

Medizinische Fakultät der Universität Ulm

Bereich: Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. Rottbauer

**Macrophage migration inhibitory factor führt in humanen
Endothelzellen zur Aktivierung der SRC-Kinase, der PI-3-
Kinase und des MAP-Kinase Signalwegs**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Denise Retzmann

Buch

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniel Walcher
2. Berichtersatter: Prof. Dr. Lars Bullinger
Tag der Promotion: 17.12.2015

Meiner Mutter Cornelia Retzmann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Atherosklerose	1
1.2. Endotheliale Dysfunktion	7
1.3. Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	10
1.4. Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Substanzen und Lösungen	16
2.2. Antikörper	18
2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.4. Zellkultivierung	19
2.5. Stimulation der Zellen	20
2.5.1. Konzentrationsabhängigkeit	21
2.5.2. Zeitabhängigkeit	21
2.5.3. Inkubation	21
2.6. Ernten der Endothelzellen und Lyse der Zellen	21
2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration	22
2.8. Western Blot	22
2.8.1. Herstellung eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels	22
2.8.2. Elektrophorese	23
2.9. Blotten	24
2.10. Markierung der ERK- und der SRC-Kinase mittels spezifischer Antikörper	24
2.11. Chemolumineszenz	24
2.12. Stripping	25
2.13. Phosphatidylinositolkinaseassay	25
2.14. Statistik	25

3. Ergebnisse	26
3.1. MIF steigert konzentrationsabhängig die Aktivierung von p-ERK	26
3.2. MIF fördert zeitabhängig die Aktivierung von p-ERK	28
3.3. MIF fördert zeitabhängig die Aktivierung von p-SRC	30
3.4. MIF aktiviert die PI3-Kinase in humanen Endothelzellen	32
4. Diskussion	34
4.1. MIF	34
4.2. Aktivierung der SRC-Kinasen	37
4.3. PI3-Kinasen Signalweg	40
4.4. Aktivierung der ERK-Kinasen	41
4.5. Bedeutung für die Atherosklerose	42
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis	46
Danksagung	66
Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Proteinkinase B
AP-1	activator protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 antagonist of celldeath
BCA	Bicinchoninsäure
Blk	B-cell-lymphocyte kinase
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CALC	Cystein-Alanin-Leucin-Cystein-Gruppe
CML	Chronische myeloische Leukämie
c-myc	Myelocytomatose assoziiertes Gen
COP9	Constitutive photomorphogenesis 9
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
Ca.	Circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD 44/74	Cluster of Differentiation 44/74
CHMI	5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat-Isomerase
Co	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cox2	Cyclooxygenase 2
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cu ⁺ /Cu ²⁺	einfach / zweifach oxidiertes Kupfer

ECGS/H	Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin
EDRF	Endothelial Dependent Relaxation Factor
e.g.	exempli gratia
EGF	Epidermal Growth Factor
Elk-1	ETS domain-containing protein
eNOS	endotheliale Stickstoff-Synthase
ERK	extracellular signal-regulated Kinase
et al.	et alii (und andere)
FCS	fetal calf serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fgr	Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-protein-coupled receptor
Grb	Growth factor receptor-bound protein
H ₂ O	Wasserstoffoxid
hbFGF	human basic Fibroblast Growth Factor
HC	human Chondrocytes
Hck	hemopoietic cell Kinase
HCl	Chlorwasserstoff
hEGF	Human Epidermal Growth Factor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule1
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
Jab1	c-Jun activation domain-binding protein-1
L	Liter
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosin kinase
LDL	low density lipoprotein

LDLR	low density lipoprotein receptor
LPS	Lipopolysaccachid
M	Einheit der molekularen Masse
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein-kinase
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
Min	Minute
ml	Milliliter
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MMP-1/-13	Matrix metalloproteinase-1/-13
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NIH 3T3	mouse embryonic fibroblasts
nm	Newtonmeter
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonoxinol 40
O ₂	molekularer Sauerstoff
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
p21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
p27 ^{Kip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	tumor-suppressor-53
PAG	Phosphoprotein associated with Glycosphingolipid-enriched microdomains

PBS	phosphate buffered saline
PC12	Phäochromocytom 12
PDK1/2	Phosphatidylinositol-dependent Kinase1/2
pH	potentia hydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PH-Domäne	Pleckstrin-homology domain
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP	1-Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p-Wert	Signifikanzwert, p von probability
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rapidly accelerated sarcoma
RPM	rounds per minute
Rsk	Ribosomal s6 Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
sE-Selektin	Endothelzell-Selektin
Ser	Serin
SH2-Domäne	src-homology 2-Domäne
SOS	Son of sevenless
SPEA	Streptococcal pyrogenic exotoxin A
SRC	Sarcoma/proto-oncogenic tyrosine Kinase
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline tween
Thr	Threonin
TLC	thin layer chromatography
Temed	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TSST-1	Toxic shock syndrome toxine-1

Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
VCAM1	vascular cell adhesion protein1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World health organization
Y527	Tyrosinrest 527
Yes	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
Yrk	Yes-related kinase
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

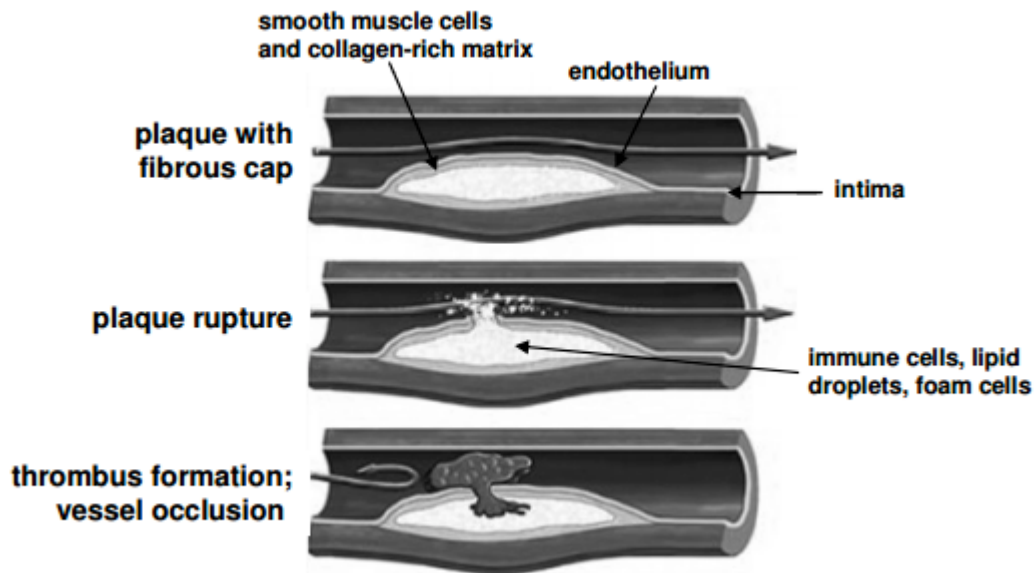
Der Begriff Arteriosklerose wurde 1833 von Lobstein geprägt und wie folgt beschrieben: Nom compose d'artère et de sclerosis, épaissement avec induration [52, 66]. Die Arteriosklerose ist eine Erkrankung, welche einen Hauptanteil zur Pathogenese des Myokardinfarkts, des ischämischen Hirninfarkts sowie der Gangrän der Extremitäten beiträgt [48, 118]. Heute wird der von Marchand geprägte Begriff Atherosklerose im Allgemeinen bevorzugt. Ein Nachteil dieses Begriffs liegt darin, dass das Atherom und die Induration bei frühen Formen fehlen [66].

Die Atherosklerose wird laut World Health Organisation definiert, als eine Kombination von morphologischen Veränderungen der Arterienintima, welche mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, sowie der Bildung fibrösen Gewebes und Kalkablagerungen einhergeht [148].

In den westlichen Industriestaaten haben aktuell Atherosklerose und atherosklerotische Intimaverkalkung mit ihren Folgeerkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, plötzlicher Herztod, zerebrale Insulte und periphere arterielle Verschlusskrankheit eine höhere Morbidität und Mortalität, als jede andere Erkrankung [42, 83, 147]. Derzeit lassen sich in Deutschland mehr als 45% aller Todesfälle direkt oder indirekt auf sie zurückführen [111].

Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen jahrzehntelangen chronischen Prozess multifaktorieller Ursache [31, 56, 144]. Meist treten erste klinische Manifestationen in der dritten bis vierten Lebensdekade auf, wobei die Erkrankung schon im Kindesalter entstehen kann. Hauptrisikofaktoren, die Atherosklerose begünstigen, sind Bluthochdruck, Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Bewegungsmangel, Gicht und negativer Stress [87]. Weitere Faktoren, welche das Risiko der Gefäßwunderkrankung deutlich erhöhen, sind das männliche Geschlecht, fortgeschrittenes Alter sowie genetische und konstituelle Faktoren [1, 31, 62].

Zudem spielt die Parodontitis eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Ätiologie der Atherosklerose, denn parodontitsassoziierte Mikroorganismen konnten in Gefäßwandpräparaten nachgewiesen werden [96].



Reproduced with permission from [57], Copyright Massachusetts Medical Society.

Abbildung 1: Plaque-Ruptur. Atherosklerotische Läsionen entstehen unter dem Endothel der innersten Schicht der Gefäßwand, der Intima. Sie bestehen aus Entzündungs- und Immunzellen, Bindegewebszellen, Lipiden und Zelltrümmern. Das Zentrum eines Atheroms setzt sich zusammen aus Lipidtröpfchen, Immunzellen sowie Schaumzellen. Aktivierte Immunzellen sezernieren Proteasen, Gerinnungsfaktoren und Radikale, die zu einer Plaque-Ruptur führen. Das undichte thrombogene Material führt zur Blutgerinnung und zum Verschluss der Arterie [57].

Die Veränderungen der Arterien während der Atherosklerose können individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Aus diesem Grund ist es schwierig, Ursachen und Pathogenese genau zu klären.

Im Bezug auf die Mechanismen, die zur Initiierung der Atherosklerose führen, haben sich zwei zentrale Hypothesen herauskristallisiert: Die „Response to injury hypothesis“ nach Russel Ross sowie die „Lipoprotein-induced atherosclerosis hypothesis“ nach Leonard Joseph Goldstein [54, 114].

Die von Ross und Glomset formulierte „Response to injury hypothesis“ sieht die Initiierung des komplexen atherosklerotischen Geschehens in der Verletzung der an das Blut angrenzenden obersten Arterienwandschicht, der Intima [114]. Diese besteht aus einer einzelligen Lage von Endothelzellen.

Ross und Glomset führen mehrere Ursachen für eine Schädigung der Endothelzellschicht auf. Neben den morphologischen Schädigungen durch Trauma, mechanischen Verletzungen, biochemischen Schädigungen durch bakterielle Toxine, gehören auch der Angriff durch Viren oder Antigen-Antikörper Reaktionen sowie biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene zu den möglichen Ursachen [80, 96].

Als Folge der Verletzung werden zwei, für die Entstehung der Erkrankung, typische Phänomene beobachtet. Zum einen eine durch Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine ausgelöste Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der mehrschichtigen Media in die Intima und zum anderen die durch Lipideinlagerung verursachte Bildung von Schaumzellen in Intima und Media [114, 116, 117]. Steinberg et al. [131] bezeichneten diese Lipidinfiltration als bedeutenden Faktor im atherosklerotischen Geschehen.

Diese beiden Erscheinungen führen über einen längeren Zeitraum zur Bildung herdförmiger Gewebsveränderungen, den sogenannten Plaques, welche charakteristisch für das mikroskopische Bild der Atherosklerose sind.

Als Erste berichteten Brown und Goldstein von der Aufnahme chemisch modifizierter LDL durch Makrophagen und der darauf folgenden Umwandlung zu Schaumzellen. Die chemische Modifizierung besteht in einer Acetylierung des Proteinanteils. In Anbetracht der wichtigen Rolle der LDL und seiner modifizierten (oxidierten) Formen für die Entstehung der Atherosklerose entstand eine neue Hypothese, die „Lipoprotein-induced atherosclerosis“ [19, 132]. Diese sieht die Verletzung von Endothelzellen nur als Teilschritt der Abfolge von komplexen Vorgängen.

Die eigentliche Ursache für die Initiierung des atherosklerotischen Geschehens wird in der oxidativen Modifizierung von LDL gesehen. Mit der Nahrung werden die Lipide aufgenommen und gelangen in die Blutbahn. Lipoproteine transportieren hydrophobe Lipide im wässrigen Milieu des Blutes. Der Proteinanteil der Lipoproteine hat die Aufgabe, die transportierten Lipide an ihren metabolischen Bestimmungsort zu dirigieren. Je nach Protein- und Lipidanteil unterscheiden sich die Lipoproteine in ihrer Dichte, nach der fünf Klassen definiert werden [19]. Besonders die Klasse der LDL spielt bei der Progression der

Atherosklerose eine wichtige Rolle. Diese LDL-Partikel zirkulieren mehrere Tage im Blut und lagern sich zum Teil in den Gefäßwänden ab, wenn alle Zellen ausreichend mit Lipiden versorgt sind. In der Gefäßwand verringert sich der Schutz der LDL vor chemischer Modifikation und somit werden sie oxidiert. Das modifizierte LDL kann dann von Makrophagen aufgenommen werden, welche so zu Schaumzellen transformieren [20, 58].

Die vorher beschriebene Migration von glatten Muskelzellen der Media in die Intima spielt eine entscheidende Rolle bei der Progression der Atherosklerose. Im Zuge der Pathogenese können sie auch modifiziertes LDL aufnehmen und zu lipidbeladenen Schaumzellen werden.

Im weiteren Verlauf sind beide Hypothesen identisch. Die Bildung der Schaumzellen verursacht eine Entzündungsreaktion. Folge der Reaktion ist ein allmählicher Gewebeumbau. Hierbei entsteht in der Arterie eine bindegewebsartige Kappe, welche im Innern einen Lipidkern aufweist, die sogenannte atherosklerotische Plaque. Der Lipidkern resultiert aus den massenhaft abgestorbenen Schaumzellen, die große Mengen oxidiertes LDL-Partikel aufgenommen haben. An aufgebrochenen atherosklerotischen Plaques finden dann weitere Blutgerinnungsreaktionen statt, welche den Gefäßdurchmesser zusätzlich reduzieren [80]. Die so geschädigte Arterie wird durch diesen Gewebeumbau sehr brüchig. Zudem ist anzumerken, dass die Bildung der atherosklerotischen Plaques bis zur vermehrten Bildung der Schaumzellen reversibel ist. Weitergehende Schäden können jedoch nicht mehr ausgeglichen werden.

Es werden drei unterschiedliche Grundtypen der atherosklerotischen Läsionen unterschieden:

- frühe Läsion
- fortgeschrittene Läsion
- komplizierte Läsion

Die frühe Läsion:

Schon im Kindesalter können erste Läsionen auftreten. Gekennzeichnet sind diese durch Lipoproteine, die atherogen und chemotaktisch auf Makrophagen wirken. In diesem Stadium liegen die Makrophagen nach Lipidaufnahme als Schaumzellen verstreut in der Intima. Diese sogenannten Initialläsionen treten bevorzugt an Stellen diffuser intimaler Verdickung auf. Schon von Geburt an ist diese Verdickung bei vielen Menschen zu beobachten und ist eine physiologische Reaktion auf Blutdruck und Scherkräfte der Arterienwand. Hierdurch kommt es zur Ansammlung von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix in der Intima. Dadurch wird das Gefäßlumen jedoch noch nicht eingengt [96].

Fettstreifen:

Im Zuge der Atherogenese sind erste makroskopisch sichtbare Veränderungen der Arterienwand die Fettstreifen. Dies sind flache, schmale, gelblich gefärbte, in Gefäßrichtung orientierte Gebilde. Für Fettstreifen charakteristisch sind subendotheliale Schaumzellaggregate, die hauptsächlich aus Makrophagen, aber auch aus lipidbeladenen glatten Muskelzellen bestehen [118]. Des Weiteren gibt es in den Fettstreifen vereinzelt T-Lymphozyten.

Fettstreifen treten schon nach der Geburt auf und im Alter von zehn Jahren bedecken sie bis zu 10% der Aortenoberfläche [29]. Da die Intima durch die Fettstreifen um weniger als 1 mm verdickt wird, wird der arterielle Blutstrom nicht eingeschränkt. Im Verlauf der Atherogenese wird die Bedeutung der Fettstreifen kontrovers diskutiert. Einige Autoren konnten zeigen, dass Fettstreifen immer zu fibrösen Plaques führen [44]. Andere hingegen stellten fest, dass sich Fettstreifen bei jungen Menschen nicht weiterentwickeln und somit kein eindeutiges Zeichen für eine fortschreitende Atherosklerose seien [129]. Das Stadium der Fettstreifenbildung ist vollkommen reversibel. Die Rückbildungsfähigkeit ist jedoch nicht mehr gegeben, wenn es zu Ablagerungen von extrazellulären Matrixkomponenten in den Plaques kommt. Dies ist bei der intermediären Läsion der Fall.

Die intermediäre Läsion:

Nach der Pubertät kann es zur intermediären Läsion, auch Lipidplaques genannt, kommen.

Diese bestehen aus glatten Muskelzellen und sich verdichtenden, lipidbeladenen Makrophagen, welche von Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Proteoglykanen umgeben werden [119]. Sie enthalten im Gegensatz zu den Fettstreifen diffus verteilte extrazelluläre Lipide [130]. An den Rändern der intermediären Läsionen können Risse und Fissuren entstehen. Durch das Auftreten von Blutgerinnseln ist die intermediäre Läsion die erste Form, bei der es zu klinischen Folgen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall kommen kann.

Die fortgeschrittene Läsion:

Das Atherom:

Atherome sind gekennzeichnet durch eine dichte Ansammlung von Lipiden, Lipidkern genannt, sowie einer Atheromkappe. An der betreffenden Stelle wird die Intimastruktur aufgelöst. Der Lipidkern entsteht durch Zusammenfließen der extrazellulären Lipidtropfen und der weiteren kontinuierlichen Lipidfusion aus dem Blutplasma [130]. Der Lipidkern besteht aus Lipidtropfen, Zelltrümmern und Schaumzellen. Darüber hinaus werden Kalziumablagerungen und Cholesterinkristalle früh beobachtet. Solch ein Herd erscheint makroskopisch gelblich und wird als Atherom oder atherosklerotische Plaques bezeichnet. Die Atheromkappe wird aus glatten Muskelzellen, Kollagen, elastischen Fasern und Proteoglykanen gebildet und überzieht das Zentrum [96]. An den Kappenrändern siedeln sich Makrophagen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten an. Zudem sprossen Kapillaren aus der Adventitia ein [130]. Die Aterienwand wird durch das Atherom verdickt, was jedoch nicht zwangsläufig zu einer Gefäßlumenverengung führt. Das Atherom kann sich allerdings weiter entwickeln und klinisch an Bedeutung gewinnen.

Die komplizierte Läsion:

Bilden sich auf der Oberfläche von Atheromen Risse und in Folge dessen Thromben, handelt es sich um eine komplizierte Läsion. Es werden histologisch drei komplizierte Läsionen unterschieden: im ersten Fall bilden sich Oberflächenrisse, wobei Fissuren in der Endothelzellschicht oder Ulzerationen auftreten können. Im zweiten Stadium entstehen Hämatome und Hämorrhagien auf der Plaqueoberfläche. Thromben entwickeln sich im dritten Stadium [130]. Komplizierte Läsionen neigen zu Rissen an der Oberfläche. Besonders an Stellen mit vielen Makrophagen-Schaumzellansiedelungen. Die Läsion wird instabil, wenn die „Plaqueschultern“ dünn sind und viele Makrophagen enthalten [47]. Ist die Plaquekappe gleichmäßig dick und dicht, handelt es sich um eine stabile Läsion. Bei einer komplizierten Läsion, kann das Gefäßlumen so stark verringert sein, dass es zu einem spontanen Arterienverschluss kommt. Dies ist lebensbedrohlich, wenn es sich um Koronar- oder Hirngefäße handelt.

1.2. Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Ursache der endothelialen Dysfunktion ist oftmals eine reduzierte Synthese von Stickstoffmonoxid bzw. eine verminderte Bioaktivität von NO. NO wirkt wegen seiner vasodilatativen, antithrombotischen und antiproliferativen Eigenschaften gefäßprotektiv. Studien belegen, dass Diabetes mellitus mit einer endothelialen Dysfunktion eng assoziiert ist. Als zentrale Mechanismen diskutiert man die Inaktivierung von NO durch Sauerstoffradikale, die Reduktion der für die NO-Synthese benötigten Co-Faktoren (Tetrahydrobiopterin, NADPH) und die Hemmung der endothelialen NO-Synthase selbst durch Phosphorylierung (Proteinkinase C) sowie O-Glykosylierung (Hexosaminstoffwechsel).

Endotheliale Dysfunktion bei vaskulären Erkrankungen:

In der ursprünglichen Fassung der „Response-to-Injury“ – Hypothese schlugen Ross und Glomset [115, 116] vor, dass Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hochdruck, Rauchen oder Diabetes mellitus eine chronische Endothelschädigung verursachen. Die Endothelläsion wurde als Ursache der Intimahyperplasie, der Akkumulation von Lipiden und der Ausbildung einer atherosklerotischen Plaques angesehen.

Allerdings wurde mit anderen Befunden deutlich, dass nicht zwangsläufig eine Läsion des Endothels, sondern das neben der anatomischen Integrität der funktionelle Zustand der Endothelschicht für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen von entscheidender Bedeutung sein kann. Aufgrund dieser veränderten pathophysiologischen Vorstellungen entstand der Begriff endotheliale Dysfunktion [50, 126], um die phänotypische bzw. funktionelle Modulation der Endotheleigenschaften durch die Einwirkung von Risikofaktoren zu beschreiben.

Charakteristisch für die endotheliale Dysfunktion sind deshalb:

- eine veränderte Vasoreaktivität mit einer Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation
- eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine
- eine selektive Hyperadhäsivität für Leukozyten und thrombotische Komplikationen denen ein Missverhältnis zwischen Hämostase und Fibrinolyse zugrunde liegt

Endotheliale Dysfunktion und veränderte Gefäßreaktivität:

Eine weitere wichtige Eigenschaft von intaktem Endothel ist es, auf Acetylcholin mit einer Relaxation des Gefäßes zu antworten. Dies wird durch die Freisetzung einer vom Endothel gebildeten Substanz, dem EDRF verursacht [46]. EDRF wurde späterhin als Stickstoffmonoxid identifiziert [51, 84]. NO ist von besonderer

Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus und es wurde nachgewiesen, dass die endotheliale Antwort auf pathophysiologische Reize verändert bzw. gestört ist. Somit ist die endothelabhängige Relaxation nicht nur bei fortgeschrittener Atherosklerose verschlechtert, sondern bereits in angiographisch nichtauffälligen Arterien von Risikopatienten mit Hypertension, Hypercholesterinämie und Diabetes melitus [11, 88, 97, 139].

Synthese von Stickstoffmonoxid durch das vaskuläre Endothel:

Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO kann durch eine verminderte Expression der eNOS, einen Substrat- oder Cofaktorenmangel der eNOS, eine eingeschränkte Aktivierung der eNOS oder einen beschleunigten NO-Abbau verursacht sein [23]. Unter anderem führen die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und der Nikotinabusus zur gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O_2^-) [125], welche NO frühzeitig zu vasoinktiven Metaboliten wie Nitrat abbauen können. Neben der vorzeitigen Inaktivierung von NO kommt es zu einer gesteigerten Bildung von oxidiertem LDL-Cholesterin in der Gefäßwand. Bei der Reaktion von NO mit O_2^- entsteht unter anderem Peroxynitrit, welches endotheltoxisch wirkt [3, 10, 11] und zu einer Entkopplung der eNOS mit einer reduzierten NO-Synthese sowie einer gesteigerten O_2^- Bildung führt [136]. Durch die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen kommt es zur Bildung von Schaumzellen und Ausschüttung von chemotaktischen Entzündungsmediatoren. Die verminderte Menge an bioverfügbarem NO begünstigt die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und die Adhäsion von Thrombozyten. Die proatherogene Wirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren scheint somit zumindest in Teilen durch eine chronische Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit durch vermehrten oxidativen Stress verursacht zu sein [37].

1.3. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

1966 entdeckten die Gruppen von J. David und B. Bloom in etwa zeitgleich im Überstand von aktivierten Lymphozyten einen löslichen Anteil, welcher die Bewegung von Makrophagen hemmte, allerdings deren Adhäsions- und Phagozytoseeigenschaften steigerte. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde er deskriptiv "Macrophage Migration Inhibitory Factor" genannt und war das erste bekannte Protein, welches Zytokin-Aktivität besaß [17, 37, 39]. Die monomere Form von humanem MIF besteht aus 114 Aminosäuren, welche in der Sekundärstruktur zwei antiparallele α -Helices und sechs β -Stränge bilden. In der dreidimensionalen Struktur liegt MIF als Homotrimer vor [134, 137]. MIF hat ein Molekulargewicht von 12,5 kDa und wird posttranslational nicht glykosyliert [15, 152]. Im Inneren der Zelle liegt MIF in Vesikeln vor. Unklar ist jedoch, wie MIF dorthin und aus der Zelle heraus gelangt, denn MIF besitzt keine Signalsequenz, die den Export in das endoplasmatische Retikulum leiten könnte [15, 146].

MIF als Zytokin:

MIF galt lange Zeit als ein T-Zell-spezifisches Zytokin, welches die Makrophagenmigration hemmt [17, 37]. Allerdings besitzt MIF neben vielen Merkmalen von Zytokinen auch Eigenschaften von Hormonen und Enzymen. Für die Zuordnung zu den Zytokinen sprechen die vielen proinflammatorischen Eigenschaften [74]. Die Bedeutung von MIF als Entzündungsmediator wird bei der Neutralisation von MIF im Mausmodell der septischen Peritonitis deutlich. Hier konnten die Tiere vor den Folgen eines letalen septischen Schocks durch die Therapie mit anti-MIF-Antikörpern geschützt werden [28]. Zudem steht MIF in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit [63]. Ein weiteres Beispiel ist die rasche Freisetzung von MIF aus dem Myokard durch einen Myokardinfarkt. Anschließend fördert MIF die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Die Dämpfung dieser Ereignisse durch anti-MIF Interventionen legt nahe, dass MIF ein mögliches therapeutisches Ziel folgender Myokardinfarkte sein kann [147].

MIF liegt vorgeformt in intrazellulären Vesikeln vor und wird auf einen Stimulus hin ausgeschüttet. Außerdem zirkuliert MIF im Blutstrom mit einer Konzentration von 3-5 ng/ml [89]. Diese Merkmale unterscheiden MIF von anderen proinflammatorischen Zytokinen, welche auf einen Reiz hin erst synthetisiert werden müssen [8]. Die zellulären Quellen von MIF sind im gesamten Körper verbreitet und reichen von Zellen des Immunsystems über Hypophysenzellen bis hin zu Endothelzellen [28]. Die Makrophagen sind eine der wichtigsten Quellen für MIF und wird aus ihnen nach Stimulierung durch bakterielle Endotoxine und Exotoxine, wie LPS, TSST-1 und SPEA, aber auch durch proinflammatorische Effektormoleküle, wie TNF- α und INF- γ ausgeschüttet [24, 26]. Nach der Freisetzung wirkt MIF wie ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, indem es Zellen des Immunsystems aktiviert [86]. Dies ist anhand der steigenden Proliferationsrate von Lymphozyten und einer erhöhten Phagozytoserate der Makrophagen zu sehen [4, 98, 135]. Zudem hemmt MIF die Apoptose von Makrophagen und Neutrophilen [9, 92]. Diese Eigenschaften tragen gemeinsam zu einer verbesserten Immunantwort und wiederum zur Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques bei [32]. Zu Beginn einer akuten Entzündung sind erhöhte Gewebe- und Serumspiegel von MIF schädlich [27]. Die proinflammatorische Wirkung von MIF während der akuten Entzündung wird durch die Stimulierung und Ausschüttung vieler entzündungsfördernder Faktoren, wie TNF- α , IL-6, Stickoxid und Produkten der Arachidonsäuremetabolismus deutlich [15, 25, 91]. Des Weiteren ist MIF ein natürlicher Gegenspieler der antiinflammatorischen Glucocorticoide, indem MIF die durch Glucocorticoide induzierte Inhibition der proinflammatorischen Stoffe TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 rückgängig macht [25].

MIF als endokriner Faktor :

1993 stieß man während der Suche nach einem systemischen Gegenregulator für die starken Effekte von Glucocorticoiden auf MIF. Hierbei fand man heraus, dass MIF von einer corticotropen Hypophysenzelllinie sezerniert wird [14]. Es konnte gezeigt werden, dass MIF nach der Stimulierung mit LPS aus der Hypophyse

sezerniert wird, um mit seinen proinflammatorischen Eigenschaften zur Immunabwehr beizutragen [15]. MIF wird auf allen Ebenen der HPA-Achse produziert [5]. In den Hypophysenzellen ist MIF in sekretorischen Vesikeln lokalisiert, die auch ACTH und TSH enthalten [100]. CRF induziert die Expression und Freisetzung von MIF aus den Hypophysenzellen [143]. Die systemische Konzentration von MIF unterliegt einem zirkadianen Rhythmus [108]. Die Freisetzung von MIF erfolgt hingegen nach systemischer Injektion von LPS schnell [14]. Ähnlich schaut die Freisetzung von MIF nach der Behandlung mit Glucocorticoiden aus. In einem in vitro Experiment konnte gezeigt werden, dass Makrophagen durch Cortisol oder Dexamethason zur Produktion und Freisetzung von MIF stimuliert wurden [25, 108].

Trotz gemeinsamer Freisetzung von ACTH und MIF aus Hypophysenzellen und der Stimulierung von Makrophagen durch Glucocorticoide zur Produktion von MIF, ist MIF Gegenspieler der antiinflammatorischen Wirkungen der Glucocorticoide.

Dies zeigt sich einerseits durch die Erhöhung der durch Glucocorticoide reduzierten Konzentration von inflammatorischen Zytokinen in Monozyten in vitro [25], andererseits durch die Aufhebung der protektiven Effekte von Glucocorticoiden in Modellen der Arthritis durch Injektion von MIF in vivo [25, 122]. MIF kommt zudem in den Insulin-produzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse vor. Hier liegt MIF als mRNA und Protein in Langerhansschen Zellen vor und colokalisiert mit Insulin in sekretorischen Granula. Die Expression und Sekretion von MIF wird durch ansteigende Glucosekonzentrationen erhöht. MIF selbst stimuliert die Insulinfreisetzung [142].

MIF als Enzym:

Die dreidimensionale Struktur von MIF gleicht keinem anderen Hypophysenhormon oder Zytokin und stellt damit eine neue Proteinsuperfamilie dar. Strukturelle Ähnlichkeiten mit MIF haben nur folgende Proteine: die Dopachrom-Tautomerase [133], die prokariotischen Enzyme 4-Oxalocronat-Tautomerase, 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat-Isomerase sowie die

Chorismat-Mutase [134]. Nicht nur auf struktureller Ebene besteht eine Ähnlichkeit zwischen MIF und den Enzymen, sondern auch in der Sequenz [153].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis heute keine physiologisch relevante enzymatische Wirkung von MIF in vivo bewiesen worden ist.

MIF aktiviert den MAP Kinase Signaltransduktionsweg:

Seit langem ist bekannt, dass Säugertierzellen in Kultur nur dann proliferieren, wenn zusätzlich zu dem Medium Serum hinzu gegeben wird. Dieses enthält mitogen-wirkende Wachstumsfaktoren, ohne die die Zellen in Apoptose gehen oder in der G₀-Phase des Zellzyklus verharren. Im Serum vorkommende Wachstumsfaktoren sind beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor EGF, der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF sowie die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-1 und 2. Diese Zytokine binden an Rezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität besitzen und sich intrazellulär selbst phosphorylieren. Adaptorproteine wie SOS oder Grb2 mit SH2-Domänen können dann an diesen Phosphatgruppen andocken. Hierdurch wird das G-Protein Ras aktiviert, welches wiederum zur Aktivierung der Raf-Kinase führt. Diese aktiviert in einer weiteren Reaktion die mitogen aktivierende Protein Kinase. Die MAP Kinase wird auch p44/p42 und „extracellular signal-regulated kinase“ genannt [40]. MAP Kinasen aktivieren dann durch Phosphorylierung eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und zytosolischen Proteinen wie P90, c-myc und die cPLA2.

Zusammenfassend kann man über die MAP-Kinasen-Kaskade sagen, dass es die gemeinsame Endstrecke vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren ist und über Phosphorylierung auf zytosolische Enzymaktivitäten und Transkriptionsfaktoren einwirkt, sowie mitogene Eigenschaften besitzt.

In Proliferationsexperimenten von Mitchell et al. [92] wird gezeigt, dass MIF bis zu 24 Stunden und somit länger als die meisten anderen Zytokine in der Lage ist, die MAP-Kinase in aktiviertem Zustand zu halten. Zudem fand man heraus, dass diese Aktivierung abhängig von der PKA ist. Die durch MIF aktivierten MAP-Kinasen führen letztlich zur Phosphorylierung der zytosolischen Phospholipase A2, deren Produkt Arachidonsäure ist. Die Zelle bildet aus der Arachidonsäure

Leukotriene und Prostaglandine, also entzündungs- und proliferationsaktive Substanzen, welche auch bei der Tumorentstehung von großer Bedeutung sind [58]. Zudem ist MIF ein zentraler Vermittler von entzündlichen Prozessen, wie zum Beispiel der Entwicklung von Adipositas, infektiösen und immunologischen Erkrankungen, einschließlich des septischen Schocks, Malaria, rheumatoider Arthritis und Arteriosklerose [95, 105].

1.4. Fragestellung:

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit MIF zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität führt.

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, welche intrazellulären Signalmoleküle beteiligt sind und welche Konzentration von MIF zur Aktivierung der Zellen benötigt wird.

1. Welche Konzentration von MIF führt zur Aktivierung von Endothelzellen?
2. Induziert MIF die Phosphorylierung von SRC?
3. Ruft MIF die Aktivierung der PI-3-Kinase in Endothelzellen hervor?
4. Verursacht MIF die Aktivierung des MAP-Kinase Pathways?

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen und Lösungen:

Acrylamid	BioRad
APS 10%	Sigma-Aldrich
BenchMark Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma diagnostics
β-Mercaptoethanol	Sigma diagnostics
Glycerol	J.T. Baker
Filter Paper	BioRad
Methanol	Merk
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
NaCl	Delta-Pharma
NP 40	Sigma Diagnostics
PBS	PAA Laboratories GmbH
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
SDS	Carl Roth GmbH & Co
Super Signal® West Pico	Pierce
Chemiluminescent Substrate	
Temed	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Laemli (5x)	5ml 0,5 M Tris pH 6,8 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 0,5 ml β-Mercaptoethanol 125 mg Bromphenolblau Ad 10 ml Aqua dest.
Lysispuffer	NP 40

	0,005% Proteinaseinhibitoren 0,005% 100 mM PMSF
Running Buffer (10x)	30,3 g Tris Base 141 g Glycin 10 g SDS ad 1 l Aqua dest. pH 8,3
Samplegel 12%	72 ml 30% Acrylamid 59,04 ml Aqua dest. 45 ml 1,5 M Tris pH 8,8 1,8 ml 10% SDS
Stackgel 5%	15 ml 30% Acrylamid 61,8 ml Aqua dest. 11,25 ml 1,0 M Tris pH 8,8 0,9 ml 10% SDS
TBS	20 mM Trizma Base 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,01% Tween 20
Transfer Puffer (10x)	30,3 g Tris Base 112,6 g Glycin ad 1 l Aqua dest. pH 8,8

2.2. Antikörper:

p-ERK	cell signalling
p-SRC	cell signalling
Anti-goat HRP	Dako
GAPDH	Dako

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial:

Blotgerät	Biorad
Brutschrank	Heraeus
Elisa Reader	DPC
Mikroskop	Leica
Pipetten	Gilson
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson
Reaktionsplatten, 96-well	Greiner
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia
Röntgenkassetten	Rego
Western Blot Kammer	Biometria
Zellkulturschalen, 100 mm	Becton Dickinson
Zellschaber	Becton Dickinson
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Kendro Multifuge 3S-R, Kendro

Zellkulturmedien:

Es wurden folgende Zellkulturmedien für die Verwendung in Versuchen angesetzt. Die Kulturmedien für die HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) wurden vom Hersteller Promocell bezogen und nach Anleitung angesetzt. Diese

enthielten FCS, ECGS/H, hEGF, hbFGF und HC-500. Zudem eine Antibiotikamischung aus Penicillin und Streptomycin.

Promocell Kulturmedium:

500ml Basismedium

+ Supplementmix mit:

10 ml fötales Kälberserum

2 ml endothelial cell growth Supplement/Heparin

0,05 µg/ 500 µl human epidermal growth factor

0,5 µg/500 µl basic fibroblast growth factor

500 µg/500 µl Hydrocortison

HUVEC-Zellen:

Die verwendeten Endothelzellen sind kommerziell erworbene human umbilical vein endothelial cells der Firma Promocell.

2.4. Zellkultivierung:

Kultiviert wurden alle Endothelzellen im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Hierbei wurden Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 250 ml verwendet. Den Zellen wurde 10 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Ein Wechsel des Mediums wurde alle zwei Tage unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Subkultivierung:

Zur Passagierung wurde eine konfluent gewachsene Zellkultur verwendet. Durchgeführt wurden alle Arbeitsschritte unter der Sicherheitswerkbank.

Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um sie von Resten des FCS zu entfernen. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurden 2 ml Trypsin zu den Zellen gegeben und diese

dann im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% so lange inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst hatte. Zur Abstopfung der andauernden Wirkung des Trypsins, wurden 5 ml erwärmtes Zellkulturmedium der Zellsuspension beigefügt.

Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Somit konnte die überstehende Flüssigkeit entfernt werden. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension in den Zellkulturflaschen mit erwärmtem Medium auf 10 ml aufgefüllt und kurz geschwenkt.

Danach wurden die Zellen weiter im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert.

Für die Versuche wurden Zellkulturen bis einschließlich Passage 7 verwendet.

Kryokonservierung:

Zur langfristigen Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Hierzu wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen entfernt und durch Zentrifugation gereinigt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und im flüssigen Stickstoff eingefroren.

Je nach Bedarf wurde ein Röhrchen mit Zellen aufgetaut und in Kultur gebracht.

2.5. Stimulation der Endothelzellen:

Es wurden zwei Experimente durchgeführt, denen jeweils eine unterschiedliche Endothelzellstimulation zu Grunde lag.

2.5.1. Konzentrationsabhängigkeit:

Den Zellkulturschalen sind jeweils eine steigende Konzentration MIF zugegeben:
4 ng, 20 ng, 40 ng.

Die Kontrollzellen bleiben unstimuliert. Die Endothelzellen werden nach 10 Minuten Inkubationszeit geerntet.

2.5.2. Zeitabhängigkeit:

Die Endothelzellen werden jeweils mit einer MIF Konzentration von 40ng/ml behandelt. Die Kontrollzellen bleiben unstimuliert, um eine Aktivierung durch andere Faktoren als den beigefügten Stimulantien auszuschließen. Die Endothelzellkulturen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert: nach 45 Min., 30 Min., 15 Min., 10 Min., 5 Min., 3 Min., 1 Min.

Die Kontrollzellen werden gemeinsam mit den anderen Zellen geerntet.

2.5.3. Inkubation:

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.6. Ernten und Lyse der Endothelzellen:

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt die Weiterverarbeitung der Endothelzellkulturen auf Eis gekühlt bei 4°C. Das Nährmedium in den Petrischalen wird abgesaugt. Anschließend wird 2 Mal mit PBS gespült und dieses erneut abgesaugt. Es wird in alle Petrischalen für 15 Minuten 200µl Lysepuffer gegeben. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers im verbliebenen Mediumrest gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die geernteten und lysierten Zellen werden für 15 Minuten bei 1400 RPM abzentrifugiert und somit von

Membranfragmenten getrennt. Der erhaltene Überstand kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren werden.

2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration:

Die Proteinbestimmung wird nach der kalorimetrischen BCA-Methode mit dem Mirco BCATM Protein Assay der Firma Pierce durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, dass Cu^{2+} in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu^{+} reduziert wird.

Cu^{+} bildet mit Bicinchoninsäure einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch messbar ist. Über die lineare Regression lässt sich so die Proteinkonzentration ermitteln.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Proteinstandards (Albumin) in absteigender Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ bis 0 $\mu\text{g/ml}$ in eine 96-well-Platte pipettiert. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt. Sowohl für die Eichwerte als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Von dem BCA-Reagenz wurden 100 μl zu jeder Probe zugegeben, der Ansatz eine Stunde bei 60°C inkubiert und im Anschluss die Extinktion bei 562nm gemessen.

2.8. Western Blot:

Der Western Blot ist eine Methode, welche spezifische Proteine mit Hilfe eines Antikörpers nachweist.

2.8.1. Herstellung eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels:

Zu Beginn werden zwei Gelglasplatten mit 70%igem Ethanol gereinigt. Danach werden die Glasplatten miteinander fixiert und der so entstandene Zwischenraum zu 4/5 mit 12%igem Sampelgel befüllt. Zur Herstellung des Sampelgels werden

6ml 30%iges Acrylamid, 5ml H₂O, 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) und 150µl 10% SDS zusammen gegeben.

Durch die Zugabe von 150 µl APS und 30 µl Temed beginnt das Gel zu polymerisieren und muss zügig zwischen die Platten gegossen werden. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu schaffen wird das Gel sofort mit Aqua dest. überschichtet. Nach 10-15 Minuten ist das Gel vollständig polymerisiert und das Aqua dest. wird abgegossen.

Jetzt kann das 5%ige Stackgel hergestellt werden:

830 µl 30%iges Acrylamid, 3,4 ml H₂O, 630 µl 1,0 M Tris (pH 6,8), 50 µl SDS. Zur Polymerisation werden 50 µl APS und 10µl Temed hinzugefügt. Dann wird das Stackgel auf das Sampelgel geschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren 10 Minuten wird der Kamm entfernt und die Taschen werden mit Runningbuffer befüllt.

Zwischenzeitlich werden die zu untersuchenden Proben vorbereitet:

Um eine ausreichende Proteinkonzentration zu erhalten, sollte ungefähr 100 µg Protein in jede Tasche gefüllt werden. Aus diesem Grund wird von jeder Probe eine ihrer Proteinkonzentration entsprechende Menge entnommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/5 Laemli (5x) versetzt.

Die Proben werden nun bei 100°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt.

Zudem werden 12 µl BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder in die erste Tasche gefüllt, um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können.

2.8.2. Elektrophorese:

Die Laufzeit des Gels beträgt bei 109 Volt ca. 2 ½ Stunden.

Anschließend wird der Runningbuffer verworfen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst.

2.8.3. Blotten:

Die aufgetrennten Proteine werden mittels Semidry-Verfahren auf eine Membran übertragen. Das Gel wird in eine Transferbufferlösung bestehend aus 100 ml Methanol, 100 ml (10x) Transferbuffer sowie 800 ml Aqua. dest. für 15-20 Min. eingelegt. Ebenso die auf gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran, zwei Stücke Filz und zwei Stücke Whatman Papier. Auf das Blotgerät werden nun in folgender Reihenfolge aufeinander gelegt: Filz, Whatman Papier, Nylonmembran, Gel, zweites Whatman Papier, zweites Stück Filz. Im Anschluss daran werden bei 80 Volt (50 Minuten) die Proteine auf die Nylonmembran gebロットet.

Nach Abschluss des Blottens werden Gel, Whatman Papier sowie der Filz verworfen und die Nylonmembran in 5%iger Milch eine Stunde lang blockiert.

2.9. Markierung der ERK- und SRC- Kinase mittels spezifischer Antikörper :

Nach dem Blockieren wird die Membran 3x 10 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser Antikörper wird 1:1000 in 5% BSA verdünnt eingesetzt. Im Anschluss wird der Primärantikörper verworfen und die Membran erneut mit TBST gewaschen, damit unspezifische Bindungen vermieden werden können. Der Sekundärantikörper Anti-rabbit (HRP) wird 1:3000 in 5%iger Milch verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgt ein erneuter Waschgang mit TBST.

2.10. Chemolumineszenz:

Für 2 Minuten wird die Membran nun in die Chemolumineszenzlösung eingetaucht, welche die horseradish peroxidase auf der Westernmembran detektiert. Danach kann die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert werden.

2.11. Stripping:

Mit Hilfe einer Strippinglösung kann die Membran von den gebundenen Antikörpern befreit werden. Nach mehreren Waschschritten in TBST und Blockierung in 5%iger Milch, ist die Membran wieder für eine erneute Inkubation mit Antikörpern bereit.

2.12. Phosphatidylinositolkinaseassay:

Isolierte Endothelzellen wurden mit 40 ng/ml MIF zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 1 Min., 3 Min., 5 Min., 10 Min. und 15 Min.) stimuliert. Die Zellen wurden in PI-3-Kinase-Lysepuffer auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Lysate bei 10000 rpm für 5 Minuten in der Zentrifuge bei 4°C aufgetrennt. Die PI-3-Kinase wurde mit Anti-p85 Antikörpern sowie mit Hilfe des Proteins A/G Agarose immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde dreimal mit Lysepuffer sowie zweimal mit Lipidkinasepuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Peletts in 50 µL Lipidkinasepuffer resuspendiert. Ergänzend kamen 1,2 µg Phosphatidylinositol (PI) sowie 10 µCi ³²P-γ-ATP hinzu. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 30°C, wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µL 1M HCL gestoppt. Die organische Phase wurde durch das Hinzugeben von 450 µL Methanol/Chloroform (Verhältnis 1:1) aufgetrennt. Die Lipide wurden auf einer TLC silica Gelplatte (Whatmann) aufgetragen. Aufgetrennt wurden die TLC-Platten in Methanol/Chloroform/H₂O/Ammoniak (im Verhältnis 47:60:11, 3:2) und die radioaktiven Phosphatidylinositol (PIP) Produkte wurden durch Autoradiographie dargestellt.

2.13. Statistik:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Microsoft Excel verarbeitet und als mean +/- standard error of the mean (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ANOVA und Duncan's post-hoc-test untersucht. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. MIF steigert konzentrationsabhängig die Aktivierung von p-ERK

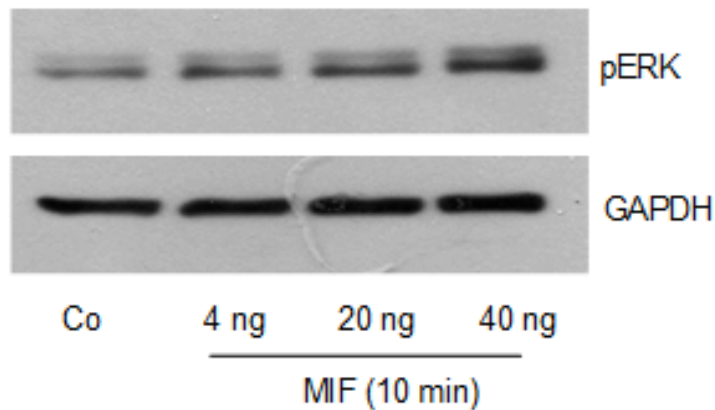
Zur Untersuchung, bei welcher Konzentration MIF zu einer Aktivierung von p-ERK führt, wurden humane Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen von MIF behandelt: 4 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml.

Nach der Inkubation wurden alle Endothelzellen geerntet. Die induzierte p-ERK-Aktivierung wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse dargestellt.

Es zeigte sich, dass die p-ERK-Aktivierung mit steigender MIF-Konzentration kontinuierlich zunahm, bei 40 ng/ml einen maximalen Effekt erreicht hatte.

Bei einer MIF-Konzentration von 40 ng/ml kam es zu einer signifikanten Induktion der Phosphorylierung von ERK gegenüber unstimulierten Endothelzellen ($2,80 \pm 1,32$, $p < 0,05$; $n=7$).

A.



B.

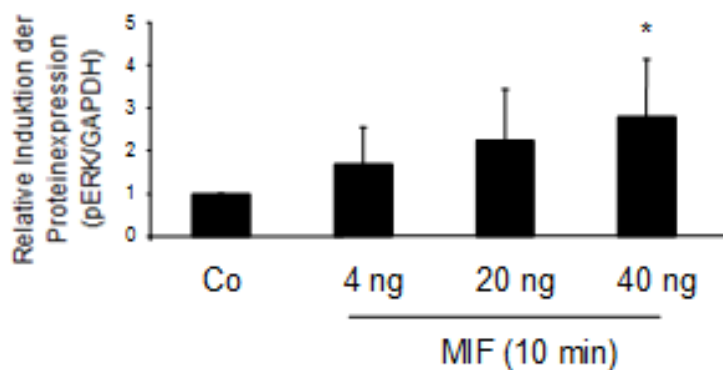


Abbildung 2: MIF induziert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK in Endothelzellen:

A: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivierung von p-ERK. MIF induziert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK in Endothelzellen mit einem maximalen Effekt bei 40 ng/ml.

Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

B: Densitometrische Analyse von n = 7 Experimenten zur Ermittlung der effektivsten Konzentration von MIF. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; Signifikante * ($p < 0,05$) Erhöhung der p-ERK-Aktivierung verglichen mit Kontrollzellen.

Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MIF: macrophage inhibitory factor; Min: Minuten; ng: Nanogramm; pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated Kinase.

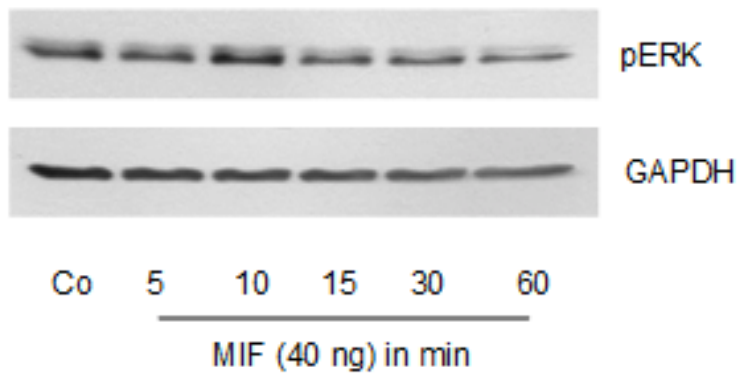
3.2. MIF fördert zeitabhängig die Aktivierung von p-ERK

Es wurden humane Endothelzellen mit MIF 40 ng/ml stimuliert und anschließend zu unterschiedlichen Inkubationszeiten geerntet: nach 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min. und 60 Min.

Die dadurch induzierte p-ERK-Aktivierung wurde anhand von Western Blot Analyse ermittelt.

Gegenüber einer unstimulierten Kontrolle nahm die p-ERK-Aktivierung mit steigender MIF Inkubationszeit stetig zu bis zu einem maximalen Effekt bei 10 Minuten. Die hier induzierte p-ERK-Aktivierung stieg von 1 bei den Kontrollzellen auf $2,09 \pm 0,33$ bei den 10 Minuten-stimulierten Endothelzellen. Wurden die Zellen länger als 10 Minuten inkubiert, kam es zu einem Rückgang der p-ERK-Aktivierung auf $0,87 \pm 0,21$ bei den 60 Minuten-stimulierten Endothelzellen. Allerdings gab es, verglichen mit den Kontrollzellen, nach 15 Minuten und 30 Minuten immer noch eine deutliche p-ERK-Aktivierung.

A.



B.

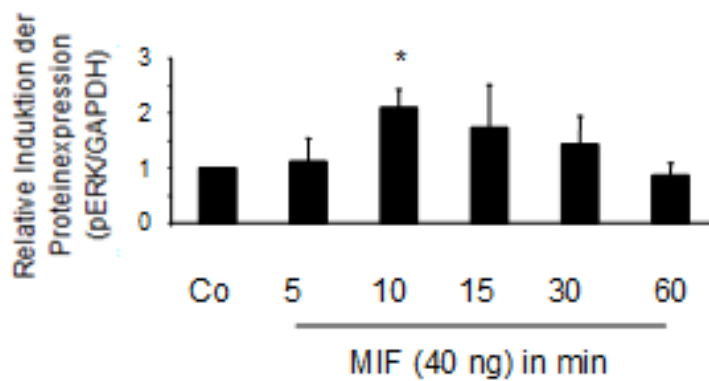


Abbildung 3: MIF induziert zeitabhängig die Phosphorylierung von p-ERK in Endothelzellen.

A: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der zeitabhängigen Aktivierung von p-ERK. MIF induziert zeitabhängig die Phosphorylierung von ERK in Endothelzellen mit einem maximalen Effekt bei 10 Minuten. Die Membran wurde anschließend mit GAPDH behandelt, um die Ladeverhältnisse darzustellen.

B: Densitometrische Analyse von n=7 Experimenten zur Ermittlung der effektivsten Inkubationszeit von MIF.

Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; Signifikante * ($p < 0,05$) Erhöhung der p-ERK-Aktivierung verglichen mit Kontrollzellen.

Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; MIF: macrophage inhibitory factor; Min: Minuten; ng: Nanogramm; pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated Kinase.

3.3. MIF fördert zeitabhängig die Aktivierung von p-SRC

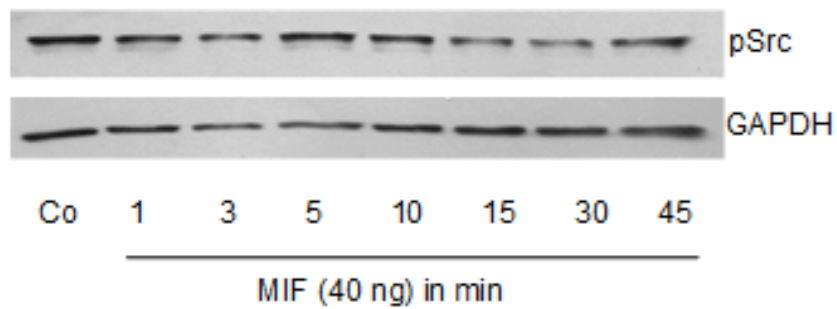
Bei diesem Experiment wurden erneut humane Endothelzellen mit MIF (40 ng/ml) stimuliert und im Anschluss daran zu unterschiedlichen Inkubationszeiten geerntet:

nach 1 Min., 3 Min., 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min. und 45 Min.

Die somit induzierte p-SRC-Aktivierung wurde mittels Western Blot Analyse ermittelt.

Der unstimulierten Kontrollgruppe gegenüber sah man eine kontinuierliche Zunahme der p-SRC Aktivierung mit steigender MIF Inkubationszeit, bis sie ihren maximalen Effekt bei 10 Minuten erreichte. Die p-SRC-Aktivierung stieg von 1 bei der Kontrollgruppe auf $2,07 \pm 1,32$ bei den 10 Minuten stimulierten Endothelzellen. Bei Inkubationszeiten länger als 10 Minuten kam es zum Rückgang der p-SRC-Aktivierung auf $1,85 \pm 0,57$.

A.



B.

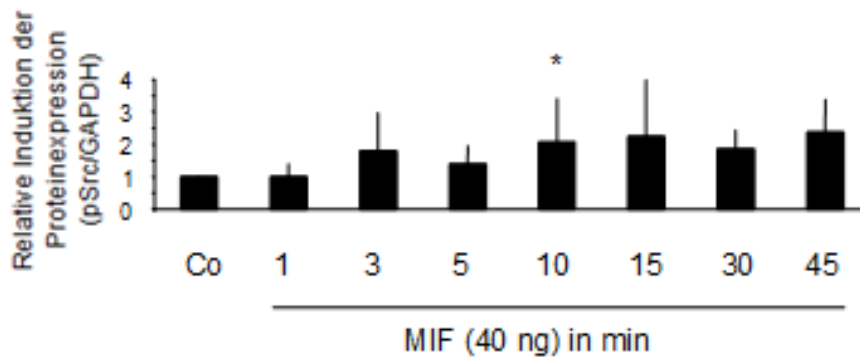


Abbildung 4: MIF induziert zeitabhängig die Phosphorylierung von SRC in Endothelzellen:

A: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der zeitabhängigen Aktivierung von p-SRC. MIF induziert zeitabhängig die Phosphorylierung von SRC in Endothelzellen mit einem maximalen Effekt bei 10 Minuten.

Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

B: Densitometrische Analyse von n=12 Experimenten zur Ermittlung der effektivsten Inkubationszeit von MIF.

Die abgebildeten Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikante * ($p < 0,05$) Erhöhung der p-SRC Aktivierung verglichen mit Kontrollzellen.

Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase;

MIF: macrophage inhibitory factor; Min: Minuten; ng: Nanogramm; pSrc: phosphorylated Sarcoma/proto-oncogenic tyrosine Kinase.

3.4. MIF aktiviert die PI-3-Kinase in humanen Endothelzellen

Um dies zu zeigen wurden humane Endothelzellen mit MIF (40ng/ml) stimuliert und zu verschiedenen Inkubationszeiten geerntet: nach 1 Min., 3 Min., 5 Min., 10 Min. und 15 Min.

Die dadurch induzierte PI-3-Kinase Aktivität wurde mit Hilfe des PI-3-Kinase Assays bestimmt.

Gegenüber einer Kontrollgruppe erhöhte sich die PI-3-Kinase-Aktivität mit ansteigender MIF Inkubationszeit stetig bis zu einem maximalen Effekt bei 3 Minuten. Die PI-3-Kinase-Aktivität stieg von 1 bei der Kontrollgruppe auf $3,88 \pm 1,78$ bei den 3 Minuten-stimulierten Endothelzellen.

Wurden die Zellen länger als 3 Minuten inkubiert, kam es zu einem Rückgang der PI-3-Kinase-Aktivität auf $1,25 \pm 0,88$.

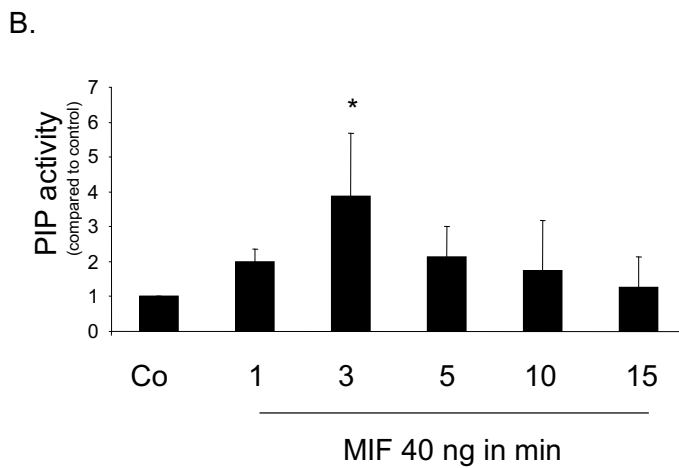
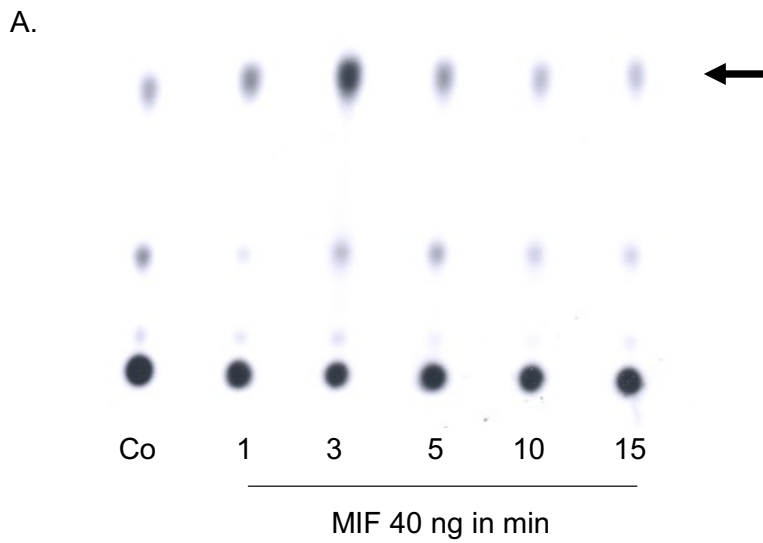


Abbildung 5: PI-3-Kinase assay: MIF erhöht die PI-3-Kinase-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

A: Dargestellt ist ein repräsentativer PI-3-Kinase assay, auf welchem eine vermehrte PI-3-Kinase-Aktivität nach einer Inkubation von 3 Minuten deutlich zu sehen ist.

B: Densitometrische Analyse von n=4 Experimenten zur Ermittlung der effektivsten Inkubationszeit von MIF auf die Aktivität der PI-3-Kinase.

Die dargestellten Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikante * ($p < 0,05$) Erhöhung der PI-3-Kinase-Aktivierung verglichen mit Kontrollzellen.

Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase;

MIF: macrophage inhibitory factor; Min: Minuten; ng: Nanogramm; PIP: 1-Phosphatidylinositol-4-Phosphat.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Aktivierung des Src-Kinase, des PI-3-Kinase sowie des MAP-Kinase Signalwegs in humanen Endothelzellen unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins MIF. Es konnte gezeigt werden, dass MIF die Src-Kinase, die PI-3-Kinase und die MAP-Kinase Aktivierung konzentrationsabhängig und zeitabhängig induziert.

Macrophage migration inhibitory factor ist ein proinflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich in den Endothelzellen gebildet wird. Seine pro-atherogenetische Rolle bei der Entstehung einer Läsion wurde kürzlich im knock-out Modell der Maus nachgewiesen. Darüber hinaus dient MIF als entscheidender Regulator der Zellfunktionen wie Genexpression, Proliferation und Apoptose.

Es gibt nur wenige Daten darüber, wie MIF die endothelialen Barrieren, als initialen Schritt der Arteriosklerose, beeinflusst.

Humanes MIF besteht aus 115 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 12,34 kDa und zeigt eine 90 prozentige Homologie zu murinem MIF. Die röntgenologische kristalline Struktur ergab ein MIF-Trimer aus identischen Untereinheiten [134], welche ein kreisförmiges Protein formen, das einen inneren hydrophoben Kanal mit unbekannter Funktion besitzt. Jedes Monomer enthält zwei antiparallele α -Helices, welche an ein Vierstrang β -Faltblatt binden. Berichte über den oligomerisierten Zustand von MIF sind widersprüchlich. Eine Studie, welche mit Gel-Filtration und cross-linking Experimenten arbeitete, belegte, dass MIF Monomere, Dimere und Trimere in physiologischer Lösung bildet, während das Trimer nur eine untergeordnete Form darstellt [90].

Abgesehen von seiner einmaligen Struktur, welche nicht vergleichbar ist mit derer der Chemokine, besitzt das MIF Monomer eine auffallende Ähnlichkeit zu dem IL-8 Dimer. Abgesehen von dieser Ähnlichkeit, wurden strukturelle Homologien des MIF Monomers und Trimers mit mikrobiellen Enzymen beschrieben [33], und in Übereinstimmung hiermit, hat man drei enzymatische Aktivitäten von MIF belegt. Zunächst wurde eine Glutathion-S-Transferase Aktivität sowie eine Tautomeraseaktivität dokumentiert [16]. Darüber hinaus wurde

gezeigt, dass MIF eine Thiol Protein Oxidoreduktaseaktivität aufweist und dass diese Aktivität von der Anwesenheit des katalytischen Zentrums abhängig ist. Dieses Zentrum wird durch die Cysteinreste 57 und 60, die sogenannte CALC-Gruppe, gebildet [68]. Mutationen der CALC-Gruppe führten zum Verlust der Oxidoreduktaseaktivität und immunogenetischen Funktion von MIF, wohingegen die Hemmung der Tautomeraseaktivität durch Entfernung oder Auswechseln des N-terminalen Prolin die immunogenetische Funktion nicht beeinträchtigte [12, 70]. Die Aufnahme von MIF in verschiedene immun- und nichtimmune Zelltypen durch nicht rezeptorausgelöste Endozytose und die Bestimmung von drei intrazellulären Proteinen, welche direkt mit MIF zusammen wirken, unterstützen die Darstellung, dass MIF intrazelluläre Funktionen erfüllt:

1. Das erste identifizierte intrazelluläre Protein, welches an MIF bindet, war das c-Jun activation domain binding protein-1. Dies ist ein Bestandteil des COP9-Signalosom [69]. Durch die Bindung an Jab1, verhindert MIF die Aktivierung von AP-1 regulierter Gen-Transkription und die Herabsetzung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1}. Somit blockiert MIF die Jab1-vermittelte Aufhebung des Wachstumstillstandes. Die Autoren weisen darauf hin, dass MIFs entgegenwirkende regulatorische Rolle den Glucocorticoiden gegenüber, durch die Blockade der Jab1-Bindung zu den Steroidhormonrezeptoren, vermittelt wird. Für den Androgenrezeptor wurde diese Theorie jedoch widerlegt [13].

Im Gegenzug steht Jab1 im Zusammenhang mit dem Abbau von p53 [102], und es wurde gezeigt, dass MIF die p53-vermittelte Apoptose und das Zellwachstum hemmt und somit Inflammation und Tumorgenese auslöst [45, 59]. Die MIF-vermittelte Apoptosehemmung war verbunden mit einem reduzierten p53 Level in der Zelle und abhängig von der Cyclooxygenase 2 [91]. Gegenüber diesen Daten ist ein Zusammenspiel zwischen MIF und Jab1 im p53 Abbau möglich, was zur Ap-1-vermittelten Cox-2 Expression führt.

2. Jung *et al.* [65] fanden heraus, dass das thiolpezifische Antioxidansprotein PAG an MIF unter herabgesetzten Bedingungen bindet und das PAG dosisabhängig die MIF D-dopachrome Tautomeraseaktivität hemmt. MIF hemmt ebenfalls die antioxidante Aktivität von PAG.

3. Der einzig bekannte zelluläre Oberflächenrezeptor für MIF ist CD74, die unveränderliche Kette des MHC II, welcher in geringen Mengen in einer Vielzahl

von Zellen exprimiert wird [78]. CD74 kann eine ununterbrochene Aktivierung von extracellular-regulated und mitogen-activated protein Kinasen (ERK-MAPK) vermitteln und gehört dem Signalkomplex von MIF, CD44 und der Src-Familie Tyrosinkinasen an [124]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Proteinkinase PI3K/Akt- vermittelte Apoptose von MIF-CD74-Src Signalisierung abhängig ist, ausgelöst durch exogene oder endogene MIF Sekretion, welches durch Jab1 vermindert wurde [85]. Darüber hinaus ist MIFs Fähigkeit die p53-abhängige Apoptose zu hemmen abhängig von CD74 und CD44 [124]. Ob CD74 die MIF Internalisierung vermittelt und/oder mit Jab1 zusammenwirkt bleibt immer noch aufzuklären.

Weil die existierenden Daten des molekularem Mechanismus von MIF nicht erklären wie MIF seine chemokin-ähnliche Funktion zeigt, und unter der Berücksichtigung, dass das MIF-Monomer dem IL-8 Dimer gleicht, liegt es nahe, dass möglicherweise ein oder mehrere Chemokinrezeptoren an der Funktionsweise von MIF beteiligt sind.

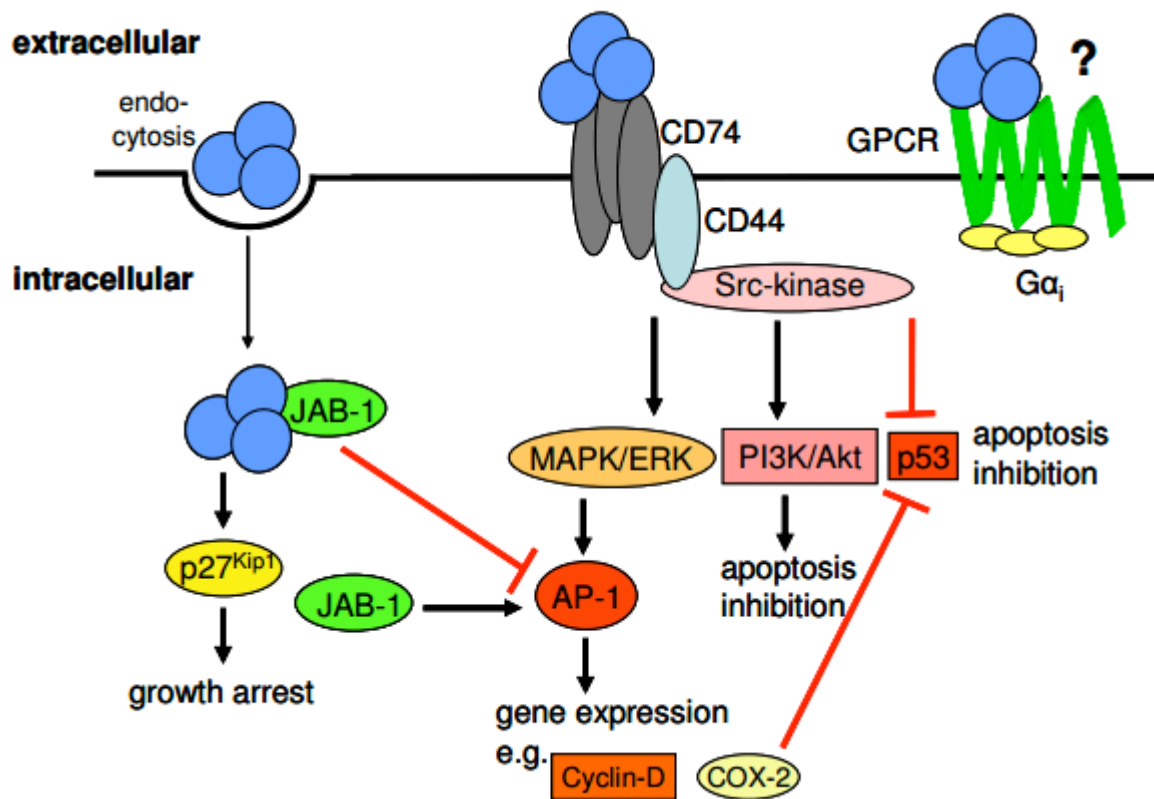


Abbildung 6: Das Wirkprinzip von MIF. MIF (blaues Trimer) wirkt zusammen mit Jab1, dabei aktiviert es p27^{Kip1} und inhibiert die AP-1-induzierte Genexpression. MIF bindet zudem an CD74, was zu einer anhaltenden Aktivierung von MAPK/ERKs durch CD44 und Src-Kinasen führt. Dies wiederum fördert die Genexpression. Die MIF vermittelte Inhibition der Apoptose durch PI3K/Akt ist ebenso abhängig von CD74 wie die Inhibition der Apoptose durch den p53 Abbau. MIF kann Zellen im chemokin-charakteristischen Weg durch die Bindung an ein GPCR aktivieren [93].
 Abkürzungen: Akt: Proteinkinase B; AP-1: activator protein-1; CD44/74: Cluster of Differentiation 44/74; Cox2: Cyclooxygenase2; e.g.: exempli gratia; ERK: extracellular signal-regulated Kinase; GPCR: G-protein-coupled receptor; Jab1: c-Jun activation domain-binding protein1; MAPK: mitogen-activated protein-kinase; p27^{Kip1}: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; p53: tumor-suppressor 53; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase.

Die Familie der Src Kinasen gehört zu den am intensivsten untersuchten Kinasen mit atherosklerotischer Wirkung. Es handelt sich hierbei um membran-assoziierte, zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen. Sie umfasst neun Mitglieder (Src, Blk, Yes, Yrk, Fgr, Fyn, Lyn, Lck und Hck), von denen zum Teil durch alternatives Splicing verschiedene Isoformen exprimiert werden [21]. Die Src-Kinasen werden alle nach einem spezifischen Muster in bestimmten Geweben exprimiert. So sind die Kinasen Blk, Hck, Fgr und Lck vor allem in hämatopoetischen Zellen zu finden.

Hingegen werden c-Src und Fyn in vielen verschiedenen Geweben exprimiert [18, 138]. Src-Kinasen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation vieler Signaltransduktionswege in B- und T-Zellen des Immunsystems [107]. Viele biologische Funktionen von Src-Kinasen hängen mit ihrer Fähigkeit zusammen, über die SH3- und SH2-Domäne mit Bindungspartnern zu interagieren.

Src-Kinasen lassen sich in sechs funktionelle Abschnitte untergliedern. Die N-terminale Myristoylierungsstelle ist verantwortlich für die Lokalisation der Src-Kinase an der Zellmembran. Die Fettsäure Myristat wird hierbei über eine Amidbindung an ein konserviertes Glycin gebunden [38, 110]. Die Bedeutung dieser Struktur für die biologische Funktion der Src-Kinasen wurde in mehreren Arbeiten belegt, allerdings scheint sie alleine nicht für eine stabile Assoziation der Src-Kinasen an die Zellmembran auszureichen. Für eine feste Verankerung sind wenigstens zwei weitere Regionen nötig [6, 35].

An die Myristoylierungsstelle schliesst sich eine Region an, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz innerhalb der Src-Kinasen Familie als „unique region“ bezeichnet wird. Man nimmt an, dass diese Domäne die Spezifität der Kinasen bestimmt.

Die darauffolgende SH3-Domäne fungiert als Erkennungsregion für prolinreiche Aminosäuresequenzen (P-X-X-P). Sie spielt eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der enzymatischen Aktivität der Src-Kinasen. Zudem wird angenommen, dass die SH3-Domäne die subzelluläre Lokalisation von Signalproteinen beeinflusst [7]. In fast allen zytoplasmatischen Tyrosinkinasen findet man eine SH2-Domäne, die als Erkennungssequenz für Phosphotyrosine dient [106]. Darüber hinaus spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Aktivität der Src-Kinasen. Auf die SH2-Domäne folgt schließlich die SH1- bzw. Kinasedomäne. Diese hat die höchste Sequenzhomologie innerhalb der Src-Kinasen Familie. Sie besteht aus zwei Subdomänen, dem N-Lobe und dem C-Lobe, sowie einem dazwischenliegendem katalytischen Zentrum. Den Abschluss bildet eine am C-Terminus gelegene, welche wichtig für die Regulation der Kinaseaktivität ist. Die Aktivität von Src-Kinasen wird durch ein Netzwerk intramolekularer Interaktionen reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität und somit auch die biologische Aktivität vom

Phosphorylierungszustand eines hochkonservierten, C-terminal gelegenen Tyrosinrests abhängt [30, 34]. Die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrests Y527 bewirkte eine Reduktion der Aktivität der Src-Kinase [21, 82]. Dementsprechend führt die Dephosphorylierung dieses Rests zum Anstieg der Aktivität von Src-Kinasen [60]. Jedoch ist die Regulation der Src-Kinasen nicht allein durch diese Phosphorylierung zu erklären. Als weiterer Reaktionsmechanismus trägt die Interaktion der SH3 Domäne mit dem SH2-Kinasen Linker bei.

Src-Kinasen sind während der Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen, während der endothelialen Zelldifferenzierung, sowie bei der Zell-Matrix Adhäsion und Zellmigration aktiviert [72, 75, 94, 121].

Zudem werden Src-Kinasen durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren aktiviert. VEGF und basischer Fibroblastenwachstumsfaktor stimulieren die Src-Aktivierung in Vogelendothelzellen und sE-Selektin. Zudem vermitteln VEGF über die Src-Familie-Tyrosinkinase Angiogenese [43, 76]. In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass MIF in den Endothelzellen durch die Aktivierung von Src VCAM1 und ICAM1 hochreguliert.

Wie wir in unseren Experimenten darstellen konnten, aktiviert MIF Src in einer zeitabhängigen Weise. Dargestellt haben wir dies mit Hilfe von Western Blots.

MIF lässt Src bereits nach 1 Minute kontinuierlich ansteigen und erreicht ein Maximum bei 10 Minuten. Bei Inkubationszeiten über 10 Minuten hinaus, kommt es zu einem Rückgang der Src-Aktivierung.

MIF erhöht den MMP-13- und MMP-1-mRNA-Spiegel in Rattenosteoblasten und humanen dermalen Fibroblasten, jeweils über die Src-Kinase-Signalwege. Die durch MIF induzierte Src-Phosphorylierung steht jedoch in keiner Verbindung mit der Expression von Zelladhäsionsmolekülen [103, 145].

Ein weiterer Signalweg, in den die aktivierten Src-Kinasen unter anderem eingreifen, ist der Akt-Signalweg. Die Akt Serin/Threonin-Kinase übernimmt in der Entwicklung von Krebs eine Kontrollfunktion, die sowohl das Überleben als auch die Differenzierung von Zellen steuert [36]. Einige der Substrate von Akt, wie zum Beispiel p21, Caspase 9 oder Bad sind Regulatoren der Apoptose [99]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Src-Kinasen direkt oder über die

Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung innehaben, weswegen strenge Kontrollmechanismen die katalytische Aktivität genau regulieren.

Einer der wichtigsten intrazellulären Signalwege, der zum Zellwachstum führt, wird von der Phosphatidylinositol-3-Kinase initiiert. Die PI-3-Kinase wird von Rezeptoren aktiviert und phosphoryliert keine Proteine, sondern Inositol-Phospholipide. Hierdurch entstehen Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat und PI-3,4,5-triphosphat. Diese dienen als Plattformen für Signalmoleküle, die so in Signalkomplexen zusammen gebracht werden und für eine Weiterleitung des Signals von der Zelloberfläche in die einzelnen Kompartimente der Zelle sorgen. Die Bindung an die Zelloberfläche erfolgt vor allem durch die PH-Domäne der Signalmoleküle. Beispiele für Proteine mit einer PH-Domäne sind Akt und PDK1. Beide werden mit Aktivierung der PI-3-Kinase an der Membran lokalisiert. Akt ändert dadurch seine Konformation und kann von PDK1 phosphoryliert werden. Für eine Aktivierung von Akt müssen sowohl Threonin 308 als auch Serin 473 phosphoryliert werden. Dies wird von PDK1 zusammen mit PDK2 vermittelt [36]. Die PI-3-Kinase Aktivität kann durch Bar-Abl reguliert werden und ist notwendig für das Wachstum Ph-positiver Zellen. Mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden für die p85 Untereinheit der PI-3-Kinase konnte die Koloniebildung von CD 34 und CML Zellen blockiert werden [127].

Wir untersuchten in unseren Experimenten die Rolle von MIF bei der Aktivierung der PI-3-Kinase und fanden heraus, dass MIF die Aktivität von PI-3-Kinasen in Endothelzellen zeitabhängig erhöht. Gegenüber der Kontrollgruppe steigerte sich die PI-3-Kinase-Aktivität mit erhöhter Inkubationszeit stetig bis zu einem Maximum, welches bei 3 Minuten liegt. Wurden die Zellen länger stimuliert, kam es zu einem Rückgang der PI-3-Kinase-Aktivität.

PI-3-Kinase ist bei der Zelladhäsion, beim Zellüberleben und bei der Angiogenese beteiligt [64, 109, 112, 140, 149]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass MIF und sE-Selektin Angiogenese über die PI-3-Kinase vermitteln [2, 76]. Zudem konnte dargestellt werden, dass IL-18 VCAM-1 über PI-3-Kinasen hochreguliert. Durch die Aktivierung von PI-3-Kinasen kommt es zu einer Hochregulation von löslichen

Adhäsionsmolekülen, was wiederum mit der Schwere der rheumatoiden Arthritis und Atherosklerose korreliert [61, 67, 71, 73, 101, 141].

Mitchell et. al. untersuchten die Rolle von MIF im Bereich der Zellproliferation und Signalkaskade der Zellen näher. Hierbei bedienen sie sich der gut etablierten Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 [91].

Es war möglich, die Proliferation dieser NIH 3T3 durch exogen sezerniertes und endogen zugegebenes MIF zu stimulieren. Diese Antwort war mit einer dosis- und zeitabhängigen Aktivierung der p42/p44 ERK1/ERK2 assoziiert, welche auch unter dem Namen Mitogen-aktivierte Proteinkinase bekannt ist. Der Ras-Raf-ERK1/2 Signaltransduktionsweg, als eine Kaskade von vielfachen Proteinphosphorylierungen wurde sehr intensiv erforscht, da er die Zellproliferation stimuliert. Die durch MIF hervorgerufene Aktivierung dieser Kinasen konnte bereits 5 Minuten nach Zugabe von MIF nachgewiesen werden und hielt für eine Dauer von 24 Stunden an. Diese anhaltende Aktivierung der MAP-Kinasen gilt als ungewöhnlich und wurde bisher einzig im Fall der Differenzierung neuronaler PC12 Zellen durch den Wachstumsfaktor NGF [150] und in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beschrieben [113]. Ähnlich wie die durch NGF induzierte Wirkung war die durch MIF anhaltende Aktivierung der ERKs abhängig von der Proteinkinase A. PKA phosphoryliert Serine/Threonine in Proteinen, welche die Sequenz Arg-Arg-X-Ser/Thr-X enthalten. Sowohl Enzyme des metabolischen Stoffwechselweges und Hormonrezeptoren als auch Ionenkanäle und viele andere Gene gehören zu den physiologischen Substraten dieser PKA [41]. Hauptsächlich wird PKA durch cAMP aktiviert und spannenderweise war auch der Effekt von MIF von cAMP abhängig.

Aktivierte ERKs phosphorylieren eine Vielzahl von zytosolischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Rsk, c-myc, cPLA₂, c-fos und Elk-1 [95]. Die durch MIF aktivierten ERKs zeigten eine effektive Phosphorylierung der Elk-1 und cPLA₂, was dafür spricht, dass die durch MIF in Gang gesetzte Aktivierung der ERKs enzymatisch aktive ERKs zur Folge hatte.

Tatsächlich zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin MIF zu einer Aktivierung der p-ERK-Kinase in

Endothelzellen führt. Diese Hochregulierung kann mit steigender MIF-Konzentration bis zu einem Sättigungspunkt weitergeführt werden.

Danach ist mit steigender MIF-Konzentration keine weitere Aktivierung von p-ERK in den Endothelzellen zu erreichen.

Ebenso kann demonstriert werden, dass die p-ERK-Aktivität zeitabhängig durch den Einfluss von MIF gesteigert werden kann. Sind Endothelzellen einer MIF-Konzentration von bis zu 40ng/ml ausgesetzt, kann eine kontinuierliche p-ERK-Hochregulierung über 10 Minuten festgestellt werden. Weitere Einwirkung von MIF führt zu keiner fortführenden Aktivierungssteigerung.

Die Atherogenese galt lange Zeit als eine nicht beeinflussbare degenerative Erkrankung der Gefäßwand. Erst durch die Arbeiten der letzten Jahre hat sich das Verständnis für die Entstehung der Arteriosklerose geändert. Heute weiß man, dass es sich bei der Atherogenese um einen inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand handelt, welcher über Jahre in verschiedenen Phasen verläuft und inflammatorische Zellen sowie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine involviert [61, 72, 76].

Die Rolle von MIF im Fortschreiten der Atherosklerose wird immer detaillierter erforscht. Schober *et al.* [123] beobachteten eine signifikante Reduktion von Makrophagen und Makrophagen abgeleiteten Schaumzellen in Mäusen nach der Behandlung mit einem MIF-blockierendem mAb. Umgekehrt wurde die Menge von glatten Muskelzellen und Kollagen Typ 1 erhöht, was ein weiterer Hinweis für einen stabilen Plaque-Phänotyp steht. Als zugrunde liegenden Mechanismus fanden die Autoren heraus, dass die Inkubation von Endothelzellen der Aorta mit rekombinantem MIF unter fließenden Bedingungen für zwei Stunden eine Festnahme von Monozyten auslösen kann, während endotheliales MIF die Festnahme erst nach Freisetzung von oxLDL vermittelt [123]. Dementsprechend hat sich die Hemmung von Diät-induzierter Atherogenese in LDL-Rezeptor knock-out (LDLR -/-) Mäusen durch genetische Beseitigung von MIF durch die Abnahme der intimalen Verdickung, Lipidausfällung und Expression von Protease geäußert [104]. Zudem ist MIF in der Aorta von Patienten mit koronarer Arteriosklerose überexprimiert und die Expression von MIF korreliert mit der Schwere der koronaren Herzkrankheit [55]. In einem Mausmodell mit spontaner Atherosklerose

fürte die Blockade von MIF auch zu einer Reduktion von Makrophagen in der Aortenwand, sowie zu einer Inhibition von mehreren Entzündungsmediatoren wie ICAM-1, MMP-2 und TNF- α [22]. Diese Ergebnisse unterstützen ein Modell, nachdem MIF direkt die Endothel–Monozyten–Adhäsion in einer Wirkungsweise beeinflusst, welche den immobilisierten Chemokinen der Atherogenese gleicht. Daher liegt es nahe, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Artherosklerose spielt [151].

5. Zusammenfassung

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) wurde zunächst als ubiquitärer Mediator mit proinflammatorischer und glukokortikoidantagonistischer Wirkung im Immunsystem entdeckt. In den letzten Jahren wurde jedoch klar, dass MIF zudem als ein Wachstums- und Überlebensfaktor fungiert. Die exakte biologische Funktion von MIF ist in zahlreichen Geweben immer noch unerforscht. Mechanistisch gilt MIF als ein Zytokin, aber es ist auch eine enzymatische Funktion als Tautomerase oder Oxidoreduktase oder eine rein intrazelluläre Funktion als Modulator der Signaltransduktion beschrieben.

Vorarbeiten konnten zeigen, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit MIF zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Wirkung von MIF auf die Aktivierung der SRC-Kinase, der PI-3-Kinase und des MAP-Kinase Signalwegs in Endothelzellen nachgewiesen.

Mit Hilfe von Western-Blot-Experimenten wurde zunächst die zeitabhängige Wirkung von MIF auf die p-ERK Aktivierung in humanen Endothelzellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Aktivierung bei einer Konzentration von 40 ng/ml am stärksten war. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einem Rückgang.

Zudem stellte sich heraus, dass eine zeitliche Abhängigkeit bei der Phosphorylierung von p-ERK durch MIF besteht. Hier zeigte sich ein maximaler Effekt bei 10 Minuten.

Western-Blot-Analysen über die Induktion der Phosphorylierung von SRC in den Endothelzellen durch MIF kamen zu dem Resultat, dass eine Stimulation mit einer Konzentration von 40 ng/ml bei 10 Minuten zu einem maximalen Effekt führen.

Des Weiteren konnte durch Western-Blots gezeigt werden, dass MIF die PI-3-Kinase-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit erhöht. Hier kam es nach 3 Minuten zur stärksten Induktion.

Die Induktion dieser Signalwege begünstigt die Arterioskleroseentstehung und somit auch das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen. Weitere Studien müssen sich nun mit der Möglichkeit auseinandersetzen, diesen Mechanismus zu verhindern, um somit das erhöhte Risiko der Patienten zu reduzieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Abedinzadeh N, Pedram B, Sadeghian Y, Nodushan SM, Gilasgar M, Darwish M, Mokarizadeh A: A pathohistological analysis of the epidemiology of coronary atherosclerosis: an autopsy study. *Diagn Pathol* 10: 87-89 (2015)
2. Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE: Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res* 93: 321-329 (2003)
3. Arteel GE, Schroeder P, Sies H: Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr* 130: 2100-2104 (2000)
4. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R: An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7849-7854 (1996)
5. Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R: MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med* 4: 217-230 (1998)
6. Bagrodia S, Taylor SJ, Shalloway D: Myristylation is required for Tyr-52 dephosphorylation and activation of pp60c-Src in mitosis. *Mol Cell Biol* 13: 1464–1470 (1993)
7. Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J: SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74: 83-91. (1993)
8. Baugh JA, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 30: 27-35 (2002)

9. Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU: Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *Faseb J* 17: 2221-2230 (2003)
10. Beckmann JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271: 1424-1437 (1996)
11. Bell DS: Inflammation, insulin resistance, infection, diabetes and atherosclerosis. *Endocr Pract* 6: 272-276 (2000)
12. Bendrat K, Al-Abed Y, Callaway DJ, Peng T, Calandra T, Metz CN, Bucala R: Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 36: 15356-15362 (1997)
13. Berndt K, Kim M, Meinhardt A, Klug J: Macrophage migration inhibitory factor does not modulate co-activation of androgen receptor by Jab1/CSN5. *Mol Cell Biochem* 41: 327-329 (2007)
14. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365: 756-759 (1993)
15. Bernhagen J, Mitchell R A, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R: Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 33: 14144-14155 (1994)
16. Blocki FA, Ellis LB, Wackett LP: MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs. *Protein Sci* 12: 2095-102 (1993)

17. Bloom BR, Bennett B: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153: 80-82 (1966)
18. Bolen JB, Rowley RB, Spana C, Tsygankov AY: The Src family of tyrosine protein kinases in hematopoietic signal transduction. *Faseb J* 6: 3403–3409 (1992)
19. Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in macrophages: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 52: 223-261 (1983)
20. Brown MS, Goldstein JL: Atherosclerosis: scavenging for receptors. *Nature* 343: 508-509 (1990)
21. Brown MT, Cooper JA: Regulation, substrates and functions of Src. *Biochem Biophys Acta* 1287: 121-149 (1996)
22. Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, Zerneck A, Bucala R, Leng L, Finkelmeier D, Geiger G, Schaefer HE, Schober A, Weber C, Brunner H, Rutten H, Ihling C, Bernhagen J: Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis* 184: 28-38 (2006)
23. Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress *Circ Res* 87: 840-844 (2000)
24. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R: The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895-1902 (1994)
25. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68-71 (1995)

26. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11383-11388 (1998)
27. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP: Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6: 164-170 (2000)
28. Calandra T, Roger T: Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 791-800 (2003)
29. Campbell JH, Campbell GR: Cell biology of atherosclerosis. *J. Hypertension* 12: 129-132 (1994)
30. Cartwright CA, Eckhart W, Simon S, Kaplan PL: Cell transformation by pp60c-Src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain. *Cell* 49: 83-91 (1987)
31. Chamberlain JC, Galton DJ: Genetic susceptibility to atherosclerosis. *British medical bulletin* 46: 917-940 (1990)
32. Cho Y, Baldan A: Quest for new biomarkers in atherosclerosis. *Mo Med* 110: 325-330 (2013)
33. Chook YM, Gray JV, Ke H, Lipscomb WN: The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J Mol Biol* 240: 476-500 (1994)

34. Copper JA, King CS: Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-Src. *Mol Cell Biol* 6: 4467-4477 (1986)
35. Cross FR, Garber EA, Pellmann D, Hanafusa H: A short sequence in the p60Src N terminus is required for p60Src myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol Cell Biol* 4: 1834-1842 (1994)
36. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927 (1999)
37. David JR: Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56: 72-77 (1966)
38. David-Pfeuty T, Bagrodia S, Shalloway D: Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src over expressed cells. *J Cell Sci* 105: 613-628 (1993)
39. Dayawansa NH, Gao XM, White DA, Dart AM, Du XY: Role of MIF in myocardial ischaemia and infarction: insight from recent clinical and experimental findings. *Clin Sci* 127: 149-161 (2014)
40. Denhardt DT: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318: 729-747 (1996)
41. Edwards AS, Scott JD: A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 12: 217-221 (2000)
42. El-Abbadi M, Giachelli CM: Arteriosclerosis, calcium phosphate deposition and cardiovascular disease in uremia: current concepts at the bench. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 519-524 (2005)

43. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA: Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4: 915-924 (1999)
44. Fagiotto A, Ross R: Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4: 341-356 (1984)
45. Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R: The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9354-9359 (2003)
46. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376 (1980)
47. Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326: 242-250 (1992)
48. Fuster V, Ross R, Topol EJ: *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia New York: 1-1450 (1996)
49. Giachelli CM: The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* 75: 890-897 (2009)
50. Gimbrone MA: Endothelial dysfunction and the pathogenesis of atherosclerosis. In: Fidge NH, Nestel PJ (eds.). *Atherosclerosis VII, Proceedings of the 7th Int. Symp. on Atherosclerosis*. Amsterdam Excerpta Medica: 367-369 (1986)

51. Gimbrone A, Tropper TN: Biology of the vessel wall: endothelium.
In: Chien KR (ed). Molecular Basis of Cardiovascular Disease. W.B. Saunders Philadelphia: 331-348 (1999)
52. Girndt J: Herz- und Kreislaufkrankheiten durch Arteriosklerose. Ursachen, Erscheinungsformen und Behandlungsmöglichkeiten. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaften, Stuttgart: 13-109 (1994)
53. Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis: the road ahead. Cell 104: 503-516 (2001)
54. Goldstein JL, Brown MS: Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. Metabolism 26: 1257-1275 (1977)
55. Gong Z, Xing S, Zheng F, Xing Q: Increased expression of macrophage migration inhibitory factor in aorta of patients with coronary atherosclerosis. J Cardiovasc Surg 56: 631-637 (2015)
56. Gross R, Schlömerich P, Gerok W: Die Innere Medizin. Hrsg. von R. Gross, P. Schölmerich, W. Gerok. 9., neubearbeitete Auflage. Stuttgart New York: Schattauer: 13-368 (1996)
57. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med 352: 1685-1695 (2005)
58. Heasley LE: Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. J Biol Chem 272: 14501-14504 (1997)
59. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Bach DH: A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. J Exp Med 190: 1375-1382 (1999)

60. Hunter T: A tail of two Src`s: mutatis mutandis. *Cell* 49: 1-4 (1997)
61. Hurlimann D, Enseleit F, Ruschitzka F: Rheumatoid arthritis, inflammation, and atherosclerosis. *Herz* 29: 760-768 (2004)
62. Isselbacher KJ, Schmailzl KJG: *Harrisons Innere Medizin*, Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin Wien, Band 1: 528-2851 (1995)
63. Ji K, Wang X, Li J, Lu Q, Wang G, Xue Y, Zhang S, Qian L, Wu W, Zhu Y, Wang L, Liao L, Tang J: Macrophage migration inhibitory factor polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory coronary heart disease. *Biomed Res Int* 10: 315-321 (2015)
64. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK: PI3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1749-1753 (2000)
65. Jung H, Kim T, Chae HZ, Kim KT, Ha H: Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J Biol Chem* 276: 15504-15510 (2001)
66. Just H, Hort W, Zeiher AM: *Arteriosclerosis. New insights into pathogenetic mechanisms and prevention*. Springer Verlag, New York: 1-128 (1994)
67. Kitani A, Nakashima N, Izumihara T: Soluble VCAM-1 induces chemotaxis of Jurkat and synovial fluid T-cells bearing high affinity very late antigen-4. *J Immunol* 161: 4931-4938 (1998)
68. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Juttner S, Brunner H, Bernhagen J: Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* 280: 85-102 (1998)

69. Kleemann R, Hauser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J: Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408: 211-216 (2000)
70. Kleemann R, Rorsmann H, Rosengren E, Mischke R, Mai NT, Bernhagen J: Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. *Eur J Biochem* 267: 7183-7193 (2000)
71. Klimiuk PA, Sierakowski S, Domyslowska I, Fiedorczyk M, Chwiecko J: Reduction of soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) and vascular endothelial growth factor levels in serum of rheumatoid arthritis patients following multiple intravenous infusions of infliximab. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52: 36-42 (2004)
72. Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L: Contribution of Src and Ras pathways in Fgf-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* 18: 3354-3364 (1999)
73. Koch AE, Shah MR, Harlow LA, Lovis RM, Pope RM: Soluble intercellular adhesion molecule-1 in arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 208-215 (1994)
74. Koga K, Kenessey A, Ojamaa K: Macrophage migration inhibitory factor antagonizes pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ* 304: 282-293 (2013)
75. Kumar P, Hosaka S, Koch AE: Soluble E-selectin induces monocyte chemotaxis through Src family tyrosine kinases. *J Biol Chem* 276: 21039-21045 (2001)

76. Kumar P, Amin MA, Harlow LA, Polverini PJ, Koch AE: Src and PI3-kinase mediate soluble E-selectin-induced angiogenesis. *Blood* 101: 3960-3968 (2003)
77. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG: Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103: 1282-1288 (2001)
78. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R: MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197: 1467-1476 (2003)
79. Libby P, Ridker PM: Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 100: 1148-1150 (1999)
80. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143 (2002)
81. Libby P: Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 83: 456-460 (2006)
82. Lowell CA, Soriano P: Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T-cells and bad memories. *Genes Dev* 10: 1845-1857 (1996)
83. London GM: Vascular disease and atherosclerosis in uremia. *Nefrologia* 25 Suppl 2: 91-95 (2005)
84. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: 1046-1051 (1986)

85. Lue H, Thiele M, Franz J, Dahl E, Speckgens S, Leng L, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Luscher B, Bernhagen J: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/Jab1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* 26: 5046-5059 (2007)
86. Lue H, Dewar M, Leng L, Bucala R, Bernhagen J: Activation of the JNK signaling pathway by macrophage migration inhibitory factor and dependence on CXCR4 and CD74. *Cell Signal* 23: 135-144 (2011)
87. Mastragelopoulos N, Haraszthy VI, Zambon JJ, Zafiroopoulos GG: Detection of periodontal pathogenic microorganisms in atheromatous plaque. *Chirurg*: 785-791 (2002)
88. Meredith IA, Yeung AC, Weidinger FF: Role of impaired endothelium dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation* 87: 56-66 (1993)
89. Metz CN, Bucala R: Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv Immunol* 66: 197-223 (1997)
90. Mischke R, Kleemann R, Brunner H, Bernhagen J: Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* 427: 85-90 (1998)
91. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R: Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 274: 18100-18106 (1999)

92. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 345-350 (2002)
93. Morand EF, Leech M, Bernhagen J: MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 5: 399-410 (2006)
94. Morel JC, Park CC, Woods JM, Koch AE: A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and PI3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem* 276: 37069-37075 (2001)
95. Morrison MC, Kleemann R: Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Associated Hepatic Co-Morbidities: A comprehensive Review of Human and Rodent. *Front Immunol* 6: 308-312 (2015)
96. Munro M, Cotran RS: The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and Inflammation. *Lab Invest* 58: 249-261 (1988)
97. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P: Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 16: 349-356 (1990)
98. Nathan CF, Karnovsky ML, David JR: Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med* 133: 1356-1376 (1971)
99. Nicholason KM, Anderson NG: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14: 318-395 (2002)

100. Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R: Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1: 781-788 (1995)
101. O'Brien KD, McDonald TD, Chait A, Allen MD, Alpers CE: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 93: 672-682 (1996)
102. Oh W, Lee EW, Sung YH, Yang MR, Ghim J, Lee HW, Song J: Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J Biol Chem* 28: 17457-17465 (2006)
103. Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K: Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 7865-7874 (2002)
104. Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, Fu H, Zhang Y, Satoskar AR, David JR, Metz CN, Bucala R, Fang K, Simon DI, Chapman HA, Libby P, Shi GP: Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 109: 3149-3153 (2004)
105. Panstruga R, Baumgarten K, Bernhagen J: Phylogeny and evolution of plant macrophage migration inhibitory factor/D-dopachrome tautomerase-like proteins. *BMC Evol Biol* 15: 64-65 (2014)
106. Pawson T: Protein modules and signaling networks. *Nature* 373: 573-579 (1995)

107. Perlmutter RM: Control of T-cell development by non-receptor protein tyrosine kinases. *Cancer Surv* 22: 85-95 (1995)
108. Petrovsky N, Socha L, Silva D, Grossman AB, Metz C, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol Cell Biol* 81: 137-143 (2003)
109. Qui Y, Robinson D, Pretlow TG, Kung HJ: Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3644-3649 (1998)
110. Resh MD: Regulation of cellular signaling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* 8: 403-412 (1996)
111. Robert-Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes 1: 54-57 (2006)
112. Roche S, Koegl M, Courtneidge SA: The phosphatidylinositol-3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, Growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9185-9189 (1994)
113. Roovers K, Davey G, Zhu X, Bottazzi ME, Assoian RK: Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell* 10: 3197-3204 (1999)
114. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 180: 1332-1340 (1973)
115. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295: 369-377 (1976)

116. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 295: 420-425 (1976)
117. Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. *Am J of Pathol* 86: 675-684 (1977)
118. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective of the 1990`s. *Nature* 362: 801-809 (1993)
119. Ross R: Growth regulatory mechanisms and formation of the lesion in Atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 748: 1-6 (1995)
120. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126 (1999)
121. Samuelson LE, Klausner RD: Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. Current research on activation via the T-cell antigen receptor. *J Biol Chem* 267: 24913-24916 (1992)
122. Sanos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF: Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 123: 309-314 (2001)
123. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, Bucala R, Weber C: Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109: 380-385 (2004)

124. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R: CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25: 595-606 (2006)
125. Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31-38 (1991)
126. Simionescu N, Simionescu M: Endothelial cell dysfunction. New York, Plenum Press:10-14 (1992)
127. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B: PI-3-kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86: 726-736 (1995)
128. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perotti D, Chan TO: Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway, *European Molecular Biology Organisation Journal* 16: 6151-6161 (1997)
129. Sary HC: Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9: 1-19 (1989)
130. Sary HC, Chandler AB, Glasgow S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of Atherosclerosis. *Circulation* 92: 1355-1374 (1995)
131. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its Atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924 (1989)

132. Steinberg D: Thematic Review series: The pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy. *J of Lipid Res* 45: 1583-1593 (2004)
133. Sugimoto H, Taniguchi M, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J: Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J Struct Biol* 120: 105-108 (1997)
134. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E: Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5191-5196 (1996)
135. Sun H, Zhang X, Zhao L, Zhen X, Huang S, Wang S, He H, Liu Z, Xu N, Yang F, Qu Z, Ma Z, Zhang C, Zhang Y, Hu Q: Attenuation of atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using gene silencing of macrophage migration inhibitory factor. *J Cell Mol Med* 19: 836-849 (2015)
136. Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell death and differentiation* 8: 515-527 (2001)
137. Suzuki H, Kanagawa H, Nishihira J: Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol Lett* 51: 141-147 (1996)
138. Taguchi T, Kiyokawa N, Sato N, Saito M, Fujimoto, J: Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp Hematol* 28: 349-351 (2000)

139. Taylor AA: Pathophysiology of hypertension and endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Endocrinol. Metab Clin North Am* 30: 983-997 (2001)
140. Toker A, Cantley LC: Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676 (1997)
141. Tokuhira M, Hosaka S, Volin MV: Soluble vascular cell adhesion molecule 1 mediation of monocyte chemotaxis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1122-1133 (2000)
142. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R: Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4782-4787 (1997)
143. Waeber G, Thompson N, Chautard T, Steinmann M, Nicod P, Pralong FP, Calandra T, Gaillard RC: Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotrophin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 12: 698-705 (1998)
144. Wahrburg U: Welche Rolle spielen die Risikofaktoren? Arteriosklerose: Risikofaktoren, Vorbeugung, Therapie. Richtige Ernährung bei erhöhtem Cholesterinspiegel. Falken Niederhausen: 16-17 (1989)
145. Watanabe H, Shimizu T, Nishihira J: Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 1676-1683 (2004)

146. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remolds HG, Clark SC, David JR: Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7522-7526 (1989)
147. White DA, Fang L, Chan W, Morand EF, Kiriazis H, Duffy SJ, Taylor AJ, Dart AM, Du XJ, Gao XM: Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells. *Plos One* 8: 76206-76209 (2013)
148. World Health Organization. Classification of atherosclerotic lesions: Report of a study group. World Health Organization Technical Report Series 143: 1-19 (1958)
149. Yao H, Cooper GM: Requirement for phosphatidylinositol-3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006 (1995)
150. Yao H, York RD, Misra-Press A, Carr DW, Stork A: The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem* 273: 8240-8247 (1998)
151. Yüksel A, Bilgir F, Bilgir O, Calan M, Bozkaya G: Increased circulating macrophage migration inhibitory factor levels are associated with coronary artery disease. *Clinics* 70: 169-172 (2015)
152. Zeng FY, Weiser WY, Kratzin H, Stahl B, Karas M, Gabius HJ: The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. *Arch Biochem Biophys* 303: 74-80 (1993)

153. Zhang M, Aman P, Grubb A, Panagopoulos I, Hindemith A, Rosengren E, Rorsman H: Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. FEBS Lett 373: 203-206 (1995)

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Daniel Walcher für jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Gespräche.

Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Vielen lieben Dank hierfür Daniel, ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Renate Durst ganz herzlich bedanken. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Für ihre immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft mir ihr großes fachspezifisches Wissen weiterzugeben, bedanke ich mich sehr.

Darüber hinaus geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, die mir das Studium der Zahnmedizin ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen. Ein ganz besonderer Dank dafür, dass sie immer das Beste für mich tun und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben.

Einen lieben Dank an meinen Bruder Julian Retzmann. Seine brüderliche Freundschaft bedeutet mir unbeschreiblich viel. Herzlichen Dank für jegliche Unterstützung und den großen Beistand, den er jederzeit zu geben bereit ist.

Ganz großen Dank an Dominik Bedau für seine unermessliche Liebe, Ruhe und Geduld, mit denen er mir stets zur Seite stand und mich immer wieder unterstützt hat.

Lebenslauf:

Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes entfernt.