERKLÄRUNG</b>	<b>34</b>

<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>39</b>

# 1 Publikationsliste

Diese Dissertationsschrift, die im Rahmen einer Publikationspromotion verfasst wurde, bezieht sich auf die folgend genannten Veröffentlichungen:

- 1 Michael A, Stephan C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Serum macrophage migration inhibitory factor is not elevated in patients with prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:328-9.
- 2 Michael A, Stephan C, Kristiansen G et al. Diagnostic validity of macrophage migration inhibitory factor in serum of patients with prostate cancer: a re-evaluation. *Prostate* 2005;62:34-9.
- 3 Stephan C, Xu C, Brown DA et al. Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network. *Prostate* 2006;66:651-9.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

ANN	Artifiziellles neuronales Netzwerk
AUC	Area under curve
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CRP	C-reaktives Protein
DRU	Digital-rektale Untersuchung
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
fPSA	Freies prostataspezifisches Antigen
HGPIN	High-grade intraepitheliale Neoplasie der Prostata
hK11	Humanes Kallikrein 11
LR	Logistische Regression
MIC-1	Macrophage Inhibitory Cytokine 1
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostataspezifisches Antigen
tPSA	Totales prostataspezifisches Antigen
%PSA	Quotient aus freiem und totalem prostataspezifischen Antigen

# 3 Zusammenfassung

## 3.1 Abstract

Ziel der Dissertation war es zu prüfen, ob die Bestimmung des Zytokins Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) im Serum die Früherkennung des Prostatakarzinoms (PCa) verbessern kann.

In einer initialen Studie konnten wir zeigen, dass sich die Serum-MIF-Konzentrationen von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) und Probanden ohne Erkrankung der Prostata nicht unterschieden. Die MIF-Konzentration im Serum von Patienten mit PCa dagegen war signifikant erniedrigt. Allerdings wiesen die Konzentrationsbereiche aller Gruppen starke Überschneidungen auf. Die Konzentrationen von MIF und des prostataspezifischen Antigens (tPSA), dem Leitparameter der Prostatakarzinomdiagnostik, korrelierten nicht miteinander. Die erhobenen Ergebnisse standen im Gegensatz zu einer Studie einer anderen Arbeitsgruppe, sodass wir in einer zweiten Studie weitere Untersuchungen durchführten.

Die Ergebnisse der zweiten Publikation bestätigten unsere Beobachtungen. Auch in Untergruppen nach TNM-Staging und WHO-Grading zeigten sich erniedrigte Serum-MIF-Werte. MIF erwies sich nicht nur unabhängig vom tPSA, sondern auch vom Patientenalter, Prostatavolumen und C-reaktiven Protein (CRP). Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analysen mit MIF und MIF-abhängigen Variablen erbrachten keine Verbesserung von Sensitivität oder Spezifität im Vergleich zum tPSA. Die Eliminationskinetik von MIF im Serum nach Prostatektomie korrespondierte nicht mit der des tPSA. Dies kann als ein eindeutiger Hinweis gewertet werden, dass die Höhe der MIF-Konzentrationen nur zu einem bestimmten Teil durch die Prostata beeinflusst werden

In einer weiteren Studie wurde der Parameter Serum-MIF zusammen mit 2 weiteren potentiellen PCa-Biomarkern (Kallikrein 11, Makrophagen-Inhibitions-Cytokin 1) in ein artifizielles neuronales Netzwerk (ANN) integriert, das auf der Basis des diagnostischen Validität des freien PSA (fPSA) entwickelt wurde. Obwohl MIF als Einzelparameter die geringste diagnostische Validität aufwies, verbesserte der Einschluss dieses Markers in das ANN die Diskriminationsfähigkeit zwischen Karzinom- und Nichtkarzinompatienten und reduzierte die Anzahl unnötiger Prostatabiopsien. Das Potential des Serum-MIF's im ANN ergab sich vor allem durch seine Unabhängigkeit gegenüber den anderen Markern.

### 3.2 Einleitung und Zielstellung

Das Prostatakarzinom (PCa) gehört zu den häufigsten bösartigen Tumoren des Mannes insgesamt und steht an erster Stelle bei den urologischen Malignomen [1]. Mit steigendem Alter nimmt seine Häufigkeit zu. Da das PCa bedingt durch sein meist dezentrales Wachstum im Frühstadium nur selten Beschwerden macht, eine dauerhafte Heilung jedoch nur bei Diagnose im frühen Stadium möglich ist, sind Vorsorgeuntersuchungen sinnvoll. Die digital-rektale Untersuchung (DRU), die transrektale Sonographie und die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) sind die drei wesentlichen Säulen in der PCa-Diagnostik [2-4]. Diese Untersuchungen sind die Basis für die Entscheidung, eine Prostatastanzbiopsie durchzuführen. Das PSA sowie vor allem die differenzierte Erfassung der molekularen Formen des PSA und der daraus resultierende Quotient von freiem PSA (fPSA) zu tPSA, in der Literatur als prozentuales PSA (%fPSA) bezeichnet, haben sich bisher als beste diagnostische Marker erwiesen [5-9]. Trotz der bereits erreichten Erfolge treten bei Anwendung der etablierten Methoden eine große Zahl falsch-positiver Biopsieergebnisse (65%) auf [10]. Einer der Gründe dafür ist sicherlich, dass PSA zwar weitgehend prostata-, aber nicht tumorspezifisch ist. So werden auch bei gutartigen Veränderungen der Prostata, wie benigner Prostatahyperplasie (BPH) oder chronischer Prostatitis, erhöhte PSA-Werte gemessen [10-12]. Die BPH ist wie das PCa eine häufige urologische Erkrankung, die mit steigendem Alter in ihrer Häufigkeit zunimmt. Insbesondere bei niedrig erhöhten PSA-Werten zwischen 4 und 10 µg/l, dem sogenannten Graubereich des PSA, ist eine Unterscheidung zwischen BPH und PCa ohne Biopsie nicht möglich. Um die Anzahl von Biopsieuntersuchungen zu verringern, die für den Patienten unangenehm sind und sehr hohe Kosten verursachen, nimmt die Suche nach neuen Biomarkern und Methoden zur Evaluation der Daten einen großen Stellenwert in der Forschung ein.

Ein neuer vielversprechender Biomarker schien das Zytokin Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) zu sein. MIF ist neben der Regulation der Immunantwort auch in Prozesse der Karzinogenese involviert, wie der Inhibition von Tumorsuppressorgenen, Proliferation und Angiogenese [13]. Erhöhte MIF-Expressionen auf mRNA- und Proteinebene wurden im Prostatakarzinomgewebe beschrieben [14,15]. Im Serum von Patienten mit PCa fanden sich erhöhte MIF-Konzentrationen [16].

Ausgehend von dieser Studie von Meyer-Siegler et al. [16] führten wir eine Fall-Kontroll-Studie durch. Unser Ziel war es zunächst, herauszufinden, ob sich Serum MIF für ein fPSA-basiertes artifizielles neuronales Netzwerk (ANN) eignet [Publikation 1]. Die erhobenen Daten standen im Gegensatz zur Arbeit von Meyer-Siegler et al., sodass wir weitere Untersuchungen



durchführten. Darin wollten wir klären, ob Serum-MIF im Vergleich zu den bisherigen Leitparametern tPSA und %fPSA die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Prostataerkrankungen verbessern kann [Publikation 2]. In der 3. Publikation wurde geprüft, ob in einem fPSA-basierten ANN durch Hinzunahme des Markers Serum-MIF zusammen mit zwei weiteren Biomarkern die diagnostische Aussagekraft des ANN verbessert werden kann.

### **3.3 Material und Methoden**

#### **3.3.1 Probanden**

Die Arbeit wurde an einer Population von 511 Männern vorgenommen, die zwischen 1999 und 2002 im Rahmen einer Studie über den diagnostischen Nutzen artifiziieller neuronaler Netzwerke bei PCa ausgesucht wurden [17]. Die Studie umfasste 175 Patienten mit PCa (Alter: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $64,0 \pm 6,4$  Jahre), 250 Patienten mit BPH ( $67,8 \pm 7,6$  Jahre) und 86 Männer ohne Erkrankungen der Prostata in der Vorgeschichte, frei von BPH-Symptomen und unauffälliger digital-rektaler Untersuchung ( $56,4 \pm 12,9$  Jahre). Ausschlusskriterien waren in allen Fällen Infektionszeichen, gastrointestinale, kardiale oder renale Erkrankungen, Tumoren oder immunologische Erkrankungen. Die Diagnose PCa bzw. "kein Anzeichen von Malignität in der Prostata" (im Folgenden vereinfacht als BPH aufgeführt) wurde jeweils histopathologisch bestätigt. Alle Serumproben wurden vor jeglicher diagnostischer bzw. therapeutischer Prozedur bzw. mindestens 4 Wochen nach diagnostischer Intervention gewonnen. Bei 5 PCa-Patienten, die sich einer radikalen laparoskopischen Prostatektomie unterzogen, wurden im postoperativen Verlauf die Eliminationskinetiken von MIF sowie zum Vergleich von PSA bestimmt.

In den Veröffentlichungen wurden jeweils nur die Probanden mit vollständigen Datensätzen berücksichtigt, die u.a. aus der Anzahl der archivierten Proben resultierten. Daraus ergeben sich die Unterschiede in den Probandenzahlen in den drei Studien bzw. Veröffentlichungen.

Es wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  archivierte, unaufgetaute Proben verwendet. Die Studie wurde entsprechend den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Charité genehmigt. Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Krebshilfe (Kennzeichen 70-3295-ST1) sowie der Berliner Sparkassenstiftung Medizin unterstützt.

### **3.3.2 Methoden**

Die Bestimmung der Serum-MIF-Konzentration erfolgte mittels eines Sandwich-ELISA (DuoSet®, DY 289, R&DSystems, Minneapolis, USA) wie in Publikation 2 beschrieben [18]. Der interserielle Variationskoeffizient betrug 12.5 %. Totales und freies PSA wurden mit IMMULITE PSA Kits gemessen (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, USA). CRP wurde am Modular-Analytik-System bestimmt (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Das Prostatavolumen wurde durch transrektalen Ultraschall mit der Formel (Höhe x Weite x Länge x 0.52) errechnet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS, Version 11.5 für Windows (SPSS, Inc., Chicago, USA), GraphPadPrism, Version 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) und MedCalc 7.2.0.2 bzw. 8.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien).  $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$  für Korrelationsanalysen wurden als statistisch signifikant angesehen.

## **3.4 Ergebnisse**

### **3.4.1 MIF im Serum von Patienten mit PCa, BPH und gesunden Probanden**

Die im Serum von gesunden Männern ( $n=86$ ) und BPH-Patienten ( $n=250$ ) gemessenen MIF-Konzentrationen unterschieden sich nicht (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $2,08 \pm 1,08$   $\mu\text{g/l}$  versus  $2,04 \pm 1,08$   $\mu\text{g/l}$ ). Dagegen waren die Serum-MIF-Mittelwerte der PCa-Patienten ( $n=175$  bzw.  $n=163$ ) im Vergleich zur BPH-Gruppe signifikant erniedrigt ( $1,66 \pm 1,15$  bzw.  $1,77 \pm 1,12$   $\mu\text{g/l}$ ,  $P=0,001$  bzw.  $P=0,016$ ). Die Konzentrationsbereiche der Gruppen überlappten sich stark [Publikation 1 bzw. 2]. Die statistische Power (Schärfe:  $1-\beta$ -Fehler) betrug circa 85 %, um bei einer Signifikanz von 5% einen Unterschied von  $0,03$   $\mu\text{g/l}$  zwischen PCa- ( $n=175$ ) und BPH-Patienten ( $n=250$ ) nachzuweisen [Publikation 1].

Die Gruppe der PCa-Patienten ( $n=163$ ) wurde entsprechend der TNM-Klassifikation (T1:  $n=16$ , T2:  $n=91$ , T3:  $n=55$ , T4:  $n=1$ ) und der WHO-Grading-Skala (G1:  $n=8$ , G2:  $n=96$ , G3:  $n=59$ ) in Subgruppen unterteilt. Auch in den Subgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (ANOVA-Test,  $P$  zwischen  $0,140$  und  $0,857$ ), außer im Vergleich T1 gegen T2 ( $P=0,044$ ). Die Subgruppenanalyse bestätigte die erniedrigten Serum-MIF-Werte der gesamten PCa-Gruppe. Es wurden nur Patienten mit unbehandeltem, nicht metastasierten Prostatakrebs berücksichtigt, sodass dieses Ergebnis nicht auf hormonelle Behandlung oder Metastasierung zurückzuführen ist [Publikation 2]. Die Daten aus Publikation 1 unterstützen dieses Ergebnis. Die PCa-Patienten mit Metastasen unterschieden sich nicht von den PCa-Patienten ohne Metastasen ( $P=0,413$ ).

### 3.4.2 Korrelation von Serum MIF, Alter, Prostatavolumen, tPSA, CRP

Die Altersverteilung der Patienten mit BPH sowie der gesunden Kontrollgruppe war mit der der PCa-Patienten vergleichbar. Alter und Serum-MIF zeigten keine Korrelation ( $r_s = 0,05$ ).

Das Prostatavolumen war bei 344 Probanden bekannt. Die Serum-MIF-Konzentration korrelierte nicht mit dem Prostatavolumen ( $r_s = 0,069$ ,  $P=0,203$ ). Die Gruppenanalysen ergaben ebenfalls keine Korrelation (Gesunde:  $r_s = -0,159$ ,  $P=0,468$ ,  $n=23$ ; BPH:  $r_s = 0,031$ ,  $P=0,678$ ,  $n=183$ ; PCa:  $r_s = 0,115$ ,  $P=0,180$ ,  $n=138$ ) [Publikation 2].

Zwischen Serum-MIF und tPSA konnte weder insgesamt noch in den einzelnen Gruppen eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (gesamt:  $r_s = -0,049$ ,  $P=0,271$ ,  $n=499$ ; Gesunde:  $r_s = 0,087$ ,  $P=0,425$ ,  $n=86$ ; BPH:  $r_s = 0,056$ ,  $P=0,376$ ,  $n=250$ ; PCa:  $r_s = -0,023$ ,  $P=0,773$ ,  $n=163$ ). Bezugnehmend auf Meyer-Siegler et al. [16] wurden die PCa-Patienten nach ihren tPSA-Werten (PCa: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $6,65 \pm 7,9 \mu\text{g/l}$ ,  $n=163$ ) unterteilt. Der tPSA-Wert von  $4 \mu\text{g/l}$  wurde als Grenze definiert. Im Unterschied zu Meyer-Siegler et al. war in der Gruppe mit hohen tPSA-Werten keine Korrelation zwischen tPSA und MIF feststellbar ( $r_s = -0,082$ ,  $P=0,328$ ,  $n=146$ ), wohingegen in der Gruppe mit niedrigem tPSA eine schwache Korrelation nachweisbar war ( $r_s = 0,488$ ,  $P=0,047$ ,  $n=17$ ). Aus den nach tPSA unterteilten PCa-Patienten wurden weiterhin entsprechend Meyer-Siegler et al. anhand eines MIF-Grenzwertes von  $3,5 \mu\text{g/l}$  4 Gruppen gebildet. Obwohl zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede nachweisbar waren [siehe Publikation 2], war ein weiterer Nutzen dieser Aufteilung nicht erkennbar. Beispielsweise erfüllten nur 2 Patienten die Kriterien für die Gruppe niedriges tPSA/ hohes MIF, die von Meyer-Siegler et al. als Risikogruppe definiert wurde.

Zwischen Serum-MIF und CRP bestand keine Korrelation (BPH:  $r_s = 0,158$ ,  $P=0,259$ ; PCa:  $r_s = 0,292$ ,  $P=0,064$ ).

### 3.4.3 Diagnostische Validität von Serum-MIF

Zur Überprüfung der diagnostischen Validität von Serum-MIF wurden Receiver-Operating-Characteristics-(ROC)-Analysen durchgeführt. Diese bestätigten, dass weder MIF als einzelner Parameter noch die MIF-abhängigen Variablen MIF/tPSA; fPSA/(tPSA x MIF); (fPSA x MIF)/tPSA die Sensitivität oder Spezifität von tPSA verbessern. Die ROC-Kurve von MIF/tPSA ähnelte dem Kurvenverlauf von %fPSA, erreichte jedoch eine geringere "area under the curve" (AUC). In der zusätzlich berechneten logistischen Regression (LR) mit MIF, tPSA, fPSA/tPSA, MIF/tPSA, (fPSA x MIF)/tPSA und fPSA/(tPSA x MIF) verblieben sowohl mit der

Vorwärts- als auch Rückwärtselimination nur die Variablen tPSA, %fPSA und MIF/tPSA im Modell zur besseren Unterscheidung zwischen BPH und PCa [Publikation 2].

#### **3.4.4 Serum-MIF im %fPSA-basierten ANN**

Im Rahmen der Entwicklung eines %fPSA-basierten ANN wurde der Nutzen von Serum-MIF sowie zwei weiterer neuer Biomarker (Macrophage Inhibitory Cytokine 1, MIC-1; humanes Kallikrein 11, hK11) überprüft. Für das ANN wurden innerhalb der BPH- und PCa-Gruppe jeweils 4 Subgruppen nach unterschiedlichen tPSA-Bereichen sowie nach Verfügbarkeit des Prostatavolumens gebildet. tPSA, %fPSA, Alter und MIC-1 zeigten signifikante Unterschiede der Medianwerte zwischen PCa und BPH in allen 4, hK11 in allen 3 Gruppen. Serum-MIF erreichte lediglich in der Gruppe tPSA 0,5 – 20 µg/l ohne Prostatavolumen eine Grenzsignifikanz ( $P=0,045$ , BPH: Median MIF = 0,204 µg/l,  $n=235$ ; PCa: Median MIF = 0,159 µg/l,  $n=136$ ).

ROC-Analysen wurden in allen Gruppen für alle verfügbaren Parameter sowie ANN- und LR-Modelle durchgeführt. Keiner der neuen Marker MIF, MIC-1, hK11 schnitt besser ab als tPSA oder %fPSA ( $P<0,0001$ ), ausser MIC-1 in der Gruppe tPSA 2 – 10 µg/l mit Prostatavolumen. Analysiert man alle Daten in der Gruppe tPSA 0,5 – 20 µg/l ohne Prostatavolumen, so sind MIC-1 und hK11 gleichwertig ( $P=0,9$ ) und signifikant besser als MIF ( $P=0,022$  und  $P=0,009$ ).

Das ANN-Modell ergab mit allen verfügbaren Faktoren (tPSA, %fPSA, Alter, hK11, MIC-1, MIF) eine AUC von 0,843. Der Ausschluss der von MIF, MIC-1, hK11 oder tPSA ergab ähnliche AUC's von 0,842 bis 0,858. Ausschluss von %fPSA senkte die AUC deutlich auf 0,8 [Publikation 3].

#### **3.4.5 Elimination von Serum MIF nach Prostatektomie**

Um den direkten Zusammenhang zwischen Serum-MIF und der Prostata zu demonstrieren, wurden MIF, PSA und CRP als Entzündungsmarker in Serumproben von 5 PCa-Patienten gemessen, die nach laparoskopischer Prostatektomie nach 15 Min, 2 ,5 ,24 und 72 Stunden abgenommen wurden. Während tPSA wie erwartet kontinuierlich und regelmäßig abfiel, wurden bei den Serum-MIF-Werten nach initialem Abfall auch Anstiege beobachtet. Die CRP-Werte blieben relativ konstant und stiegen nicht vor 6 Stunden nach Abschluss der Operation an. CRP und MIF waren negativ miteinander korreliert ( $r_s = -0,560$ ,  $P=0,001$ ) [Publikation 2].

### 3.5 Diskussion

Diese Arbeit hatte das Ziel zu überprüfen, ob Serum-MIF in der Lage ist, die Unterscheidung zwischen gut- und bösartigen Erkrankungen der Prostata zu erleichtern und somit die Zahl unnötiger Biopsien zu reduzieren.

Erhöhte Serum-MIF-Konzentrationen bei Patienten mit Prostatakarzinom in einer Arbeit von Meyer-Siegler et al. sowie Ergebnisse über MIF mRNA und Protein in der Prostata stützten die Hypothese von Serum-MIF als potentiellen Biomarker [14-16,19]. MIF mRNA konnte im Karzinomgewebe der Prostata im Vergleich zu gesundem Gewebe vermehrt nachgewiesen werden, wobei die Konzentration des MIF-Proteins erniedrigt war [14,16]. Daher wurde davon ausgegangen, dass nicht nur Expression und Produktion, sondern auch die Sekretion von MIF gesteigert ist, was erhöhte MIF-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Prostatakarzinom verursachen könnte.

Diese Hypothese von erhöhten Serum-MIF-Konzentrationen bei Patienten mit Prostatakarzinom bestätigte sich nicht. Wir fanden Konzentrationen, die im Vergleich mit denen von BPH-Patienten und Männern ohne Prostataerkrankungen signifikant erniedrigt waren. Patienten mit BPH und Männer ohne Erkrankung der Prostata wiesen keine Unterschiede in der Serum-MIF-Konzentration auf. Da sich die Konzentrationsbereiche aller untersuchten Gruppen stark überschneiden, ergab sich aus den signifikant niedrigeren MIF-Werten der PCa-Gruppe keine diagnostische Relevanz.

Eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der der Gruppe von Meyer-Siegler et al. [16] kann bisher nicht gegeben werden. Da beide Arbeitsgruppen den gleichen ELISA von R&D Systems nutzten, sind analytische Gründe weitestgehend ausgeschlossen. Unter Umständen könnten die voneinander abweichenden Ergebnisse auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Patienten, insbesondere hinsichtlich TNM-Staging und WHO-Grading, zurückzuführen sein. Untersuchungen an Prostatakarzinomgewebe in verschiedenen Tumorstadien sowie Metastasengewebe zeigten eine Abhängigkeit der MIF-Proteinexpression von der Tumordifferenzierung [14,15,19]. Daher könnte Serum-MIF ebenso abhängig von der Tumordifferenzierung sein. Betrachtet man die Subgruppenanalysen, spricht jedoch wenig für diese Vermutung. Es zeigten sich, bis auf eine geringe Signifikanz zwischen T1 und T2, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die erniedrigten MIF-Werte im Serum von PCa-Patienten sind demnach möglicherweise auf die komplexe Biologie der Tumorzytokinproduktion zurückzuführen. Beispielsweise treten beim Prostatakarzinom ebenfalls niedrige Serumspiegel von MIC-1 auf. MIC-1 wird als

Propeptid vom Tumor sezerniert und eng an die extrazelluläre Matrix gebunden, sodass die Diffusion in den Kreislauf eingeschränkt ist. Mit steigenden Gleasongraden ändert sich das Verhältnis zugunsten des MIC-1 im Serum [20]. Ähnliche komplex regulierende Faktoren wären auch für MIF vorstellbar.

Des Weiteren war weder insgesamt noch in den einzelnen Gruppen eine Korrelation zwischen Serum-MIF und tPSA nachweisbar ( $r_s = -0,049$ ,  $n = 499$ ). In der Studie von Meyer-Siegler et al. korrelierte Serum-MIF stark mit tPSA ( $r_s = 0,61$ ,  $n = 509$ ). Von den 509 Patienten hatten nur 61 ein histologisch gesichertes PCa bzw. 7 eine high-grade intraepitheliale Neoplasie (HGPIN). Der überwiegende Teil der Patienten gehörte zu den beiden Kontrollgruppen (BPH:  $n = 84$ , Gesunde:  $n = 357$ ) [16], was die Interpretation der Daten erschwert.

Eine Stratifizierung anhand von Serum-MIF und tPSA ergab keine Risikogruppen, wie bei Meyer-Siegler et al. [16] beschrieben. Dies war allerdings auf Grund der entgegengesetzten Ergebnisse, von denen die Stratifizierung der Subgruppen ausging, zu erwarten.

Serum-MIF und tPSA fielen beide nach Prostatektomie, jedoch waren unterschiedliche Eliminationskinetiken zu beobachten. Das tPSA fiel kontinuierlich, während Serum-MIF teilweise anstieg. Es erscheint einleuchtend, dass die beobachteten Veränderungen vermutlich durch andere Veränderungen mitbedingt sind, da Serum-MIF weder organ- noch tumorspezifisch ist [21-23].

Da MIF essentiell in die Regulation der Immunantwort involviert ist [14], bestimmten wir CRP im Serum als Entzündungsmarker, obwohl Infektionen ein Ausschlusskriterium darstellten. CRP und MIF zeigten in den einzelnen Gruppen keine Korrelation und waren nach Prostatektomie sogar negativ korreliert.

Nicht nur mit tPSA, auch mit %fPSA, Alter, Prostatavolumen sowie zwei weiteren potentiellen Biomarkern MIC-1 und hK11 wies Serum-MIF keine Korrelation auf. Gerade diese Unabhängigkeit von Serum-MIF könnte von Bedeutung sein, wenn man diesen Biomarker in ein ANN einsetzt. Eine andere Studie konnte bereits zeigen, dass ANN's, in diesem Fall bestehend aus tPSA, %fPSA, Alter, Prostatavolumen und Status der digital rektalen Untersuchung (DRU), im Vergleich zu tPSA und %fPSA die Anzahl unnötiger Biopsien signifikant verringert [17]. Das %fPSA-basierte ANN mit MIF unter Einschluss der beiden anderen neuen Marker MIC-1 und hK11 funktionierte signifikant besser als tPSA und %fPSA allein [24]. Obwohl Serum-MIF den geringsten Nutzen der neuen Biomarker mit einer kleineren AUC und geringeren Spezifität verglichen mit tPSA und %fPSA aufwies, verbessert es auf Grund seiner Unabhängigkeit im ANN die diagnostische Aussagekraft.

Zusammenfassend lässt sich somit konstatieren, dass Serum-MIF als einzelner Parameter ungeeignet ist, zwischen benignen und malignen Prostataerkrankungen zu unterscheiden. Ein Einschluss von MIF als zusätzlicher Parameter in ein PSA-basiertes ANN kann aufgrund der Unabhängigkeit von MIF gegenüber PSA die diagnostische Aussagekraft verbessern und damit die Anzahl unnötiger Prostatabiopsien verringern helfen.

## 4 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-30.
2. Brawer MK. Screening for prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 29-36.
3. Roscigno M, Scattoni V, Bertini R, Pasta A, Montorsi F, Rigatti P. Diagnosis of prostate cancer. State of the art. *Minerva Urol Nefrol* 2004; 56: 123-45.
4. Solivetti FM, Bacaro D, De MA, Coscarella G, Cecconi P. Our experience in transrectal ultrasonography and biopsy in carcinoma of the prostate. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 389-93.
5. Catalona WJ, Partin AW, Finlay JA et al. Use of percentage of free prostate-specific antigen to identify men at high risk of prostate cancer when PSA levels are 2.51 to 4 ng/mL and digital rectal examination is not suspicious for prostate cancer: an alternative model. *Urology* 1999; 54: 220-4.
6. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery - what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999; 162: 293-306.
7. Canto EI, Shariat SF, Slawin KM. Molecular diagnosis of prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2004; 5: 203-11.
8. Pelzer AE, Volgger H, Bektic J et al. The effect of percentage free prostate-specific antigen (PSA) level on the prostate cancer detection rate in a screening population with low PSA levels. *BJU Int* 2005; 96: 995-8.
9. Rowe EW, Laniado ME, Walker MM, Patel A. Prostate cancer detection in men with a 'normal' total prostate-specific antigen (PSA) level using percentage free PSA: a prospective screening study. *BJU Int* 2005; 95: 1249-52.
10. Stephan C, Jung K, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1133-47.
11. Kawakami J, Siemens DR, Nickel JC. Prostatitis and prostate cancer: implications for prostate cancer screening. *Urology* 2004; 64: 1075-80.
12. Postma R, Schroder FH. Screening for prostate cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 825-33.
13. Mitchell RA, Bucala R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 359-66.
14. del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F et al. Macrophage migration inhibitory factor in



- prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* 2000; 45: 51-7.
15. Meyer-Siegler K, Fattor RA, Hudson PB. Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7: 44-50.
  16. Meyer-Siegler KL, Bellino MA, Tannenbaum M. Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1449-56.
  17. Stephan C, Cammann H, Semjonow A et al. Multicenter evaluation of an artificial neural network to increase the prostate cancer detection rate and reduce unnecessary biopsies. *Clin Chem* 2002; 48: 1279-87.
  18. Michael A, Stephan C, Kristiansen G et al. Diagnostic validity of macrophage migration inhibitory factor in serum of patients with prostate cancer: a re-evaluation. *Prostate* 2005; 62: 34-9.
  19. Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 1996; 48: 448-52.
  20. Bauskin AR, Brown DA, Junankar S et al. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 2005; 65: 2330-6.
  21. Akbar SM, Abe M, Murakami H et al. Macrophage migration inhibitory factor in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis; relevance to pathogenesis. *Cancer Lett* 2001; 171: 125-32.
  22. Isidori AM, Kaltsas GA, Korbonits M et al. Response of serum macrophage migration inhibitory factor levels to stimulation or suppression of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in normal subjects and patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1834-40.
  23. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 337-43.
  24. Stephan C, Xu C, Brown DA et al. Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network. *Prostate* 2006; 66: 651-9.

# 5 Publikationen

## 5.1 Publikation 1

Michael A, Stephan C, Schnorr D, Loening SA, Jung K

**Serum macrophage migration inhibitory factor is not elevated in patients with prostate cancer**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:328-9

## **5.2 Publikation 2**

Michael A, Stephan C, Kristiansen G, Burckhardt M, Loening SA, Schnorr D

### **Diagnostic validity of macrophage migration inhibitory factor in serum of patients with prostate cancer: a re-evaluation**

Prostate 2005;62:34-9

### **5.3 Publikation 3**

Stephan C, Xu C, Brown DA, Breit SN, Michael A, Nakamura T, Diamandis EP, Meyer H,  
Cammann H, Jung K

#### **Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network**

Prostate 2006;66:651-9

## 6 Anteilserklärung

Für die Publikationspromotion von Frau **Anja Michael** "Die diagnostische Validität des Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (PCa)" wird Frau Michael folgende Beteiligung an den drei Publikationen und den damit verbundenen Forschungsarbeiten bestätigt:

Publikation 1: Michael A, Stephan C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Serum macrophage migration inhibitory factor is not elevated in patients with prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 ;13:328-9.

60 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Vorbereitung und Durchführung der Versuche zum quantitativen Nachweis von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Patientenseren mittels Sandwich-ELISA.  
Statistische Auswertung der erhobenen Messwerte.  
Verfassen des Artikels.

Publikation 2: Michael A, Stephan C, Kristiansen G, Burckhardt M, Loening SA, Schnorr D, Jung K. Diagnostic validity of macrophage migration inhibitory factor in serum of patients with prostate cancer: a re-evaluation. *Prostate.* 2005 ;62:34-9.

55 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Vorbereitung und Durchführung der Versuche zum quantitativen Nachweis von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Patientenseren mittels Sandwich-ELISA.  
Statistische Auswertung der erhobenen Messwerte.  
Verfassen des Artikels.

Publikation 3: Stephan C, Xu C, Brown DA, Breit SN, Michael A, Nakamura T, Diamandis EP, Meyer H, Cammann H, Jung K. Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network. Prostate. 2006 ;66:651-9.

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Vorbereitung und Durchführung der Versuche zum quantitativen Nachweis von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Patientenseren mittels Sandwich-ELISA.

Berlin, den 14.05.2007

---

Prof. Dr. med. K. Jung

---

Anja Michael

# 7 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Jung für die Betreuung der Arbeit in ihren Höhen und Tiefen. Seien es Planung, Experimente, Statistik oder Publikationen, in jeder Phase konnte ich auf seine Erfahrung und seinen Rat bauen. Vielen Dank auch für Ihr Vertrauen und ihre Geduld in schwierigen Phasen der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team der urologischen Forschung bedanken. Das gute Arbeitsklima und die unkomplizierte Integration weiß ich sehr zu schätzen. Jeder von ihnen stand mir bei Bedarf mit Rat und Tat zur Seite. Silke Klotzek möchte ich hierbei namentlich nennen. Sie hat mich während des gesamten experimentellen Teils betreut und dabei in Tricks und Kniffe der Laborarbeit eingeweiht, ohne die sicher Vieles komplizierter gewesen wäre.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie. Danke an meine Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben. Den Beruf zu erlernen, für den mein Herz schlägt, bedeutet mir sehr viel. Ich möchte mich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Lebensgefährten und meinen Freunden bedanken für das offene Ohr, die tröstende Schulter zum Anlehen, das ermunternde Wort und so vieles mehr. Ihr habt mir den Rücken freigehalten und gestärkt.

## **8 Lebenslauf**

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





## 9 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Anja Michael, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Diagnostische Validität des Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) im Serum bei Patienten mit Prostatakarzinom (PCa)“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 14.05.2007

---

Anja Michael