

CORINNA SCHLANDER

**Die Rolle von
Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)
bei der malignen Transformation**

2007

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Die Rolle von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) bei der malignen
Transformation**

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

vorgelegt von

Corinna Schlander

aus

München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Hallek
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. S. Segerer Priv. Doz. Dr. E. Nößner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. G. Fingerle-Rowson
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Juli 2007

meinen Eltern

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Hallek für die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für den gewährten wissenschaftlichen Freiraum, sowie für seine kontinuierliche Unterstützung.

Herrn PD Dr. Günter Fingerle-Rowson gilt mein besonderer Dank für seine vielseitigen hilfreichen Ratschläge, den großzügig gewährten wissenschaftlichen Freiraum der Arbeit, die interessanten weitreichenden Diskussionen, und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Ebenso danke ich ihm für die schnelle und effektive Korrektur meiner Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hallek an der GSF und im Genzentrum, sowie den Mitarbeitern anderer Arbeitsgruppen an der GSF für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich dabei für die herzliche Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Arbeitsweise bedanken. Besonders dankbar bin ich für die Freundschaften, die sich während meiner Zeit in der GSF mit aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hallek und mit weiteren Mitarbeitern der GSF entwickelt haben. Sie haben vorallem die anstrengenden Momente mit viel Verständnis und Humor erleichtert.

Ebenso großer Dank gilt meiner lieben Familie, sowie meinen Freunden für ihr andauerndes Verständnis, ihre Geduld und ihren wundervollen Humor. Desweiteren all denjenigen aus meiner Zeit in der Schweiz, mit denen ich eine wunderbare Zeit hatte, für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und Toleranz, während ich dabei war meine Arbeit fertigzustellen.

Ein besonderes Dankeswort gilt Oliver Labisch, der mir stets eine große Hilfe war und mir den Rücken für meine wissenschaftlichen Tätigkeiten immer freihielt als auch in schweren Stunden immer ein offenes Ohr hatte und mich zu motivieren wußte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Tumorgenese	1
1.1.1	Einleitung	1
1.1.2	P53 als Regulator von Wachstum, Apoptose und Seneszenz	2
1.1.3	Die Bedeutung der Tumorforschung für die Medizin der Zukunft	2
1.2	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i> - Ein neuer Mediator der Tumorgenese?	3
1.2.1	Entdeckung von MIF	3
1.2.2	Expression im Gewebe	4
1.2.3	Organisation des MIF-Genlokus	5
1.2.4	Struktur von MIF	5
1.2.5	MIF als proinflammatorischer Mediator	8
1.2.6	MIF als Regulator der Zellproliferation, Differenzierung und Tumorentstehung	13
1.2.7	Die enzymatische Funktion von MIF	20
1.3	Genetische Ansätze für die Analyse der Funktion des MIF Gens	27
1.3.1	Einleitung	27
1.3.2	Gen Targeting bei Säugetieren	28
1.3.3	Herstellung einer MIF- <i>knockout</i> Maus	31
1.3.4	Die Mutagenese von MIF	34
1.3.5	Das Prinzip des Gentransfers in Fibroblasten	37
2	Ziele der Arbeit	40
3	Material und Methoden	41
3.1	Material	41
3.1.1	Puffer und Lösungen	41
3.1.2	Mausstämme	42
3.1.3	Zelllinien	42
3.1.4	Bakterienstämme	42

Inhaltsverzeichnis

3.1.5	Retrovirale Vektoren	42
3.1.6	Zellkulturmedien	43
3.1.7	Chemikalien, Enzyme, Antikörper	43
3.1.8	Geräte und Labormaterial	45
3.2	Methoden	46
3.2.1	Eukaryontische Zellkultur	46
3.2.2	Produktion von rekombinantem Retrovirus	48
3.2.3	Retrovirale Infektion	49
3.2.4	Kultivierung von Bakterien	50
3.2.5	Molekularbiologische Methoden	52
3.2.6	Proteinbiochemische Methoden	55
3.2.7	Proteinimmunologische Methoden	59
3.2.8	Zellbasierende Analyse-Methoden	61
3.2.9	Statistische Auswertungen	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Die mechanistische Grundlage der biologischen Aktivität von MIF	66
4.1.1	MIF ^{P8} -Mausfibroblasten haben keine enzymatische Aktivität	67
4.1.2	Analyse der malignen Transformation von MIF ^{wt} , MIF ^{ko} und MIF ^{P8} -Mausfibroblasten	68
4.1.3	Auswirkungen von extrazellulärem MIF auf die Koloniebildungsfähigkeit	73
4.1.4	Ist die maligne Transformation zwar nicht durch Prolin1 aber durch die gesamte katalytische Tasche vermittelt?	77
4.2	Vergleich der Lebensspanne und Tumorinduktion von p53 ^{ko} -Mäusen mit p53- und MIF-DKO-Mäusen	80
4.2.1	Zucht von p53 ^{-/-} und DKO-Mäusen	80
4.2.2	Verpaarung und Genotypisierung von MIF ^{flox/flox} p53 ^{-/-} -Mäusen	81
4.2.3	Lebensspanne	83
5	Diskussion	86
5.1	Sind die tumorfördernden Effekte von MIF durch p53 vermittelt?	87
5.2	Die Bedeutung von MIF in der malignen Transformation	90
5.3	Die Tautomeraseaktivität von MIF entspricht nicht der biologischen Aktivität von MIF	92
5.4	Ist intra- oder extrazelluläres MIF bei der malignen Transformation aktiv?	94
5.5	Die hochkonservierte Tasche von MIF, nicht aber Prolin1 vermittelt die maligne Transformation	95

6 Zusammenfassung	97
7 Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

1.1 Das MIF Gen	5
1.2 MIF Monomer und Trimer.	7
1.3 MIF als Glukokortikoid Antagonist	12
1.4 Koloniegröße der MIF ^{wt} und MIF ^{ko} MEFs.	19
1.5 Die Umwandlung von D-Dopachrom durch MIF und D-Dopachrom Tautomerase	21
1.6 MIF katalysiert die Keto-Enol-Isomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat	21
1.8 Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen MIF, 4-OT und CHMI.	22
1.7 Elektrostatisches Potential des MIF Monomers und Trimers.	23
1.9 3D- Darstellung der evolutionär konservierten Aminosäuren im MIF Monomer	24
1.10 p-Hydroxy-phenylpyruvat im aktiven Zentrum von MIF.	26
1.11 Die LoxP Sequenz- Sequenzierung und Orientierung	29
1.12 Cre/loxP Aktivitäten	30
1.14 Teil eins des Gentergeting: Kreation des <i>targeting</i> Vektors und Identifikation homologer ES-Klone.	32
1.13 Teil zwei des Gentergeting: Transiente Cre-Transfektion und Selektion von <i>floxed</i> und MIF-defizienten Mäusen	33
1.15 Strategie zur Mutation von MIF	35
1.16 Die Mutagenese des MIF-Gens	36
4.1 Expression des mutierten MIF-Protein	67
4.2 Die Aktivität der Tautomerase von rekombinantem murinen MIF	68
4.3 Transfektion von Phoenixzellen mittels REBNA-GFP in der Fluoreszenzmikroskopie	69
4.4 Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Durchflußzytometrie (FACS)	69
4.5 Kontrolle der Effizienz der Infektion mit E1A und H-ras	70
4.6 Die Morphologie der Kolonien der ko-Mutanten im Rahmen der malignen Transformation unterscheidet sich deutlich von der der wt- und pg-Mutanten.	71

Tabellenverzeichnis

4.7	MIF ^{Pg} -MEFs sind in ihrer Transformationsfähigkeit vergleichbar mit MIF ^{wt} -MEFs	72
4.8	Die Zellzahl der transformierten MIF ^{wt} , MIF ^{ko} und MIF ^{Pg} -MEFs nach retroviraler Infektion.	73
4.9	Der Phänotyp der transformierten MIF ^{wt} -Mutanten im Rahmen der malignen Transformation	75
4.10	Der Phänotyp der MIF ^{ko} -Mutanten im Rahmen der malignen Transformation	76
4.11	Bestimmung der Zytotoxizitätsgrenze von ISO-1 im MTT- <i>assay</i>	78
4.12	Bestimmung der Kolonienzahl bei malignen MIF ^{+/+} - und malignen MIF ^{-/-} -Fibroblasten nach Zugabe von ISO-1	79
4.13	Bestimmung der p53 ^{wt} und p53 ^{ko} -Allele mittels PCR	81
4.14	Genotypisierung der MIF ^{ko} Maus mittels PCR	82
4.15	Genotypisierung der MIF ^{flox} -Maus mittels PCR.	83
4.16	Lebensspanne der DKO und MIF ^{flox/flox} p53 ^{-/-} Maus.	84
5.1	Mögliche Wirkungsweise von MIF über Jab-1	89

Tabellenverzeichnis

3.1	Antikörper	45
3.2	PCR Protokoll für MIF ^{floxed} und MIF ^{wt}	53
3.3	PCR Protokoll für p53 ^{wt} und p53 ^{ko}	54
3.4	Zusammensetzung des Tris-Puffers	58
3.5	Zusammensetzung der <i>Stripping</i> -Lösung	61
4.1	Kolonieanzahl auf gleichem genetischen Hintergrund	72
4.2	Anzahl der MIF ^{wt} -Kolonien auf genetisch unterschiedlichen Hintergründen	74
4.3	Kolonieanzahl der MIF ^{ko} -MEFs auf genetisch unterschiedlichen Hintergründen	76
4.4	Kolonienanzahl nach Zugabe von ISO-1	79
4.5	Vergleich der Lebensspannen	83

Abkürzungen und Vereinbarungen

AD	Adenovirus
AP-1	Aktivator Protein-1
cAMP	cyclic AMP
CDK	Cyclin dependent kinase
CK-1	Cytokin- 1
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
CRE	cAMP responsive element
DDT	D-Dopachrom Tautomerase
DKO	double knockout (MIF ^{-/-} und zugleich p53 ^{-/-})
DNA	Desoxyribonucleic acid
dsRNA	Doppelstrang RNA
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase
ES-Zellen	embryonische Stammzellen
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FFA	focus formation assay
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GIF	glycosylation inhibition factor
ICAM-1	intercellular adhesion molecule- 1
ISO-1	(S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5-isoxazol- essigsäuremethylester
JAB-1	c- Jun activation binding protein-1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	MIF knockout, MIF defiziente Maus
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen- aktivierte Proteinkinase
MDM2	murine double minute Gene 2
MEF	murine embryonische Fibroblasten
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MIF ^{+/+}	MIF Wildtyp
MIF ^{-/-}	MIF Knockout
NC	Negativkontrolle
nGRE	negative glucocorticoid responsive element
NFkB	nukleäre Faktor-kB-Sequenz
NGF	nerve growth factor

p53 ^{+/+}	p53 Wildtyp
p53 ^{+/-}	p53 Heterozygot
p53 ^{-/-}	p53 Knockout
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PC	Phönix Zellen
PG	P1G, Mutation von Prolin1 zu Glycin in MIF
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RB	Retinoblastom Protein
rMIF	rekombinantes MIF
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
TK	Thymidinkinase Gen
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
WT	MIF Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Tumorgenese

1.1.1 Einleitung

Im Wandel der Zeit, in der sich die durchschnittliche Lebenserwartung durch den medizinischen Fortschritt kontinuierlich erhöht, gewinnen neoplastische Krankheiten immer mehr an Bedeutung. So begrenzten früher eher jene Krankheiten aus dem Formenkreis der Infektionen die Lebenszeit vieler Menschen. Mit der Entdeckung der Penicilline bzw. der Antibiotika durch Alexander Fleming und der Einführung wichtiger Hygienemaßnahmen durch Ignaz Semmelweis, Robert Koch und Louis Pasteur rücken diese Erkrankungen jedoch zunehmend in den Hintergrund und gelten nicht mehr als limitierend für das Leben der Menschen. Mit der daraus resultierenden stetig steigenden Lebenserwartung nimmt auch die Zahl der Tumoren stetig zu.

Mögliche Erklärungen für das häufigere Auftreten von Tumoren stellen neben der Entwicklung verbesserter Methoden zur Diagnostik und Früherkennung im Wesentlichen die Häufung von DNA Schäden und die höhere Wahrscheinlichkeit für Neumutationen durch häufigere Zellteilung im Laufe des verlängerten Lebens dar. Obwohl einige Tumorarten bereits im jungen Alter auftreten, wie zum Beispiel die akute lymphatische Leukämie, so finden sich doch in der Mehrzahl der Fälle erst im hohen Lebensalter Tumore. Hier sind zum Beispiel das Prostatakarzinom, das Bronchialkarzinom und das kolorektale Karzinom als wichtige Vertreter von Tumoren zu nennen, welche bevorzugt im höheren Lebensalter in Erscheinung treten. Die Ursachen der Tumorentstehung sind vielfältig: Die immer wieder und wieder stattfindende Zellteilung mit daraus entstehenden möglichen Mutationen von Genen kann - falls wachstumsregulierende Gene betroffen sind- zu einem Entgleisen der normalerweise streng kontrollierten Proliferation führen. Das maligne Melanom stellt ein gutes Beispiel dar, bei welchem ein Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und UV-Licht besteht. Auch chemische Noxen spielen eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung, ebenfalls durch den Mechanismus der DNA-Schädigung. So findet man zum Beispiel vermehrt Leukämien bei Personen, welche über einen gewissen Zeitraum Benzol exponiert waren.

Da jedoch nicht alle Schäden der DNA sofort zur Entstehung eines Tumors führen, muss es Mechanismen in jeder Körperzelle geben, welche diese Schäden einerseits er-

1 Einleitung

kennen, und andererseits die fehlerhafte DNA entweder reparieren oder die betroffene DNA oder Zelle eliminieren können. Hierfür haben die Zellen ein komplexes Netzwerk aus Signaltransduktoren und Effektoren entwickelt, welche den DNA-Schaden aufspüren und eine Reaktion in Gang setzen.

1.1.2 P53 als Regulator von Wachstum, Apoptose und Seneszenz

Sobald eine Zelle einen DNA-Schaden erleidet, beginnt eine Reihe von Reaktionen, um den Schaden schnellstmöglich zu begrenzen. Zunächst erkennen gewisse Proteine die geschädigte DNA, woraufhin dieses Stück der DNA mittels Endonukleasen herausgeschnitten wird. Stattdessen wird an dieser Stelle von DNA-Polymerasen eine neue Sequenz synthetisiert und durch Ligasen mit dem Rest der DNA verbunden. Dieser Vorgang entspricht dem sogenannten Basenexzisionsreparatur-Mechanismus. Somit wird verhindert, dass mutierte DNA vervielfältigt wird. Was passiert jedoch, wenn die fehlerhafte DNA nicht eliminiert wird? DNA-Schäden können dann eine Kaskade von Reaktionen auslösen, welche zum Wachstumsstopp und zur Selbstzerstörung der Zelle führen. Diese Vorgänge werden in ihrer Gesamtheit als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet. Wenn jene Gene mutiert werden, welche eine wichtige Aufgabe in der sehr genau strukturierten Regulation der Zellproliferation besitzen, können die betroffenen Zellen unkontrolliert proliferieren. Ein maligner Tumor entsteht, der ohne adäquate Therapie das Leben eines Menschen limitiert.

Der Tumorsuppressor p53 besitzt eine Schlüsselrolle in den Mechanismen der Wachstumshemmung und der durch DNA-Schäden verursachten Apoptose [41, 86, 96, 110, 119, 199]. Hinzu kommt, dass p53 ebenso das Eintreten der Zellen in Seneszenz bewirkt. Dieser Prozeß besitzt enorme Bedeutung, da er Zellen davor schützt, dass diese sich zu häufig teilen. Denn bei jedem Teilen der Zelle besteht potentiell die Gefahr, dass Fehler oder Mutationen auftreten, welche tumorfördernd wirken könnten. Ein interessanter Ansatzpunkt stellt also die Identifizierung von Proteinen dar, welche auf die p53 Aktivität Einfluß haben, oder anderweitig auf den Zellzyklus und die Zellteilung wirken.

1.1.3 Die Bedeutung der Tumorforschung für die Medizin der Zukunft

Statistische Berechnungen zeigen, dass in circa zehn Jahren Tumorerkrankungen die Herz-Kreislaufkrankungen als die häufigsten Todesursachen ablösen werden. Es ist daher von besonderem medizinischen Interesse diese Krankheitsbilder näher zu erforschen, besonders deren Entstehung auf molekularer Ebene, um neue Therapiekonzepte zu entwickeln oder sogar eine Heilung zu ermöglichen. Dass Erkrankungen durch erbliche Defekte von am Stoffwechsel beteiligten Enzymen zustande kommen, wurde zu

1 Einleitung

Beginn des 20. Jahrhunderts, besonders durch die Untersuchungen von Archibald E. Garrod klar [105]. Inzwischen nimmt die Kenntnis der Erkrankungen, die durch ererbte oder erworbene Defekte der gene spezifischer Proteine ausgelöst werden, aufgrund der immer weiter fortschreitenden Analyse des humanen Genoms ständig zu [105]. Im Prinzip kann jedes der circa 100000 Gene des humanen Genoms von einer Mutation betroffen sein, womit auch alle Genprodukte befallen sein können [105]. Mit der neuen Ära der Molekularbiologie und Gentechnik ist hier eine wichtige Voraussetzung geschaffen. Somit ist es nun möglich, ganz neue Ansätze und ein komplett neues Verständnis im Bereich der Tumorentstehung aufzubauen. Anhand von Genanalysen wird es möglich, bestimmte Erkrankungen und Prädispositionen zu ermitteln und so präventiv oder frühzeitig zu reagieren. Dies kommt bereits in einigen Tumorarten, wie der chronisch lymphatischen Leukämie, dem Retinoblastom und der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) zum Tragen. Bei der CLL werden zunehmend genetische Prognosefaktoren zur Abschätzung des Progressionsrisikos und der Behandlungsbedürftigkeit herangezogen. Bei der FAP können Gendefekte des APC-Gens bereits vor Ausbruch der Krankheit identifiziert werden, was zur Früherkennung und frühzeitigen Therapie ausgenutzt werden kann.

Proteine zu finden, welche in diesen Prozeß der Tumorgenese eingreifen, ist weiterhin die Aufgabe der Zeit, um in der Zukunft therapeutisch in den Verlauf der Tumorentstehung eingreifen zu können. *Macrophage migration inhibitory factor* ist eines dieser Proteine, welches eine wichtige Rolle spielt, in der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen [191]. Durch eine Reihe von Effekten auf die Signaltransduktion reguliert dieses Protein die Tumorgenese. Diese Arbeit untersucht die Rolle von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) bei der malignen Transformation von Zellen.

1.2 *Macrophage migration inhibitory factor*- Ein neuer Mediator der Tumorgenese?

1.2.1 Entdeckung von MIF

Barry Bloom und John David isolierten 1966 unabhängig voneinander ein Protein aus Antigen-sensibilisierten Lymphozytenkulturen, welches dazu fähig war, aus weiter Entfernung vom Zielort die zufällige Bewegung und Migration von Phagozyten zu inhibieren [22,45]. Diese Aktivität weckte verständlicherweise das Interesse bei Immunologen und somit war dieses Protein eines der ersten löslichen Zytokine, welches *in vitro* untersucht werden konnte. Dieses Molekül wurde *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) benannt. In den folgenden 20 Jahren konnte gezeigt werden, dass MIF sowohl

1 Einleitung

die Phagozytose, die Adhärenz und die Motilität von Makrophagen verändern kann, als auch die tumorizidale Aktivität von Makrophagen gegenüber Tumoren erhöhen kann [39,137,138].

1989 wurde humanes MIF geklont und die molekulare Analyse der biologischen, biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften dieses Proteins konnte beginnen.

1.2.2 Expression im Gewebe

Das MIF Protein und die mRNA wurden in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen entdeckt. MIF scheint in den meisten Geweben, konstitutiv exprimiert zu werden und es kann ebenso durch eine große Vielzahl von Stimuli, die in zellulärem Kontext stehen, induziert werden.

Die Expression von MIF kann schon zu Beginn des Lebens nachgewiesen werden. *Kobayashi et al.* befaßten sich mit der Expression von MIF mRNA während der Embryogenese bei Mäusen und zeigten, dass MIF während der Embryonalentwicklung parallel zur Gewebsspezifizierung und Organogenese exprimiert wird [92]. MIF mRNA konnte in Somiten, in Knorpelvorstufen von Rippen und Wirbelkörpern, im Bronchialbaum, in den Extremitätenanlagen, im neuronalen Gewebe, in allen Muskelzelltypen und während der Organogenese der Leber, der Nieren, der Hoden, der Haut, des Gastrointestinaltrakts, der Nebenniere und des Pankreas nachgewiesen werden [92,173]. MIF wurde in der Evolutionsgeschichte auffallend stark konserviert. So fand man entsprechende Gene, welche für Homologe des humanen MIFs kodieren in diversen Spezies, wie zum Beispiel Vertebraten, Wurmarten (*Caenorhabditis elegans* [122]), Insekten (*Amblyomma americanum* [81]), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* [176]), und sogar in einzellulären Eukaryoten, welche zum Beispiel *Entamoeba histolytica* und *Gardia intestinalis* beinhalten.

Das breite Expressionsmuster von MIF während der Embryogenese bleibt während des postnatalen Stadiums bestehen. MIF Protein konnte im Serum und im Plasma nachgewiesen werden. Dieses lösliche MIF kann in einer Vielzahl von Geweben entstehen, in welchem MIF exprimiert wird. Früher nahm man an, dass MIF ein Produkt von aktivierten T-Lymphozyten sei [45]. Heute jedoch weiß man durch immunohistochemische Aufarbeitung einer breiten Anzahl von Geweben, dass MIF ein breites Expressionsmuster zeigt [12,45]. MIF wird in den Zellen des Immunsystems exprimiert, wie zum Beispiel in Monozyten/Makrophagen [31], T- und B-Lymphozyten [13,178], in NK Zellen [6], Basophilen/Mastzellen [35] und auch in Eosinophilen [152]. Desweiteren fand man heraus, dass endokrine Organe wie der Hypophysenvorderlappen [19], die Nebennierenrinde, die Leydigzellen des Hodens, die Epithelzellen des Epididymis sowie

1 Einleitung

die beta-Zellen des Pankreas [188] Produktionsorte von MIF sind [12]. Weitere Produktionsorte von MIF stellen Muskelzellen [17], gastrale Parietalzellen [95], Keratinozyten und Fibroblasten [1], Hepatozyten, sowie periphere und zentrale Neuronen dar [11]. MIF konnte sogar in Erythrozyten nachgewiesen werden [132], obwohl diese Daten auch durch leukozytäre Kontamination oder durch Membran gebundenes MIF entstanden sein könnten.

1.2.3 Organisation des MIF-Genlokus

Das MIF-Gen der Maus befindet sich auf dem Chromosom 10 [26, 129], wohingegen das menschliche MIF-Gen auf dem Chromosom 22q11.2 lokalisiert ist [29]. Beide Gene sind sehr klein (ungefähr 1,7 Kb groß) und zeigen eine ähnliche Exon-Intron Abfolge (drei Exons). Die Sequenzidentität in den MIF RNA Transkriptionsprodukten zwischen Maus und Mensch ist sehr hoch (beachtliche 70,4, 86,4 und 67,5 % für die Exons 1, 2 und 3). Man entdeckte auch Consensus Sequenzen, welche für die Regulation der Transkription des MIF-Gens wichtig zu sein scheinen (siehe Abbildung 1.1) [129]. Sowohl im MIF-Gen der Maus als auch im menschlichen MIF-Gen existieren einige *Enhancer* oder regulatorische Bindedomänen in den Promoterregionen [118, 144]. Hier sind Enhancersequenzen, die in der basalen Expression des Protoonkogens *c-fos* impliziert sind, eine SP-1 Sequenz, ein *cAMP responsive element* (CRE), eine AP-2 Sequenz und ein möglicherweise negatives *glucocorticoid responsive element* (nGRE) zu nennen. Desweiteren befindet sich weiter stromaufwärts im Bereich des Minus DNA Strangs eine Cytokin-1 (CK-1) und eine nukleäre Faktor- κ B(NF- κ B)-Sequenz.

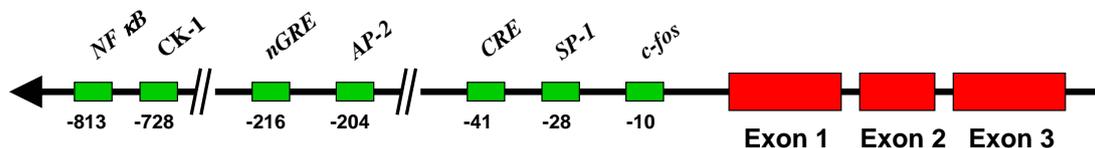


Abbildung 1.1: Das MIF-Gen. Das MIF-Gen besitzt drei Exons, welche durch kleine Introns voneinander getrennt sind. In der Promoterregion gibt es einige Transkriptionsfaktor-Bindestellen, wie zum Beispiel das Protoonkogen *c-fos* (-10 bis -18), SP-1 (-28 bis -37), ein *cAMP responsive element* (CRE, -41 bis -48), eine AP-2 Sequenz (-204 bis -213), und ein Glucocorticoid negativ regulierendes Element (nGRE, -216 bis -224). Weiter aufwärts befinden sich eine Cytokin-1 Sequenz (CK-1, von -728 bis -737) und eine nukleäre Faktor- κ B-Sequenz (NF κ B, -813 bis -821).

1.2.4 Struktur von MIF

Menschliche und murine MIF cDNA aus Jurkat T Zellen [124], dem Gehirn [144] und AtT-20 Zellen der Hypophyse [20] wurden geklont und die rekombinanten Proteine

1 Einleitung

exprimiert. In beiden Spezies besteht das Protein aus 115 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 12,5 kDa. Nach postrationaler Entfernung des Initiations-Methionins besetzt ein Prolin Position 1 des reifen Proteins. Eine auf NMR Daten basierende Strukturlösung wurde von *Ross et al.* [127] publiziert. Darüber hinaus konnte die Struktur von menschlichem und Ratten MIF durch Röntgendiffraktometrie bestimmt werden [87, 169, 172]. Die Röntgenstrukturanalysen mit einer Auflösung von 2,60 Å zeigen, dass MIF als Trimer identischer Untereinheiten mit Ausmaßen von ca. $35 \times 50 \times 50$ Å vorliegt. Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite zeigt die Struktur des Monomers und des Trimers. Die Monomere bestehen aus jeweils zwei antiparallel ausgerichteten α -Helices und sechs β -Strängen, von denen vier ein gemischtes Faltblatt bilden. Drei Monomere fügen sich dabei so zusammen, dass eine α/β -Struktur aus drei β -Faltblattabschnitten entsteht, welche von sechs α -Helices umgeben ist und einen für Flüssigkeit durchlässigen Kanal bildet. Für ein eukaryontisches Protein ist die parallele Ausrichtung der Faltblätter höchst ungewöhnlich. Das Trimer wird durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den β -Faltblättern und zwischen einer der Helices und dem Carboxylterminus (C-Terminus) stabilisiert. Eine besonders hydrophobe Region, welche einen Großteil des Leucins enthält, wird ebenfalls durch mehrere Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das ungewöhnlichste Strukturelement von MIF ist wahrscheinlich der wasserdurchlässige Kanal in der Mitte des Proteins. Der Durchmesser des Kanals beträgt an seiner engsten Stelle zwischen 3 und 4 Å und weitet sich an den Enden auf etwa 15 Å auf. Potentialberechnungen deuten darauf hin, dass der Kanal eine positiv geladene Region beinhaltet, welche wahrscheinlich in der Lage ist mit negativ geladenen Molekülen zu reagieren.

Die interessante Frage ob MIF posttranslational modifiziert wird, ist bisher noch ungeklärt. Obwohl in der Primärstruktur zwei potentielle Angriffsmöglichkeiten für N-Glykosylierungen identifiziert wurden, konnte in massenspektrometrischen Untersuchungen an aus Leberzellen gewonnenem und gereinigtem, nativem MIF keine Hinweise auf kovalente, postrationale Modifikationen gefunden werden [20]. Dennoch zeigte eine Untersuchung mittels zweidimensionalem Immunoblotting, isoelektrische Formen von MIF mit pI Werten von 7,8 und 6,98 in menschlichem Leber- und Brustgewebe, in menschlichen T47D Brustkrebszellen und in rekombinantem humanem MIF aus *E. Coli*. [117]. Dieser Ladungsunterschied könnte von einer postrationalen Modifikation herrühren, aber wahrscheinlicher durch zufällige Oxidation von Cystein- oder Methioninresten zustande kommen. Der chemische Hintergrund dieser Modifikation ist bisher ungeklärt. Studien an *glycosylation-inhibiting factor* (GIF), einem mit MIF identischen Protein, lieferten weitere Hinweise auf eine postrationale Modifikation von MIF.

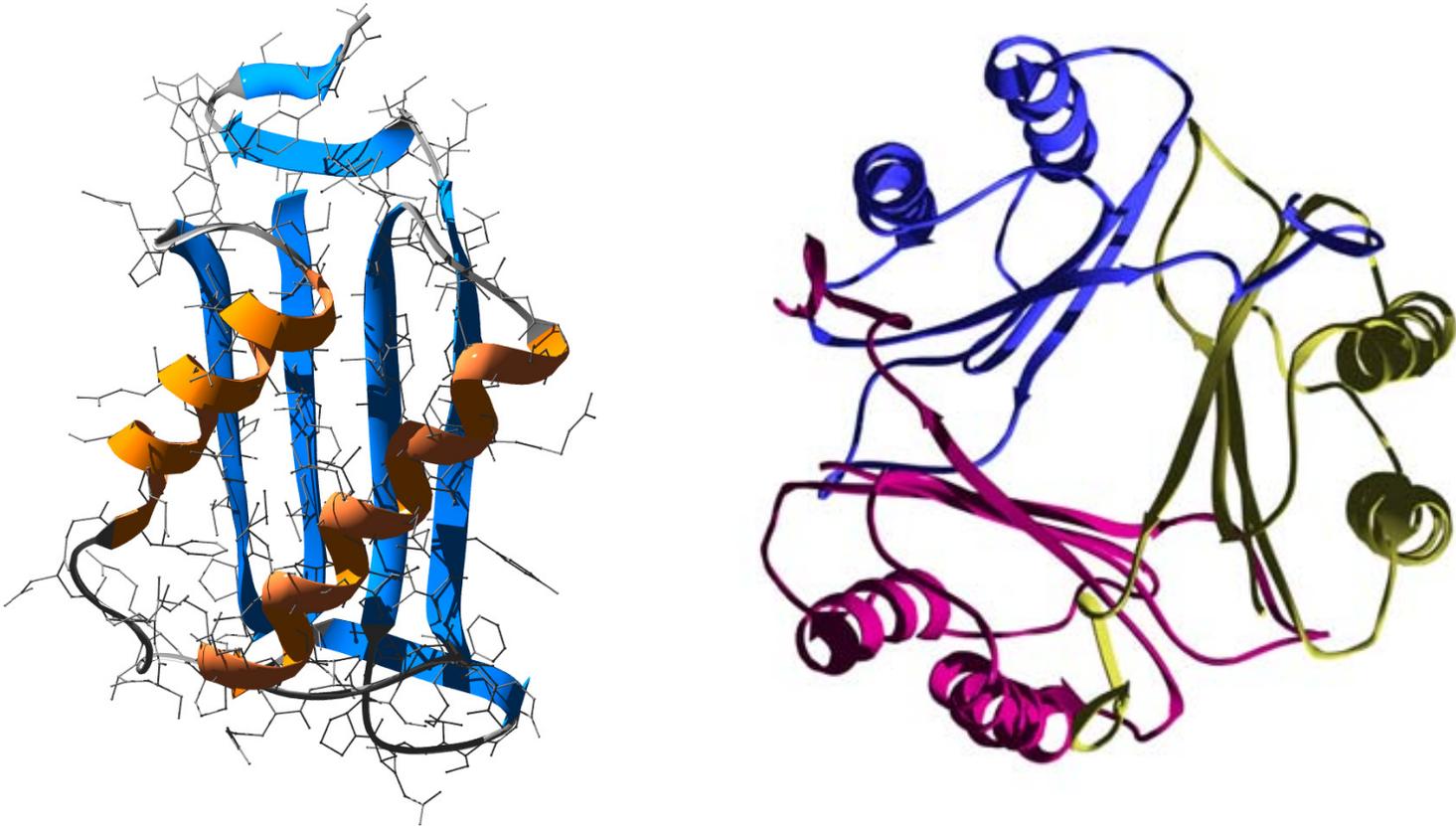


Abbildung 1.2: MIF Monomer und Trimer. Die Abbildung des Monomers erfolgt in Anlehnung an Kleemann et al. [91]

1 Einleitung

Eine stabile Transfektion von menschlichem GIF in einer Maus Supressor T- hybridoma Zelllinie enthält im Cytosol biologisch inaktives GIF und sezerniert aktives hGIF. Zwar konnte in zweidimensionalen Elektrophoreseexperimenten eine Ladungsheterogenität festgestellt werden, jedoch war es nicht möglich, diese Spezies hinsichtlich Masse, N-Glykosidierungs- oder Phosphorylierungsgrad zu unterscheiden [108]. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in einer konformationellen Änderung des Proteins begründet.

Die Aminosäuresequenz von MIF enthält drei reduzierte Cysteinreste, Cys-57, Cys-60 und Cys-81, welche die Proteinkonformation auf verschiedene Arten beeinflussen können. Cystein ist in der Lage, Disulfidbrücken zwischen oder innerhalb der einzelnen Stränge zu bilden. Cysteine in einer CysXXCys Sequenz können Bindungen zwischen zwei Proteinen vermitteln [184] oder aber Metallkationen koordinieren welche ihrerseits Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen können [63].

Alle bisher beschriebenen MIF Proteine lassen eine Führungssequenz vermissen und werden auf eine unkonventionelle Weise, nämlich über einen ABC-Transporter unabhängig vom Golgi-Apparat von Zellen sezerniert. Es gibt Hinweise darauf, dass auch andere Proteine ohne Signalpeptidsequenz wie z. B. IL-1 β , *basic fibroblast growth factor* (bFGF) oder Thioredoxin unabhängig vom ER/Golgi Pfad sezerniert werden [4, 153].

1.2.5 MIF als proinflammatorischer Mediator

Unter normalen Bedingungen stellt die Entzündungsreaktion eine Art Schutzmechanismus des Körpers dar. Hierdurch kann der Organismus sowohl Antigene und infizierende Partikel als auch das verletzte, infizierte körpereigene Gewebe selbst eliminieren. Die Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch eine Dilatation von Blutgefäßen mit erhöhter Permeabilität und erhöhter Durchblutung, die Freisetzung gewebsaktiver Plasmaproteine und die Anflutung von Leukozyten (Makrophagen, Granulozyten) an den Ort des Geschehens. Jene Entzündungszellen setzen als Reaktion auf die Entzündung eine Reihe von Gewebsmediatoren frei, wie beispielsweise Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und Prostaglandine aber auch Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α , welche alle samt eine ganz bestimmte Aufgabe sowohl am Ort des Geschehens wie auch systemisch besitzen. Wie wichtig jeder einzelne Schritt und vor allem das Zusammenspiel der einzelnen Mediatoren im Rahmen der Entzündung ist, zeigt sich am Beispiel immunsuprimierter Menschen, welche aufgrund von mangelndem körpereigenen Schutz unter einer Vielzahl von Infektionen leiden, welche meist sogar stärker ausgeprägt sind als beim immunkompetenten Individuum.

Monozyten und Makrophagen besitzen die Fähigkeit, innerhalb des Gewebes zu wandern, zu phagozytieren und die Immunantwort des Organismus zu initiieren. Des-

1 Einleitung

weitem sind sie eine bedeutende Quelle für MIF [31], da sie eine große Menge an präformiertem MIF-Protein und MIF mRNA sogar im nichtstimulierten Stadium enthalten. Die Stimulation von Makrophagen durch verschiedenste Moleküle, wie zum Beispiel Endotoxin gramnegativer Keime (LPS), Exotoxin grampositiver Bakterien (*toxic shock syndrome toxin1* TSST-1) und durch Zytokine wie IFN- γ und TNF- α führt zur erhöhten Freisetzung von MIF.

Die Bedeutung von MIF bei entzündlichen Erkrankungen

Es ist bekannt, dass MIF sowohl eine bedeutende Rolle im akuten als auch im chronischen und autoimmun bedingten Entzündungsgeschehen spielt. Eine gute Zusammenfassung über die Rolle von MIF in entzündlichen Erkrankungen erstellten kürzlich *Froidevaux et al.* [64]. So fand man interessanterweise eine erhöhte Expression von MIF bei der gramnegativen bakteriellen Sepsis, wohingegen man die betroffenen Mäuse durch Gabe von MIF-Antikörpern vor einer lethalen bakteriellen Peritonitis schützen konnte [114]. Auch im Rahmen der Immunantwort auf Exotoxine grampositiver Bakterien konnte eine Erhöhung des MIF-Levels beobachtet werden [33]. Auch hier fand man eine wesentlich geringere Reaktion der Lymphozyten und damit eine geringere Immunreaktion nach Gabe von Anti-MIF [33].

Bei den chronischen Entzündungen ist die Rolle von MIF besonders bei der rheumatoiden Arthritis sehr gut untersucht. So konnten *Mikulowska et al.* [128] in einem etablierten Mausmodell mit Typ-II Kollagen-induzierter Arthritis zeigen, dass anti-MIF mAbs die entzündungsbedingte Immunantwort weitgehend zu unterdrücken vermochte. Diese Rolle von MIF wurde in einem entsprechenden Rattenmodell und in einem weiteren Mausmodell mit Antigen-induzierter Arthritis bestätigt [101,102]. Somit führte die Gabe von anti-MIF sowohl zu einem verzögerten Einsetzen der rheumatoiden Arthritis als auch zu einer signifikant geringeren Ausprägung der Krankheit [128]. Auch bei chronischen Darmerkrankungen wie der *Colitis ulcerosa* korrelieren die MIF-Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität [46].

MIF induziert Zytokine

Zytokine, wie z. B. TNF- α oder IL-1 sind essentielle Mediatoren, welche beim Entzündungsprozess vermehrt freigesetzt werden und wichtige Informationen und Signale in der körpereigenen Abwehr, sowohl auf zellulärer als auch humoraler Ebene vermitteln. So zeigen Zellen, die mit Anti-Zytokin-Ansätzen behandelt werden ein Ungleichgewicht der natürlichen Abwehr gegen Infektionen [32]. MIF scheint ein solcher Entzündungsmediator zu sein.

Die Rolle von MIF bei der akuten Entzündung wurde zuerst an einem experimentell

1 Einleitung

induzierten Endotoxinämie-Mausmodell untersucht. Die Stimulation durch mikrobielles Endotoxin, wie es im Rahmen des Endotoxin-Schocks stattfindet, führt zur Ausschüttung von MIF durch Hypophysenzellen, Parenchym- und Immunzellen. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass MIF genau wie die Zytokine TNF- α und IL-1 ein wichtiger Mediator im Rahmen des Endotoxin bedingten Schocks zu sein scheint [51].

Ebenso lieferten *Donnelly et al.* [52] einen Beweis dafür, dass MIF eine Rolle bei entzündlichen Lungenerkrankungen spielt. So fand man signifikante Mengen an MIF im alveolären Raum von Patienten, welche an einem adult respiratory distress syndrome (ARDS) litten [52]. Ausserdem bewirkte MIF seinerseits eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Proteine wie TNF- α und IL-8, wohingegen die Gabe von anti-MIF mAbs zu einer verminderten Sekretion der Zytokine TNF- α und IL-8 führte [52]. Diese Ergebnisse lassen Grund zur Hypothese, dass MIF ein Zielmolekül für die Therapie entzündlicher Erkrankungen sein könnte [12, 18, 19].

MIF induziert Adhäsionsmoleküle

Die prominente Rolle von MIF bei der Arthritis gab Grund zur Annahme, dass MIF eine wichtige Funktion bei Autoimmunkrankheiten inne hat. *Lan et al.* [98] testeten ein Rattenmodell mit einer immunologisch induzierten anti-glomerulären Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-Nephritis) und zeigten, dass MIF auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese immunologisch bedingter Glomerulonephritiden spielt. Indem Ratten mit anti-MIF mAbs behandelt wurden, konnten schwere segmentale Läsionen der Glomeruli verhindert und zunächst eine erniedrigte Infiltration der Glomeruli mit Makrophagen und T- Zellen erreicht werden, desweiteren aber auch eine verminderte Aktivität jener. Diese Hemmung der leukozytären Infiltration war begleitet von einer reduzierten interstitiellen und glomerulären Expression des *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und des *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Die Zugabe von anti-MIF bewirkte eine Inhibition der IL-1 β Expression sowohl bei intrinsischen Nierenzellen als auch bei Makrophagen [98].

Seit einigen Jahren ist die Artherosklerose als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand durch beispielsweise permanente Druckschädigung charakterisiert. Hierbei scheint laut *Lin et al.* [107], ein Zusammenhang zwischen MIF und der Artherosklerose zu bestehen. So konnte in der initialen Phase der Artherogenese in Kaninchen eine *de novo* Expression von MIF durch *vascular endothelial Cells* (VEC's) und Muskelzellen beschrieben werden [107]. Auch hier führte die Sekretion von MIF zur vermehrten Expression von ICAM-1, welches die Adhäsion der Monozyten fördert [107].

MIF als Glukokortikoid-Antagonist

Glukokortikoide entfalten einen großen Teil ihrer antiinflammatorischen Wirkung, indem sie die Produktion inflammatorischer Mediatoren hemmen. Entgegen der Erwartung im Bezug auf seine Wirkung, induzierten Glukokortikoide jedoch die MIF Sekretion statt diese zu hemmen [30]. Diese MIF Sekretion konnte sowohl durch Gabe geringer Konzentrationen des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason als auch durch Gabe von Hydrocortison, welches das endogene Glukokortikoid des Menschen darstellt, herbeigeführt werden. Während man in Zellkulturen mit RAW264.7 Makrophagen drei Stunden nach Zugabe von Dexamethason eine MIF Freisetzung vorfand, so trat bei *in vivo* Experimenten mit katheterisierten Ratten, welchen Dexamethason in einer Konzentration von 1–10 mg/kg injiziert wurde, eine vorübergehende Serum MIF Erhöhung zwischen drei und neun Stunden nach der Injektion auf. Eine kontrollierte Stressinduktion führte ebenso nach 3–4,5 Stunden nach der Stressinduktion zu einer signifikanten Erhöhung des Serum MIFs. Interessanterweise fanden *Calandra et al.* heraus, dass MIF die Wirkung der Glukokortikoide *in vivo* und *in vitro* inhibiert. Glukokortikoide blockierten in PBMC, die mit LPS stimuliert wurden, die darauffolgende Zytokinproduktion. Eine Vorbehandlung der Zellen mit MIF (0,01–1 ng/ml) konnte diese Wirkung aufheben und es konnten wieder Cytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 hergestellt werden (siehe Abbildung 1.3 auf der nächsten Seite). Die gegenregulatorische Wirkung von MIF auf die Glukokortikoidaktivität, die sich *in vitro* beobachten ließ, ist sehr wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus in der Funktion von MIF bei der Endotoxin-induzierten Letalität. Die frühe Gabe von Glukokortikoiden kann einen Organismus vor den letalen Effekten einer Endotoxinämie schützen. Die Koinjektion von rekombinantem MIF und Glukokortikoiden vor der Freisetzung von LPS schränkte die protektive Wirkung der Glukokortikoide ein [30] und zeigte ausserdem die physiologische Bedeutung der Glukokortikoid-MIF Interaktion.

Das gegenregulatorische Konzept von Glukokortikoiden und MIF bewahrheitet sich ebenfalls bei T-Zellen. MIF besitzt auch hier die Fähigkeit, die inhibitorischen Effekte der Glukokortikoide aufzuheben, wie zum Beispiel deren Effekt auf die Mitogen/ Antigen stimulierte T-Zellproliferation oder die Cytokin Produktion (IL-2 und IFN- γ) [13].

Es bestehen keine direkten Interaktionen zwischen MIF und den Glukokortikoid Hormonen (*Bucala et al.*, nicht veröffentlichte Ergebnisse) [43]. *Mitchell et al.* zeigten, dass MIF die MAP Kinasen ERK-1/2 aktiviert [131]. Aktivierte MAP Kinasen phosphorylieren eine Reihe zytosolischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, inklusive der cytosolischen Phospholipase A2 (cPLA₂). cPLA₂ ist eine bedeutende Komponente in der proinflammatorischen Kaskade. Dessen Produkt, Arachidonsäure, ist wiederum eine Ausgangssubstanz für die Synthese der Prostaglandine und der Leukotrie-

1 Einleitung

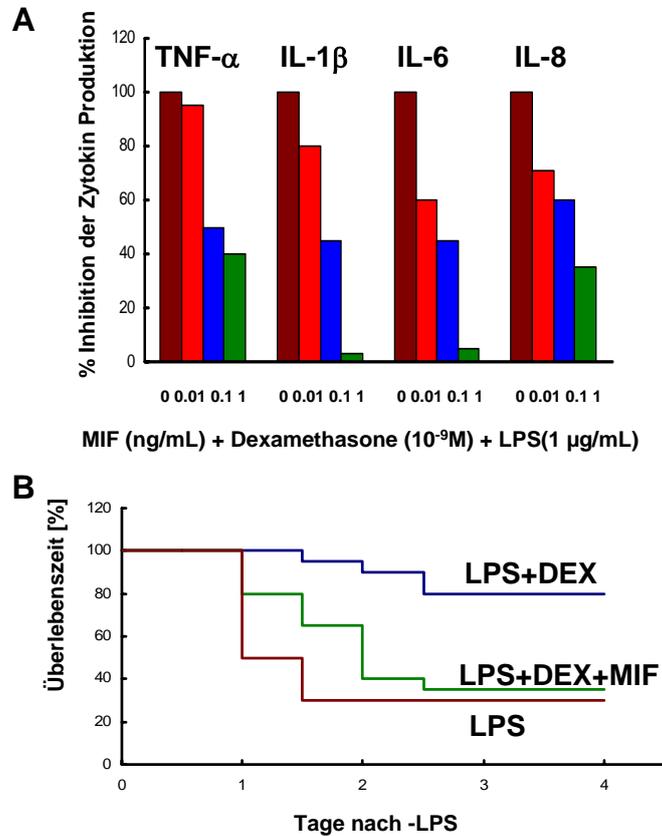


Abbildung 1.3: MIF als Glukokortikoid Antagonist.

A: MIF verhindert die durch Glukokortikoide vermittelte Suppression der Zytokinproduktion in menschliches Monozyten *in vitro*. Menschliche PBMC wurden erst mit Dexamethason oder Dexamethason + MIF inkubiert bevor man LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Stimulation der Zytokinproduktion zugab. Die kultivierten Überstände wurden 12 Stunden nach der Stimulation abgenommen und die sezernierten Zytokine analysiert.

B: MIF verringert die LPS Letalität *in vivo* durch Inhibition der Glukokortikoide. BALB/c Mäusen wurde i. p. Dexamethason (1,25 mg/kg) mit oder ohne rMIF (0,6 mg/kg) oder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle injiziert. Nach zwei Stunden wurde all diesen Mäusen LPS in einer Konzentration von 22,5 mg/kg i. p. injiziert. Die mit MIF behandelten Mäuse erhielten eine zusätzliche MIF Injektion zur selben Zeit als man LPS zugab und 17 Stunden danach. (In Anlehnung an T. Calandra *et al.*, Nature 377 (1995),68–71.)

1 Einleitung

ne. Weil somit die cPLA₂ ein wichtiges Zielprotein auf zellulärer Ebene für die anti-inflammatorische Wirkung der Glukokortikoide darstellt, könnte die MIF induzierte cPLA₂ Aktivierung ein Mechanismus sein, über den MIF die durch Glukokortikoide vermittelte Immunsuppression umgeht.

Ein weiterer entscheidender proinflammatorischer Signaltransduktionsweg beinhaltet den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Nach Aktivierung durch proinflammatorische Stimuli, wird NF- κ B durch das inhibitorisch wirkende I κ B α wieder inaktiviert. Aktiviertes NF- κ B transloziert in den Nukleus und aktiviert die Transkription inflammatorischer Zytokine wie Adhäsionsmoleküle, Immunorezeptoren und Akut-Phase Proteine [8, 14, 185]. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Glukokortikoide die NF- κ B Aktivierung verhindern können, indem sie die Expression des inhibitorischen I κ B α erhöhen. Damit bleibt NF- κ B im Zytosol gebunden und ist damit inaktiv. Daher findet auch keine Expression inflammatorischer Mediatoren statt [8, 71, 156]. *Dain et al.* zeigten, dass MIF die durch Hydrokortison vermittelte Inhibition des NF- κ B gegenreguliert, indem es die durch Glukokortikoide induzierte Zunahme des I κ B α verhindert [43]. Dies bewirkt sogar unter Anwesenheit normaler physiologischer Glukokortikoid Mengen eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern und eine damit verbundene Aktivierung der Transkription.

Diese Glukokortikoid antagonistische Wirkung von MIF könnte einen wichtigen Mechanismus darstellen, bei welchem der Wirtsorganismus eine funktionierende Immunantwort gegen pathogene Keime während schweren Traumata und lebensbedrohlichen Infektionen aufrecht erhält. Die erhöhten Mengen an endogenen Glukokortikoiden während dieser Situationen, welche das Immunsystem unterdrücken sollen, werden durch eine vermehrte Sekretion von MIF ausbalanciert, welches beim Entzündungsgeschehen von aktivierten Immunzellen freigesetzt wird.

1.2.6 MIF als Regulator der Zellproliferation, Differenzierung und Tumorentstehung

Fehlende Regulation der Zellproliferation und fehlerhafte Differenzierung von Zellen sind wesentliche Bestandteile in der Tumorgenese. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse Mediatoren zu erforschen, welche in diesem Mechanismus eine Rolle spielen könnten. Nachdem die anti-inflammatorische Funktion von MIF entdeckt worden war, wurde bereits ebenso in den Anfangsstadien der Erforschung von MIF darüber berichtet, dass MIF auch eine mögliche Beteiligung an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung hat. Untersuchungen an Fibroblasten charakterisierten MIF als ein *delayed-early-response-Gen* [99]. Spätere Arbeitsgruppen verbanden die Expression von MIF mit der Spezifizierung des Gewebes und der Organogenese während

1 Einleitung

der embryonalen Entwicklung oder mit der Proliferation und Differenzierung von Zellen der Augenlinse [92, 191].

Meyer-Siegler et al. [126] beschrieben eine ähnliche Hochregulierung von MIF mRNA in epithelialen Karzinomzellen der Prostata und deuteten damit als erste auf eine Verbindung zwischen MIF und Neoplasien hin. Ausserdem führte eine Inhibition von MIF zu einer Hemmung aktivierter T-Lymphozyten [13], der Angiogenese [37] und des Wachstums verschiedener Tumorzelllinien, wie zum Beispiel einer Kolonkarzinomzelllinie [179]. *Takahashi et al.* [179] schlossen aus ihren Versuchen, dass MIF einen Mediator der Wachstumsfaktor-abhängigen Zellproliferation darstellt. Sobald man das MIF Niveau experimentell reduziert, werden die wachstumfördernden Aktivitäten dieser Faktoren abgeschwächt [179]. Ähnliche Erkenntnisse erlangten *Shimizu et al.* [159], indem sie in einem menschlichen Melanommodell durch Verwendung von anti-MIF Antikörpern eine Inhibition der Tumorangiogenese zeigten.

MIF stimuliert den MAP Kinase Weg

Die Beobachtung, dass MIF eine wichtige Rolle in T-Lymphozyten und in der Endothelproliferation spielt [13, 37], aber auch die Tatsache, dass in bestimmten Quellen MIF mRNA exprimiert wurde, führten zur Charakterisierung von MIF als ein *delayed-early-response-Gen* [99]. *Mitchell et al.* untersuchten die Rolle von MIF im Bereich der Zellproliferation und Signalkaskade der Zelle näher. Hierbei bedienten sie sich der gut etablierten Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 [131].

Interessanterweise war es möglich, die Proliferation dieser NIH 3T3 Zellen sowohl durch endogen sezerniertes, als auch durch exogen zugegebenes MIF zu stimulieren. Diese Antwort war mit einer dosis- und zeitabhängigen Aktivierung der p44/p42 ERK1/ERK2 assoziiert, welche auch unter dem Namen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen bekannt sind. 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 30 Minuten nach Zugabe von MIF nachgewiesen werden und hielt für die Dauer von mindestens 24 Stunden an. Diese anhaltende Aktivierung der MAP Kinasen gilt als ungewöhnlich and wurde bisher einzig im Fall der Differenzierung neuronaler PC12 Zellen durch den Wachstumsfaktor NGF [197] und in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beschrieben [148]. Ähnlich wie die durch NGF induzierte Wirkung war die durch MIF anhaltende Aktivierung der ERKs abhängig von der Proteinkinase A (PKA). 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

1 Einleitung

den physiologischen Substraten dieser PKA [54]. Hauptsächlich wird PKA durch cyclisches AMP (cAMP) aktiviert und spannenderweise war auch der Effekt von MIF von cAMP abhängig. PKC und die Phospholipase C- γ stellen weitere Proteine dar, welche die ERK1/2 stimulieren, welche jedoch in der durch MIF induzierten Aktivierung der ERK1/2 nicht von Bedeutung zu sein scheinen.

Aktiviert ERKs phosphorylieren eine Vielzahl von zytosolischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Rsk, c-myc, cPLA₂, c-fos und Elk-1 [120]. 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.

MIF inhibiert die Aktivität des Proteins p53

Das Protein p53 besitzt eine Schlüsselrolle in den Mechanismen der Wachstumshemmung und der durch genotoxischen Stress verursachten Apoptose [41, 86, 96, 110, 119, 199]. So sind Zellen, denen p53 fehlt im Stande, trotz beschädigter DNA zu proliferieren. Der Verlust von p53 führt zur genomischen Instabilität, was erlaubt, dass die Zellen weitere, potentiell onkogene Mutationen erwerben [69, 100, 142]. Hinzu kommt, dass p53 ebenso das Eintreten der Zellen in Seneszenz bewirkt. Dieser Prozeß besitzt enorme Bedeutung, da er Zellen vor zu häufiger Teilung, Entstehung von Replikationsfehlern und Akkumulation von Mutationen schützt. Denn bei jeder Zellteilung besteht potentiell die Gefahr eines Replikationsfehlers oder von Neumutationen, welche tumorinduzierend wirken könnten. Somit kann man diese Seneszenz auch als einen Anti-Tumor Mechanismus bezeichnen.

Im gesunden Gewebe wirkt p53 somit als entscheidender Tumorsuppressor, da es hier die Krebsentstehung verhindert. Entsprechend findet sich in 50-60 % aller Tumoren ein durch Genmutation funktionell inaktiviertes p53 [116, 134, 135]. Der Verlust der p53 Funktion führt in der Zelle zu einer verlängerten Lebenszeit und trägt auf direktem Weg zur Immortalisation der Zelle bei [73, 82, 158]. P53 kann entweder durch eine direkte Mutation im Gen oder funktionell durch inhibitorische Proteine in seiner Aktivität gehemmt sein.

Um neue Regulatoren der p53 Aktivität identifizieren zu können, unternahm *Hudson et al.* [80] zwei auf Zellen basierende Screenings, in welchen sie Inhibitoren der p53 Aktivität aufdecken wollten. Überraschenderweise entdeckte diese Gruppe MIF in beiden Versuchsreihen. Die Behandlung mit rekombinantem MIF konnte die Anwesenheit von p53 selbst oder seine subzelluläre Lokalisation nicht erniedrigen. Dafür bewirkte MIF aber eine Erniedrigung der p21- und Cyclin G Transkriptionsrate sowie eine Abnahme des MDM2 Proteins, also eine Abnahme jener Proteine, welche Zielproteine

1 Einleitung

der transkriptionalen p53-Aktivität darstellen. Die biologische Relevanz dieser Feststellungen wurde mittels dreier *in vitro* Tests unterstrichen: (i) MIF unterdrückte die p53-abhängige Apoptose, (ii) MIF unterdrückte die durch Stickoxid (NO) induzierte Apoptose in RAW264.7 Makrophagen und (iii) MIF verzögerte das Einsetzen der Seneszenz primärer muriner Fibroblasten.

Diese zunächst überraschende Erkenntnis, dass ein proinflammatorischer Mediator Zellen dazu verhelfen kann, den Weg der Inhibition des Wachstums zu umgehen, könnte eventuell sehr viel Sinn im proinflammatorischen Kontext ergeben. Denn aktivierte Entzündungszellen geben genotoxische Substanzen wie zum Beispiel NO oder Sauerstoff-Radikale ab, von welchen man weiß, dass sie einen DNA Schaden verursachen können [115, 189, 190]. Die hiermit in Zusammenhang stehende Induktion von MIF und seine Ausschüttung kann die p53 Antwort partiell inhibieren, welche sonst zum programmierten Zelltod führen würde. Somit wäre es möglich, dass beispielsweise Makrophagen MIF produzieren, um sich vor eigenen genotoxischen Substanzen zu schützen, welche im Rahmen der Abwehr pathogener Keime gebildet werden. So findet man an den Orten des Entzündungsgeschehens hohe Raten an programmiertem Zelltod sowie kompensatorische Proliferation der benachbarten Zellen. Zu demselben Zeitpunkt kann oft auch eine Hochregulierung von p53 beobachtet werden.

Demnach könnte MIF durch Beeinflussung der p53 Aktivität in der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen. In der Tat sind chronisch entzündliche Prozesse oft mit der Tumorenstehung assoziiert. Als Beispiel sind hier die Colitis ulcerosa oder der Morbus Crohn zu nennen, welche mit einer erhöhten Inzidenz von Kolonkarzinomen einhergehen können [94]. Ebenso kann eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* das Risiko für die Entwicklung eines Magentumors massiv erhöhen [76, 194] oder eine Asbestose über die andauernde, chronische Aktivierung von Makrophagen zu einem Mesotheliom führen [151].

MIF moduliert die Aktivität und den Zellzyklus mit Hilfe von Jab-1

In einem *yeast-two-hybrid-Screen* mit MIF cDNA als „bait“, welcher als Ziel die Identifikation von MIF-bindenden Proteinen hatte, konnten drei Klone gefunden werden, welche spezifisch mit MIF interagierten [89]. Zwei dieser Klone wurden als humanes MIF identifiziert [172]. Der dritte Klon enthielt cDNA mit einer Anfangssequenz, die der von *c-Jun activation binding protein-1* (Jab-1) entsprach. Jab-1 selbst besitzt eine wichtige Funktion als Koaktivator des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein-1 (AP-1). Sowohl Immunpräzipitationsdaten als auch assoziierte *pull-down* Experimente bestätigten im Folgenden eine biochemische Interaktion zwischen MIF und Jab-1.

AP-1 stellt einen der best untersuchten Transkriptionsfaktoren dar und ist ein Di-

1 Einleitung

mer aus c-fos und c-Jun [5,193]. All diese Proteine besitzen eine DNA-Bindungsstelle, welche die Sequenz TGA[C/G]TCA erkennen. Diese Sequenz befindet sich im Bereich der regulatorischen Region vielzähliger Gene. Die Fos und Jun Gene gehören zu derjenigen Gruppe von Genen, welche im Zellzyklus durch Stimulation ruhender Zellen früh aktiviert werden [3]. Zu den Induktoren von AP-1 zählen eine Reihe von Faktoren wie wachstumsstimulierende Moleküle, inflammatorische Zytokine, Hitzeschock, UV-Bestrahlung und metabolische Gifte, was dafür spricht, dass AP-1 eine wichtige Rolle sowohl in Differenzierung und Wachstum der Zelle als auch in der Wiederherstellung und der Protektion von zellulären Schäden spielt [106]. Der Mechanismus für die durch Jab-1 induzierte Koaktivierung von AP-1 besteht in der Stabilisierung von c-Jun Komplexen mit den AP-1 Bindungsstellen [40].

Da man annahm, dass extrazelluläres MIF entscheidend für die immunologischen Funktionen von MIF sei, war es zunächst von Bedeutung, den Transportmechanismus von exogenem MIF ins Zytosol, wo sich auch Jab-1 befindet, nachzuweisen. In der Tat konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass exogen zugegebenes rekombinantes MIF (rMIF) durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird und sich daraufhin im Zytosol an endogenes Jab-1 anlagert. Jedoch blieb der Mechanismus, wie es zum Einschleusen von MIF aus den endozytotischen Vesikeln, den Phagoliposomen ins Zytoplasma kommt, unaufgeklärt. MIF besitzt keine speziellen Sequenzen, welche eine Permeabilität durch Membranen erlauben würden, wie es zum Beispiel das HIV Protein oder die *Drosophila antennapedia* [186] besitzen. Sobald MIF jedoch in die Zelle gelangt ist, hemmt es die Stimulation der AP-1 Aktivität mittels Jab-1, indem es die Bindung von Jab-1 an c-Jun wiederum inhibiert. Ebenso reduziert MIF die durch TNF- α und UV Licht induzierte transkriptionale Aktivität von AP-1.

Ein weiterer synergistischer, alternativer Pfad, über welchen die AP-1 Aktivität reguliert wird, stellt die Interaktion von MIF mit der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) dar. So erhöht Jab-1 die Aktivität von JNK, wohingegen MIF die Fähigkeit besitzt, diese Stimulation aufzuheben. In *in vivo* Experimenten konnte eine deutliche Reduktion endogener Phospho-c-Jun Levels, welche durch kurzzeitige Überexpression von Jab-1 oder mittels Agenzien wie TNF- α oder UV-Bestrahlung induziert wurden, beobachtet werden, nachdem Zellen mit rMIF behandelt worden waren. Zusammenfassend kann man daraus schliessen, dass die Kombination von MIF und Jab-1 ein gegenregulatorisches System darstellen, um die AP-1 Pfade zu modulieren.

Neben der AP-1 Aktivierung beeinflusst Jab-1 ausserdem den Zellzyklus insofern, dass es die Degradation des Zell-Zyklus-Inhibitors p27^{Kip1} stimuliert, welcher seinerseits die Fähigkeit besitzt, einen Proliferationsstop in Zellen auszulösen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Überexpression oder Stimulation von MIF über eine Hemmung von Jab-1 die Menge von nukleärem p27^{Kip1} er-

1 Einleitung

höhen kann. Desweiteren bewirkte das Vorhandensein einer großen Menge an MIF eine Reduktion des Wachstums proliferierender Fibroblasten. Diesen Proliferationsstop kann Jab-1 bei in Serum kultivierten Fibroblasten aufheben. Daher gleichen die durch MIF vermittelten Effekte dem durch p27^{Kip1} vermittelten Wachstumsstop. Somit ist es durchaus möglich, dass dieser Effekt via Inhibition der Jab-1 abhängigen Verminderung des p27^{Kip1} zustande kommt.

Die Interaktion von MIF und Jab-1 könnte also eine wichtige molekulare Grundlage für sämtliche bedeutende Funktionen von MIF darstellen. Diese Funktionen beinhalten seine Rolle als Modulator des Immunsystems, als Glucocorticoid Antagonist sowie seine regulatorische Bedeutung in Differenzierung und Zellwachstum. Letztendlich könnte die Interaktion zwischen MIF und Jab-1 auch die überraschenden Beobachtungen *Bernhagens et al.* erklären, welche inhibitorische Effekte von MIF auf Zellwachstum und Inflammation vorfanden und damit den bisherigen Ergebnissen von *Mitchell et al.* [131] widersprachen. Eine weitere mögliche Erklärung bietet die Menge an MIF, die für die jeweiligen Experimente verwendet wurde, da bekannt ist, dass biologische Aktivitäten von MIF wie zum Beispiel die Inhibition der Makrophagenmigration von der Konzentration des MIF abhängt. *Bernhagen et al.* verwendeten Mengen an rMIF, welche im Bereich der oberen Hälfte der biologischen Antwortkurve liegen, während die von *Mitchell et al.* verwendeten Konzentrationen niedriger lagen.

Die Bedeutung von MIF für die maligne Transformation von Zellen

Wie bereits erwähnt besitzt MIF eine regulierende Funktion in Zellwachstum und Apoptose [92,191]. Gerade diese beiden exakt kontrollierten physiologischen Prozesse spielen eben dann in der Tumorgenese, also in der Entstehung neoplastischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle, wenn sie nicht mehr gezielt und kontrolliert ablaufen. Eine genaue Überwachung dieser beiden Vorgänge findet beispielweise durch das Wächterprotein p53 statt, dessen Wirkung eingangs bereits beschrieben wurde. Da man sowohl eine vermehrte Expression von MIF in verschiedensten malignen Tumoren als auch eine Korrelation zwischen der MIF Expression und der Aggressivität eines bösartigen Tumors und damit der klinischen Prognose festgestellt hat [47,121,125,126,183], begannen *Fingerle-Rowson et al.* eine MIF^{ko} Maus zu generieren, um damit die Rolle von MIF in Wachstum, Tumorgenese und maligner Transformation näher zu untersuchen [70].

Die gezüchteten *knockout* Mäuse wiesen das nach den Mendelschen Regeln erwartete Geburtenverhältnis auf [70]. Desweiteren zeigten sie im Vergleich zu MIF^{wt} Mäusen keinerlei Abnormalitäten in ihrer Entwicklung und waren ebenso fruchtbar wie diese [70]. In Zellkulturexperimenten konnten ähnliche Proliferationsraten bei murinen embryonalen Fibroblasten verzeichnet werden. Auffällig war jedoch, dass MIF^{ko}

1 Einleitung

Fibroblasten bei einer um 20–30 % geringeren Zelldichte bereits ihr Wachstum einstellen [70], was auf eine erhöhte Sensitivität für Konfluenz-induzierten Wachstumsstop hindeutet. Damit konsistent konnte eine erhöhte Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 in den MIF^{ko} Fibroblasten beobachtet werden. Im übrigen deuteten diese Beobachtungen darauf hin, dass die Wachstumsveränderung der MIF^{ko} Fibroblasten weitestgehend p53 abhängig ist, da Fibroblasten von darauffolgend generierten *double-knockout* Mäusen ähnliches Wachstumsverhalten zeigten wie die p53 *knockout* Fibroblasten [70]. Das Einbringen von aktiviertem ras in ein Wirtsgenom hat einen durch

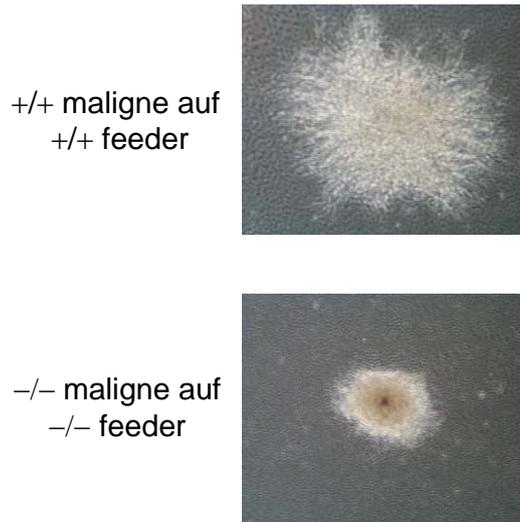


Abbildung 1.4: Koloniegröße der MIF^{wt} und MIF^{ko} MEFs. Wie bereits beschrieben stellen sich die transformierten MIF^{wt} MEFs größer dar als die verglichenen malignen MIF^{ko} MEFs.

p53 vermittelten Wachstumsstop, die Expression von Seneszenz assoziierten Markern und Apoptose [157] zur Folge. Die Transduktion der MIF^{ko} MEFs mit replikationsunfähigem H-ras Retrovirus führte zu deutlich stärkerer Inhibition des Wachstums, verglichen mit MIF^{wt} MEFs. Um eine Zelle erfolgreich maligne zu transformieren, müssen zuerst Tumorsuppressoren wie Rb oder p53 geblockt und danach die Zellproliferation stimuliert werden. Adenovirales E1A hemmt Rb, immortalisiert somit die Zelle und verhindert, dass das Einbringen von aktiviertem ras die Apoptose induziert. Die Transformation der MIF^{wt} und MIF^{ko} MEFs mit zunächst E1A und anschließend H-ras, mit dem Ziel der malignen Transformation der Primärfibroblasten, zeigte einen deutlichen Phänotyp. So produzierten H-ras und E1A coexprimierende MIF^{ko} MEFs im Vergleich zu entsprechenden MIF^{wt} MEFs 50% weniger transformierte Kolonien im *focus formation assay*. MIF^{ko} MEFs proliferieren deutlich langsamer als die entsprechenden MIF^{wt} Kontrollen. Damit konsistent stellten sich die Herde der MIF^{ko} MEFs morphologisch

1 Einleitung

kleiner dar (siehe Abbildung 1.4 auf der vorherigen Seite).

1.2.7 Die enzymatische Funktion von MIF

Einleitung

Bei dem Versuch neue Glutathion S-Transferase Isoenzyme zu finden [21], wurde zum ersten Mal eine katalytische Aktivität von MIF entdeckt. Allerdings stellte sich heraus, dass es sich hierbei um ein experimentelles Artefakt handelte [169,177]. Dennoch konnten andere Gruppen eine katalytische Funktion von MIF als Tautomerase entdecken. Tautomerasen sind eine spezielle Gruppe von Isomerasen, welche die Umwandlung von Ketonen in ihre Enol-Tautomere und umgekehrt katalysieren. D-Dopachrom Tautomerase [200] katalysiert die Umwandlung von D-Dopachrom (2-Carboxy-2,3-dihydroindol-5,6-chinon) zu DHICA (5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure) und 5,6-Dihydroxyindol [140].

MIF ist strukturell verwandt mit zwei bakteriellen Isomerasen (siehe Abbildung 1.8 auf Seite 22), 4-Oxalocrotonat Tautomerase (4-OT) und 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat Isomerase (CHMI) [168,169]. 4-OT und CHMI katalysieren die Umwandlung von Aromaten in Intermediate, welche in den Zitronensäurezyklus eintreten können. CHMI liegt als Trimer vor, in welchem β -Faltblätter einen Kanal im Zentrum ausbilden, wohingegen 4-OT als Hexamer vorliegt, welches aus sechs Untereinheiten zu je 62 Aminosäuren besteht. Jeweils zwei Monomere von 4-OT dimerisieren zu einer dem MIF Monomer ähnlichen Einheit. Drei dieser Dimere bilden anschließend das dem MIF Trimer ähnliche Hexamer. Obwohl 4-OT, CHMI und MIF ähnliche räumliche Strukturen bilden, existiert keine Homologie zwischen ihren Aminosäuresequenzen. [171] Die Struktur von MIF definierte eine neue Protein-Superfamilie.

MIF als Tautomerase

Die letzten Stufen der Melaninbiosynthese beinhaltet eine enzymatische Tautomerisierung von Dopachrom zu DHICA durch das Enzym Dopachrom Tautomerase (siehe Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite). Das natürliche Substrat dieser Reaktion ist L-Dopachrom. Bei diesen Untersuchungen an kultivierten Melanomzellen konnte auch die katalytische Tautomerisierung von D-Dopachrom beobachtet werden. [150] Aber im Gegensatz zu der Umsetzung mit L-Dopachrom, welche durch ein Membranprotein katalysiert wird, wurde die gesamte katalytische Aktivität für das D-Isomer im Zytoplasma nachgewiesen. Es konnten zwei Proteine isoliert werden, welche für die Umwandlung verantwortlich sind: MIF und D-Dopachrom Tautomerase (DDT). MIF und DDT sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 35 % identisch [171], wobei MIF aus 115 und

1 Einleitung

DDT aus 118 Aminosäuren besteht [170]. Beide liegen als Homotrimer vor [170]. Falls man konservative Aminosäuresubstitutionen in Betracht zieht, vergrößert sich die Homologie zwischen MIF und DDT auf 54 %. Diese große Ähnlichkeit beider Gene erklärt sich dadurch, dass beide Gene Folge eines Gen-Duplikationsereignisses in der Evolution sind [42]. D-Dopachrom ist ein Substrat, welches physiologischerweise nicht im Körper vorkommt. Bei dem Versuch, natürliche Substrate von MIF zu identifizieren, wurde seine Phenylpyruvat-Tautomeraseaktivität entdeckt [149]. MIF katalysiert die Tautomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat und Phenylpyruvat. Beide Substrate sind Endprodukte des Phenylalanin- und Tyrosinabbaus. Obwohl MIF in der Lage ist die Tautomerisierung beider Moleküle zu katalysieren, kann man annehmen, dass weder p-Hydroxyphenylpyruvat noch Phenylpyruvat natürliche Substrate von MIF darstellen. Dafür sind die gemessenen K_M Werte (2,4 mM für p-Hydroxyphenylpyruvat) im Vergleich zu den physiologischen Konzentrationen ($0,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ im menschlichen Plasma) zu hoch [48, 149]. Von den genannten Enzymen wurde der katalytische Mechanismus

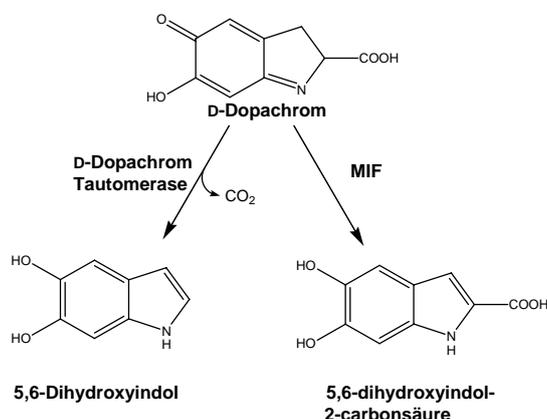


Abbildung 1.5: Die Umwandlung von D-Dopachrom durch MIF und D-Dopachrom Tautomerase

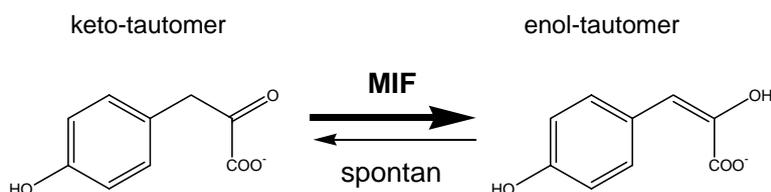


Abbildung 1.6: MIF katalysiert die Keto-Enol-Isomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat

von 4-OT detailliert untersucht. 4-OT katalysiert die Isomerisierung von unkonjugierten α -Ketocarbonsäuren wie 2-Oxo-Hex-4-en-dioat in ihre konjugierten Isomere wie

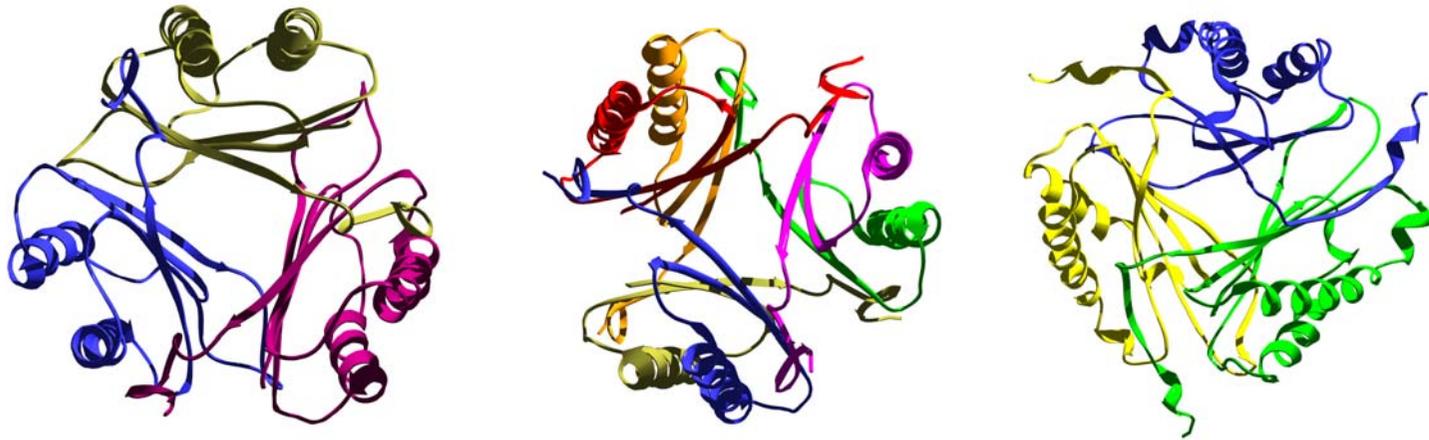


Abbildung 1.8: 3D Ansicht: Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen MIF, 4-OT und CHMI.

MIF = *macrophage migration inhibitory factor*, 4-OT = *4-Oxalatocrotonate Tautomerase*, CHMI = *5-Carboxymethyl-2-Hydroxymuconate Isomerase*. 4-OT und CHMI sind bakterielle Enzyme, die die Umwandlung von aromatischen Kohlenwasserstoffen zu Zwischenstufen katalysieren, welche anschließend in den Zitronensäurezyklus eintreten. MIF und CHMI sind Homotrimere, wohingegen 4-OT als Homohexamer vorliegt. Alle drei besitzen einen für Lösemittelmoleküle zugänglichen Kanal, welcher durch mehrere β -Faltblätter begrenzt wird.

1 Einleitung

2-Oxo-Hex-3-en-dioat über das Intermediat 2-Hydroxy-hexa-2,4-diendioat. Affinitätsstudien [166], kinetische Untersuchungen [165], Synthese [61], NMR Studien [164, 167] und röntgendiffraktometrische Untersuchungen [168, 181] führten zur Identifizierung des aminoterminalen Prolins als für die Reaktion essentielle katalytisch wirksame Base. Prolin1 am N-Terminus, wie es bei 4-OT, CHMI und MIF vorkommt, kann als Base wirken, da seine Aminofunktion nicht an einer Peptidbindung beteiligt ist und somit protonierbar ist. Durch ihren niedrigen pK_a von 6,4 liegt die Aminofunktion unter physiologischen Bedingungen unprotoniert vor [165] und kann während der Reaktion als Protonenakzeptor auftreten. Zum Vergleich: Der pK_a eines freien, sekundären Amins liegt bei etwa 9. Bei MIF ist das Amin des N-terminalen Prolins mit einem pK_a von 5,6

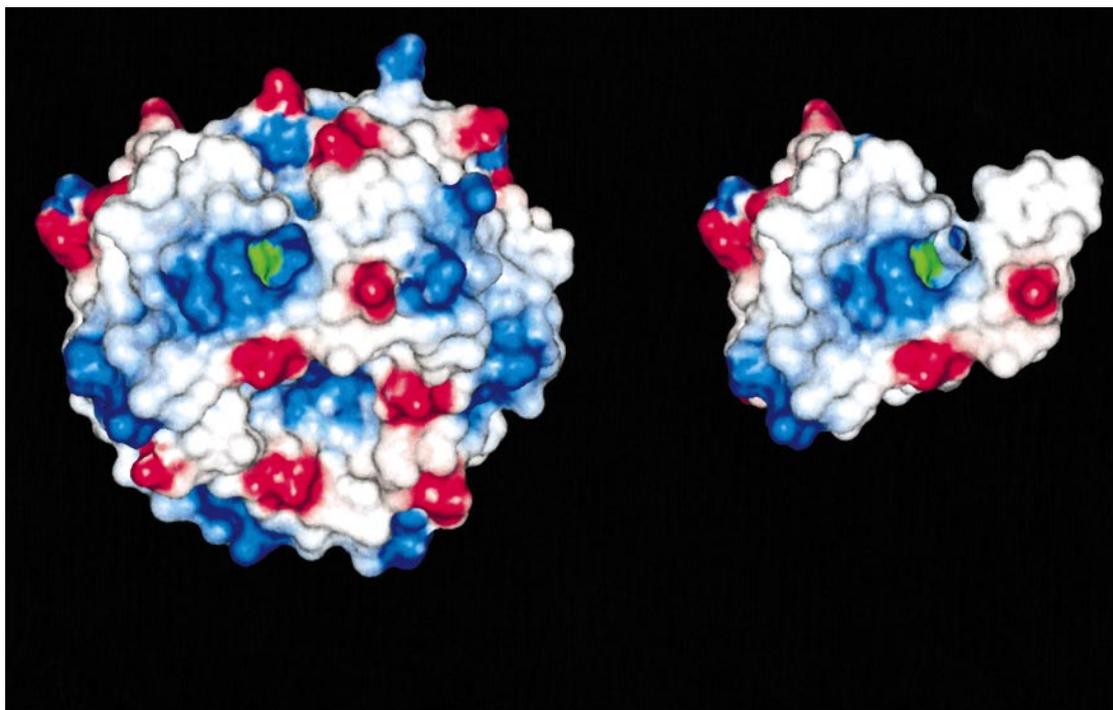


Abbildung 1.7: Elektrostatisches Potential des MIF Monomers und Trimers.

Negativ geladene Oberflächen sind rot, positiv geladene blau eingefärbt. Die Oberfläche des N-terminalen Prolins ist grün eingefärbt. Aus *Swope et al.*, EMBO J. 17 (1998), 3534–3541.

noch saurer [16, 175]. Dies kann durch die Umgebung von Prolin1 erklärt werden. Prolin1 liegt im humanen MIF in einer durch Kohlenstoffatome gebildeten hydrophoben Tasche, in welcher keine negative Gegenladung zum protonierten Prolin1 vorhanden ist. Desweiteren befinden sich in der Nähe des Aminoterminus zwei Lysine (Lysin66, Lysin32), welche durch ihr positives Potential die Azidität der Aminofunktion von Prolin1 weiter steigern [84, 175].

Bemerkenswert und zugleich ein Beleg für die wichtige biologische Rolle von Prolin1

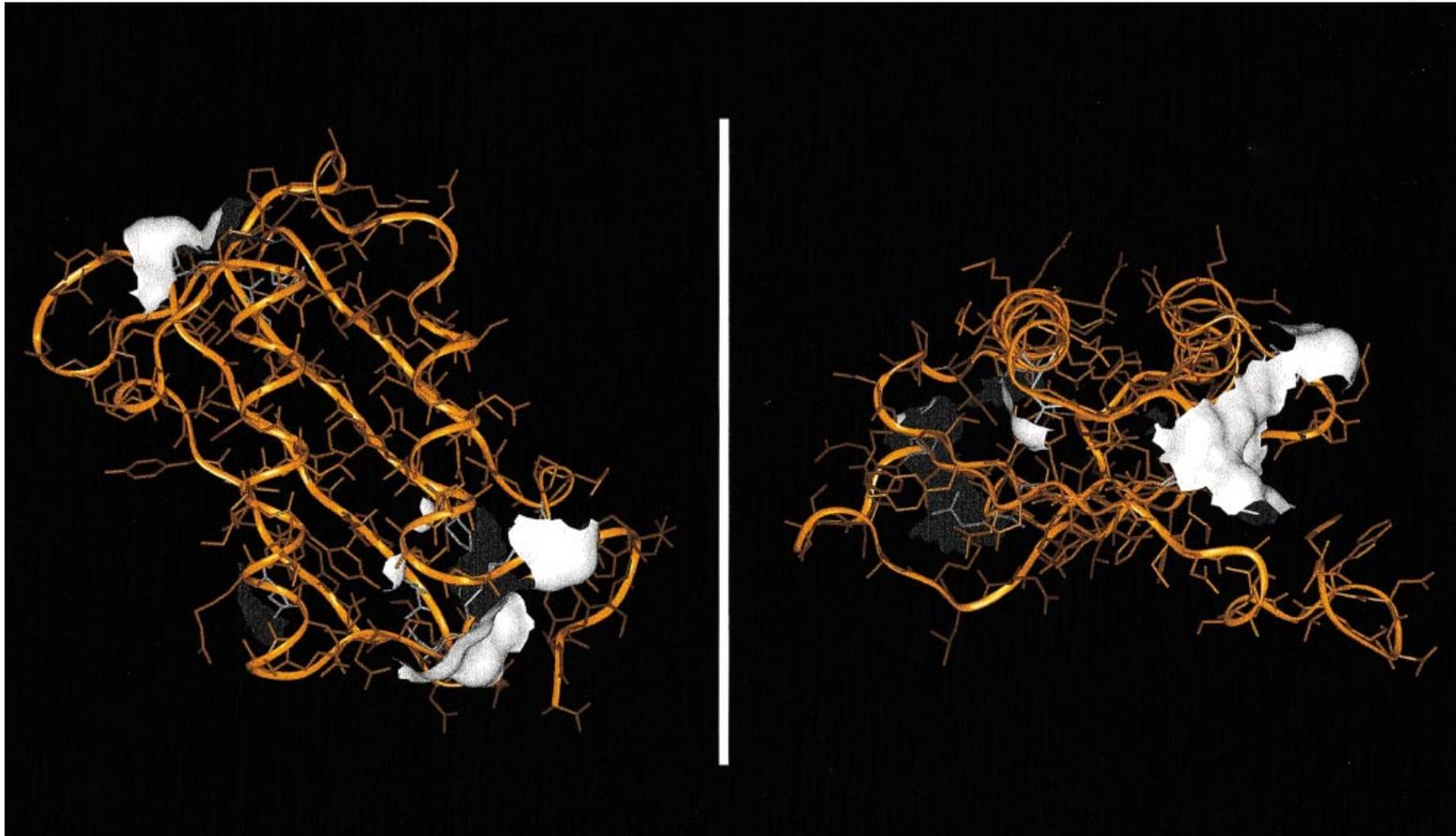


Abbildung 1.9: 3D- Darstellung der evolutionär konservierten Aminosäuren im MIF Monomer

Konservierte Aminosäuren sind in weiß dargestellt. Alle konservierten Aminosäuren von MIF befinden sich in zwei Regionen im Monomer. Die erste Region befindet sich an der Verbindungsstelle zwischen zwei Monomeren, so dass beide Monomere zusammen eine Tasche bilden. Aus *Swope et al.*, EMBO J. 17 (1998), 3534–3541.

1 Einleitung

ist, dass es zusammen mit anderen Aminosäuren in allen bekannten homologen Proteinen vom Menschen bis hin zum einzelligen Eukaryonten in MIF konserviert wurde. Diesen konservierten Resten fallen wichtige strukturelle und funktionelle Aufgaben zu. Die meisten davon befinden sich in der 3D-Struktur in der Umgebung des Prolin1 am N-Terminus von MIF (siehe Abbildung 1.9 auf der vorherigen Seite). Dies bestärkt damit die These, dass gerade diese Region vermutlich Träger der biologischen Funktion von MIF ist. Desweiteren zeigt sich, dass der größte Teil dieser Aminosäuren für in Flüssigkeit lösliche Moleküle zugänglich ist, was nahe legt, dass diese Region die katalytische Tasche des MIF Enzyms darstellt.

Swope et al. gelang es darüber hinaus, die mit p-Hydroxyphenylpyruvat komplexierte Kristallstruktur von MIF zu erhalten (siehe Abbildung 1.10 auf der nächsten Seite) [112]. Ein Vergleich der komplexierten und unkomplexierten Struktur zeigt keine größeren Konformationsunterschiede. Wie im Fall von 4-OT und CHMI auch, liegen die drei Bindungsstellen für p-Hydroxyphenylpyruvat an den Verbindungsstellen zwischen zwei Untereinheiten. Das Substrat hat Kontakte mit Pro-1, Lys-32 und Ile-64 des einen Monomers und mit Tyr-95 und Asn-97 des benachbarten Monomers. Das Substrat wird vor allem durch aromatische Wechselwirkungen, van der Waals Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. P-Hydroxyphenylpyruvat kommt in dieser Tasche so zu liegen, dass die Aminofunktion von Pro-1 sich in einem Abstand von 3,3 Å von C3 von p-Hydroxyphenylpyruvat befindet und dadurch der Protonentransfer sichergestellt werden kann. Der Mechanismus der durch MIF katalysierten Keto-Enol Tautomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat oder auch von D-Dopachrom benötigt sowohl eine katalytische Base wie auch eine katalytische Säure. Bei p-Hydroxyphenylpyruvat dient wie bereits erwähnt Pro-1 als Base während die Reste Lys-32, Ile-64 und Asn-97 die Lage des Substrats in der Tasche stabilisieren. Durch Deprotonierung von C3 und Umklappen des nun freien Elektronenpaares an C3 kommt es zur Ausbildung einer neuen Doppelbindung zwischen C2 und C3 und somit zur Enolisierung [112]. Interessant ist dabei vor allen Dingen, dass es bei MIF im Gegensatz zu 4-OT keine katalytische Säure zu geben scheint. Bei 4-OT wird diese Rolle von Arg-39 übernommen, welches den an C2 gebundenen Carbonylsauerstoff polarisiert [162, 181]. Leider war es nicht möglich mit D-Dopachrom beladenes MIF zu kristallisieren. Der katalytische Mechanismus der Tautomerisierung von d-Dopachrom konnte dadurch nur schwerlich aufgeklärt werden. *Soares et al.* [162] schlugen aufgrund der Ergebnisse ihrer Dockingstudien jedoch folgenden Mechanismus vor: Lys-32 tritt in Kontakt mit D-Dopachrom, hält es in Position und protoniert das an C5 gebundene Carbonylsauerstoffatom, während Pro-1 C2 deprotoniert. Durch Deprotonierung von C3 und Elektronenrearrangement wird die Isomerisierung abgeschlossen. Da sich in der katalytischen Tasche keine weitere basische Funktion findet um C3 zu deprotonie-

1 Einleitung

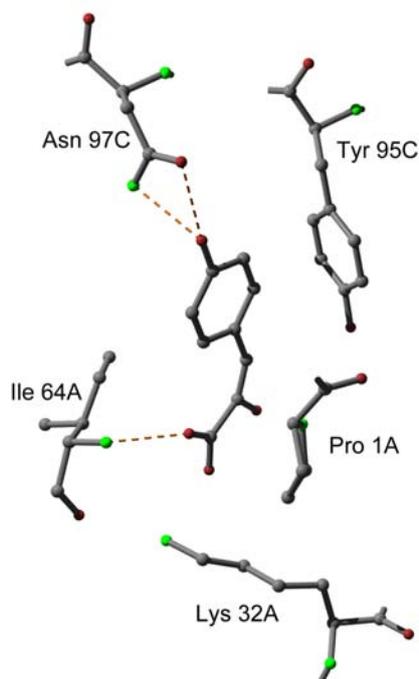


Abbildung 1.10: p-Hydroxy-phenylpyruvat im aktiven Zentrum von MIF [112]. p-Hydroxy-phenylpyruvat bindet an die Aminosäuren Pro-1, Lys-32, und Ile-64 einer Einheit und Tyr-95 und Asn-97 einer benachbarten Einheit. Die Bindung erfolgt über aromatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kontakte.

ren, gehen Soares *et al.* davon aus, dass ein Wassermolekül diese Funktion übernimmt. Zwar ist das katalytische Zentrum von unbeladenem MIF hydratisiert, jedoch ist in der mit p-Hydroxyphenylpyruvat komplexierten Struktur kein Wasser in der Tasche zu sehen. Der Bedarf an Wasser ist eine mögliche Erklärung für die niedrige katalytische Effizienz von MIF bezogen auf D-Dopachrom [149,150]. Durch gezielte Mutationen am aktiven Zentrum des Proteins und anschließender Auswertung der Tautomeraseaktivität konnte die essentielle Rolle von Pro-1 bestätigt werden. Die P1G Mutante hat dieselbe räumliche Struktur wie das Wildtypprotein [112] und das Initiations-Methionin wird ebenfalls postranslational entfernt wie in natürlichem MIF. Das Stickstoffatom von Gly-1 in P1G kommt auf der exakt selben Position zu liegen wie das Stickstoffatom von Pro-1 in MIF, aber dennoch verringert sich der $k_{cat}/[S]_{0.5}$, welcher eine gute Abschätzung der Enzymaktivität erlaubt, um den Faktor 65 und hebt somit die katalytische Aktivität auf.

Auch andere Mutanten, wie PAM [112] oder P1F zeigen keine Tautomeraseaktivität. Allerdings verändern diese im Gegensatz zur P1G Mutante das Aussehen des katalyti-

1 Einleitung

schen Zentrums. Im Fall von PAM befindet sich zwischen Pro-1 und Met-2 ein zusätzliches Alanin, welches Pro-1 weiter aus der hydrophoben Tasche herausdrängt und es Lys-32 und Lys-66 annähert. In P1F wird das Initiations-Methionin nicht durch posttranslationale Modifikation des Proteins entfernt [75]. Möglicherweise behindert die sterisch anspruchsvolle Seitenkette von Phenylalanin entweder die Beweglichkeit der aminoterminalen Gruppe oder aber sie blockiert das aktive Zentrum vollständig. Diese Veränderung der katalytischen Tasche resultiert in einem völlig inaktiven Protein.

Bisher wurden diese N-terminalen Mutanten nicht umfassend in biologischen *assays* untersucht. Die P1G Mutante erweist sich in einem *neutrophil priming assay* als inaktiv. Dabei wird die Peroxidentwicklung gemessen, nachdem Neutrophile mit MIF^{P1G} für eine Stunde vorbehandelt und nachfolgend mit fMLP für 30 Minuten stimuliert wurden [175]. Dieses Experiment wurde für seine schlechte Reproduzierbarkeit kritisiert. Denn die Resultate stehen im Kontrast zu Ergebnissen, welche zeigen, dass N-terminale Mutanten die immunologische Funktion von MIF nicht beeinträchtigen [91]. C-terminale Mutanten von MIF sind katalytisch ebenfalls inaktiv [16]. Eine mögliche Begründung hierfür ist ein Verlust an kritischen Aminosäuren, welche an der Stabilisierung des Homotrimers beteiligt sind. Es ist bekannt, dass die katalytische Aktivität von der Wechselwirkung von Aminosäuren verschiedener Monomere abhängt. Obwohl es viele Hinweise und auch strukturell gesicherte Ergebnisse für die katalytische Aktivität von MIF gibt, ist dessen physiologische Rolle immer noch ungeklärt. Denn aufgrund der bereits erwähnten niedrigen K_{cat}/k_m ($\sim 10^4$) Werte für die Tautomerisierung von Phenylpyruvat und p-Hydroxyphenylpyruvat ist immer noch fragwürdig ob es sich dabei um die natürlichen Substrate von MIF handelt.

1.3 Genetische Ansätze für die Analyse der Funktion des MIF Gens

1.3.1 Einleitung

Bis zum letzten Jahrzehnt war es nur begrenzt möglich, die Funktion mancher Genprodukte *in vivo* zu erforschen. Die Zahl der natürlich vorkommenden Deletionen und Mutationen von Genen war begrenzt und essentielle Gene waren schwer zu erforschen, da die Deletion dieser Gene mit dem Leben oft unvereinbar war. Hinzu kommt, dass eine Zufalls-Mutagenese in Mäusen sowohl teuer als auch von dem verwendeten Mutagen abhängig ist. Auch wenn man mit Antikörpern arbeitet bleibt die Zahl der zu erforschenden Genprodukte auf jene des Extrazellulärtraumes begrenzt. Zusätzlich ist die Herstellung von spezifischen Inhibitoren mühsam und kostspielig.

Eine neue Ära in der Entdeckung des Genoms tat sich Ende des letzten Jahrhunderts

1 Einleitung

auf. Endlich ist es möglich, Gene viel schneller als jemals zuvor zu identifizieren und ihre Funktion im Kontext eines gesamten Organismus zu erforschen. Ausserdem war es erforderlich, effiziente Methoden zu entwickeln, um die Funktionen von bestimmten Genen zu erfassen. Heutige Methoden wie Mutagenese, homologe Rekombination und Gentergeting ermöglichen es uns, ganz spezielle Mutationen in bestimmten Organismen, z. B. in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) oder in *Mus musculus*, der Maus, zu generieren. Unter all diesen Modellen an Lebewesen wird die Maus jedoch das Säugetierstandardmodell für die nächsten Jahre bleiben, um die Funktionen menschlicher Gene zu erkunden.

1.3.2 Gen Targeting bei Säugetieren

Der im englischen Sprachgebrauch verwendete Begriff des *gene targeting* beschreibt das Einbringen neuer DNA Sequenzen in definierte Positionen des Genoms mittels homologer Rekombination. Das Labor von *M. Capecchi* fand als erstes heraus, dass die Säugetierzelle eine intrinsische Maschinerie besitzt, welche die Rekombination zwischen homologen DNA Sequenzen vermittelt [62].

Obwohl Säugetierzellen Rekombination zwischen homologen DNA Sequenzen vermitteln können, so ist die gesamte Rate der homologen Rekombination doch gering. Im Durchschnitt beträgt diese in etwa ein Ereignis pro 10 000 Zellen. Diese strenge Limitierung konnte in den darauffolgenden Jahren durch die Entwicklung omnipotenter, embryonaler Stammzellen (ES Zellen) umgangen werden. Man gewann diese ES Zellen in den frühen achtziger Jahren aus Mausblastozysten [57]. Sobald man ES Zellen zurück in Blastozysten transferiert, tragen diese effektiv zur Ausbildung allen Gewebes inklusive der Keimzellreihe in einer chimärischen Maus bei [27]. Wenn eine chimärische Maus das veränderte Gen über die Keimbahn an Nachkommen weitergibt, entsteht eine heterozygote Maus, welche dann zur Homozygotie weitergezüchtet werden kann. Obwohl diese Methode sehr zeitaufwendig ist, ermöglicht sie trotzdem, dass man das *gene targeting*-Ereignis vom Beginn bei einer Zelle bis hin zur Ausbildung des gesamten Organismus verfolgen und den Phänotyp des Proteins untersuchen kann.

Gentergeting mit dem Cre/loxP Rekombinationssystem

Da das Gentergeting mit Ersatzvektoren einige technische Nachteile wie z. B. Persistenz der Selektionskassette im Genom mit sich bringt und embryonale Letalität nicht umgehen kann, wurde die Cre/loxP Technik für das *gene targeting* entwickelt. Der P1 Bakteriophage besitzt ein Rekombinationssystem, welches die Umwandlung von Dimer P1 Plasmiden zu Monomeren ermöglicht. Ausserdem befähigt es zur Änderung der räumlichen Struktur der DNA. So wird aus einem linearen Genom eine ringförmige Variante

1 Einleitung

des Genoms. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle in der Fortpflanzung des Bakteriophagen [9,77]. Die beiden Wirkkomponenten dieses Mechanismus beinhalten zum Einen die loxP Sequenz und zum Anderen die Cre Rekombinase.

Die loxP Seite (*locus of crossing over (x) in P1*) besteht aus einer Sequenz von 34 bp, wobei sich die 34 bp folgendermaßen zusammensetzen: Es handelt sich um zwei sich wiederholende, zueinander komplementäre Basenfolgen mit jeweils 13 bp, welche durch eine 8 bp große nicht-palindromische Sequenz miteinander verbunden sind. Diese dazwischen liegende Sequenz bestimmt die Orientierung der gesamten Sequenz (siehe Abbildung 1.11) [78,79]. Die Cre Rekombinase stellt ein 38 kDa großes Protein dar

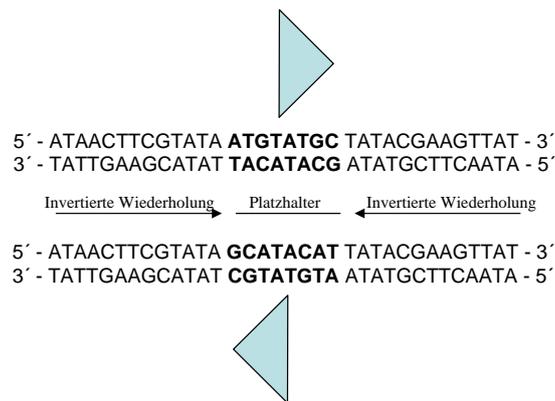


Abbildung 1.11: Die loxP Sequenz- Sequenzierung und Orientierung Man sieht eine 34 bp große loxP Seite, bestehend aus zwei 13 bp langen invertierten Wiederholungen und einer 8 bp großen asymmetrischen Sequenz, welche sich zwischen den beiden Wiederholungen wie ein Platzhalter verhält. Diese Platzhalter-Sequenz bestimmt die Orientierung der loxP Seite.

und gehört zur γ Integrase Superfamilie sequenzspezifischer Rekombinasen. Für deren Aktivität bedarf es weder Kofaktoren noch anderer akzessorische Proteine (Abbildung 1.12 auf der nächsten Seite).

Sobald man zwei loxP Sequenzen mit derselben Orientierung in die Sequenz eines Chromatid Stranges einbringt, resultiert aus der Exzision der durch loxP eingegrenzten, bzw. flankierten Sequenz, genannt *floxed*, eine Cre-vermittelte intramolekulare Rekombination. Diese Sequenz wird dann zu einem ringförmigen Molekül mit einer loxP Seite links in jedem Reaktionsprodukt. Die umgekehrte Reaktion, nämlich ein intermolekulares Rekombinationsereignis, ergibt sich schließlich bei der Integration ringförmiger DNA Moleküle in lineare Moleküle, wenn jedes eine loxP Sequenz besitzt. Werden die beiden loxP Seiten in entgegengesetzter Orientierung in die Zielsequenz integriert, so findet keine Exzision dieser *floxed* (von loxP Seiten umgebenen) Sequenz statt, sondern vielmehr wird diese Sequenz umgekehrt [7,77,154]. Interessanterweise ist es sogar möglich, eine durch Cre vermittelte Translokation von Chromosomenarmen zu errei-

1 Einleitung

chen, indem man die loxP Sequenzen in verschiedene Chromosome einsetzt. Während

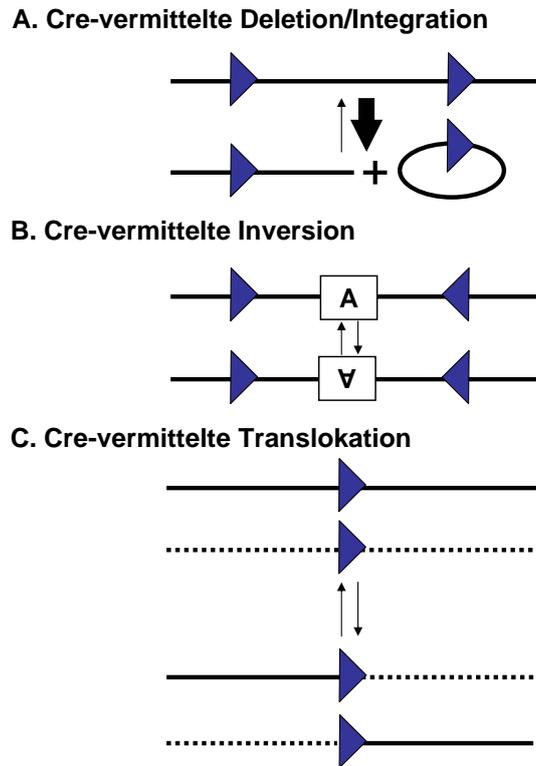


Abbildung 1.12: Cre/loxP Aktivitäten

bei der konventionellen Gentergeting-Strategie ein permanent modifiziertes Allel in allen Zellen des Tieres von Beginn der Entwicklung an erzeugt wird, so bietet konditionelles Gentergeting mit dem Cre/loxP System eine wesentlich flexiblere Modifizierung des Gens. Diese Modifikation ist entweder auf einen ganz bestimmten Zelltyp, gewebsspezifisch also, oder auf eine ganz bestimmte Zeit in der Lebensspanne eines Tieres, sprich zeitspezifisch, oder aber auch auf beides ausgerichtet [88, 146].

Als besonders nützlich erweist sich die konditionelle Methode des *gene targeting* bei Versuchen, eine bestimmte Funktion eines Genprodukts zu erforschen, bei denen die konventionelle komplette Inaktivierung eines Gens zu einem tödlichen oder massiv geschädigten Phänotyp führen würde und somit eine eingehende *in vivo* Untersuchung unmöglich machen oder erheblich erschweren würde. Ausserdem findet das konditionelle Gentergeting der häufig exprimierten Moleküle seine Anwendung in der Testung von Funktionen in einer bestimmten Zelllinie. Das Verwenden eines induzierbaren Promoters für die Cre-Expression hat den beachtlichen zusätzlichen Vorteil, dass das Wildtyp Produkt die ganze Zeit über bis zum Zeitpunkt der Induktion des Promoters beste-

1 Einleitung

hen bleiben kann. Schließlich könnte durch induzierbares Gentergeting eine mögliche Adaption zellulärer Antworten verhindert werden. Denn diese könnten kompensatorisch wirken, falls ein Genprodukt inaktiviert oder mittels einer konstitutiven, Zelltyp spezifischen Cre Expression modifiziert wurde.

1.3.3 Herstellung einer MIF-knockout Maus

Mit dem Hintergrundwissen, dass MIF nahezu ubiquitär exprimiert und sowohl in Keimzellen als auch in frühen Embryos [12, 93, 174] produziert wird, entschieden sich *Fingerle-Rowson et al.* bei der Generierung einer MIF-knockout Maus für die Cre-loxP Technik des Gentergeting, um die embryonische Letalität zu umgehen. Desweiteren bietet diese Technik die Möglichkeit, das zu untersuchende Gen in einem zelltypspezifischen Hintergrund zu inaktivieren [88]. In Zusammenarbeit mit *Prof. Klaus Rajewski* (Institut für Genetik, Köln, Deutschland) konstruierte G. Fingerle-Rowson einen Vektor, welcher zwei Dinge sicherstellen sollte:

a) 100 %iger Verlust der Funktion von MIF nach Deletion des kompletten MIF-Gens (Promotor und alle Exons)

b) Normale Expression des MIF-Gens sobald es von loxP Sequenzen flankiert ist.

Sie fanden einen P1-genomischen Klon der Mauslinie 129/Sv, welcher MIF enthält. Die von loxP-Sequenzen umgebene NEO- Selektionskassette diente zur positiven Selektion und wurde innerhalb eines intrazisternalen A-Partikel (eine Art Retrotransposon) plaziert, welcher sich stromaufwärts des MIF-Promotors befindet und bekanntermaßen mutiert und damit inaktiv ist [93]. Eine dritte loxP Sequenz brachte man 1,2 kb stromabwärts des MIF-Gens an. Daraus ergab sich, dass zwischen den loxP Sequenzen 2 und 3 ein etwa 5,5 kb großes genomisches Fragment, welches das MIF-Gen enthält, eingeschlossen wurde. Der *targeting* Vektor beinhaltete zur negativen Selektion ebenso eine TK (Thymidinkinase). Als Zielzellen wurden ES-Zellen (Embryonale Stammzellen) der C57Bl/6 Mauslinie (Bruce-4 ES-Zellen [103] von *K. Rajewsky*) verwendet. Die Zielzellen wurden neun Tage lang selektiert und fünf bis sieben Tage lang mit Hilfe von Ganciclovir zu homologen Rekombinanten herangezuchtet.

Nachdem man die korrekten ES-Zellklone mittels Southern Blotting identifiziert hatte, galt es als nächstes die Neomycin-Selektionskassette, welche nun nicht mehr nötig war, zu eliminieren. Durch transiente Expression von Cre wurden *in vitro* in den ES-Zellen die von loxP-flankierten Genregionen deletiert. All diejenigen ES-Zellklone, welche nun G418 sensibel wurden, wurden aussortiert und durch *Southern blotting* analysiert. Es wurde analysiert, ob Cre entweder lediglich die Neomycin- Selektionskassette (Allel mit MIF, welches von loxP flankiert wird, MIF^{fllox}) oder aber die Selektionskassette zusammen mit dem MIF-Gen (*knockout*-Allel, MIF-) herausgeschnitten hat. Das

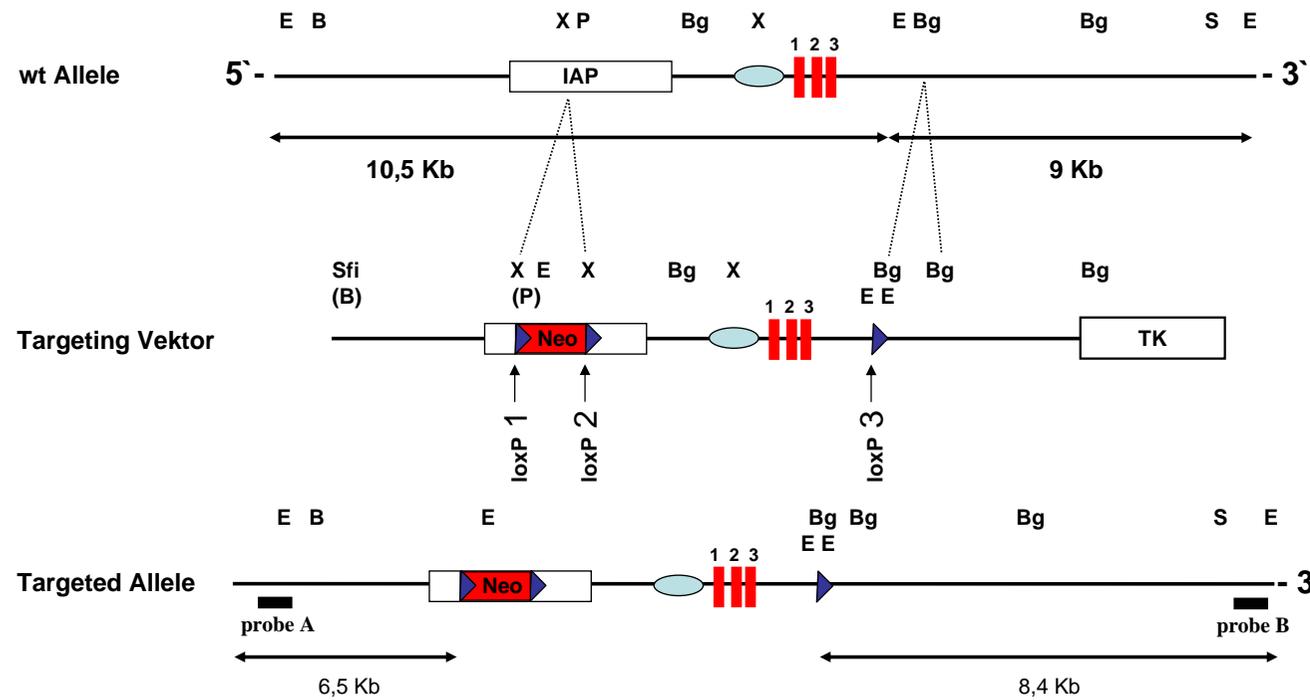


Abbildung 1.14: Teil eins des Gentargeting: Kreation des *targeting* Vektors und Identifikation homologer ES-Klone. Kreation des *targeting* Vektors: Der *targeting* Vektor wurde aus genomischer DNA aus 129/Sv Mäusen konstruiert, umgibt das MIF-Gen (5,5 Kb) durch loxP Sequenzen und enthält eine Selektionskassette für Neomycin innerhalb eines inaktiven Retrotransposons stromaufwärts des MIF-Promotors. (E = EcoRI, B = BamH 1, X = Xba1, P = PstI, Bg = Bg III, S = Sal 1, Sfi = Sfi I, Neo= Neomycin, TK= Thymidinkinase.)

1 Einleitung

knockout-Allel konnte vom Wildtyp- und *floxed*-Allel durch einen Restriktionslängenpolymorphismus im Southern Blotting abgegrenzt werden. Durch dieses Vorgehen erzielte man drei ES Zellklone, welche ein *floxed*-MIF-Allel besaßen und weitere dreizehn, welche ein *knockout*-Allel besaßen.

In Zusammenarbeit mit Prof. Sharpe (Harvard Medical School, Boston) wurden an-

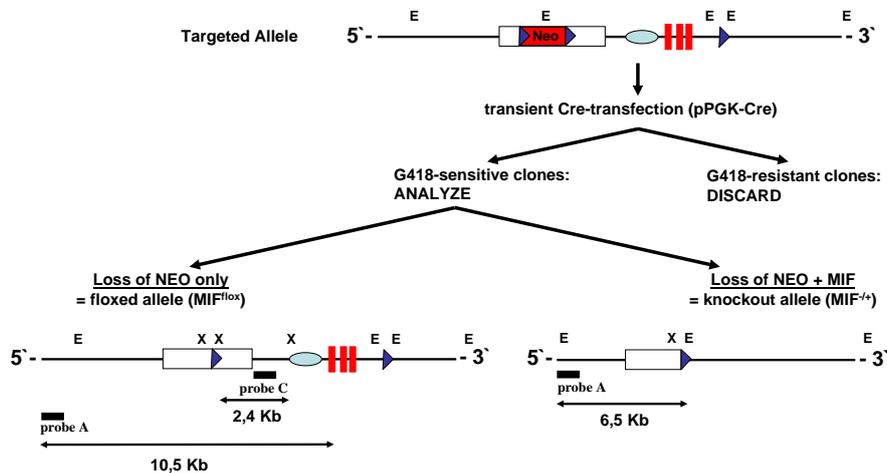


Abbildung 1.13: Teil zwei des Gentergeting: Transiente Cre-Transfektion und Selektion von *floxed* und MIF-defizienten Mäusen. Homologe ES-Zellklone wurden transient mit 3 µg pPGK-Cre transfiziert und auf G418 Sensibilität gescreent. Genomische DNA aus G418 sensitiven Zellklonen wurde extrahiert und auf das Vorhandensein von NEO und MIF getestet. Ein aus EcoRI und einer Probe A bestehender Verdau zeigte entweder eine 10,5 kb große Bande (Wildtyp) oder eine 6,5 kb große Bande (*knockout*). Der XbaI Verdau mit der Probe C deutete bei Vorhandensein eines 2,5 kKb großen Fragments auf den Genotyp MIF^{floxed} hin. *Floxed* = flanked by loxP sites.

schließlich die *floxed*- und die *knockout*-Klone in BALB/c Blastozysten injiziert, wonach man mehrere chimäre Mäuse für jeden Klon beobachten konnte. Männliche Chimäre wurden mit weiblichen C57Bl/6 Chimären verpaart und die daraus entstandenen Kinder, welchen das Zielallel vererbt wurde, wurden durch die Farbe ihres Fells und mittels PCR identifiziert. Heterozygote Kinder wurden mit anderen Heterozygoten zu Homozygoten gezüchtet. Da man stets C57Bl/6-ES-Zellen verwendete, waren all diese Mäuse genetisch reine C57Bl/6 Mäuse.

Um das erfolgreiche *targeting* zu bestätigen, wurden genomische DNA, mRNA und Proteine in der Leber von MIF^{+/+}, MIF^{-/+} und MIF^{-/-} Mäusen nach Injektion einer sublethalen Dosis von *E. coli* LPS untersucht. Mittels *Southern blotting*, *Northern blotting* und *Western blotting* konnten einerseits die erwarteten Banden und andererseits das Fehlen von MIF-mRNA nachgewiesen werden.

1.3.4 Die Mutagenese von MIF

Genetische Analysen erlauben nicht nur die komplette Inaktivierung von Genen durch Herstellung von *Knockouts*, sondern bieten ebenso die Möglichkeit Hypothesen oder Vorhersagen zu testen, die sich aus anderen Beweggründen, wie zum Beispiel im Rahmen der strukturellen Biologie oder Biochemie ergeben. Reges Interesse weckte die Tatsache, dass MIF einer Superfamilie von Proteinen angehört, welche allesamt eine kanalähnliche Struktur (entweder Homotrimerie oder Homohexamere) und eine enzymatische Funktion als Isomerase besitzen. Aufgrund der Entdeckung der Isomeraseaktivität von MIF, steht die Frage im Raum, ob diese Enzymaktivität die Grundlage der biologischen Aktivität von MIF sein könnte. Wie oben in dem Kapitel 1.2.4 auf Seite 5 dargestellt, beginnt MIF mit einem N-terminalen Prolin (Prolin1), welches die Grundlage der katalytischen Reaktion darstellt und für seine Aktivität als Isomerase verantwortlich ist. Prolin1 befindet sich an der Basis der katalytischen Tasche von MIF [175].

Andere bekannte strukturelle Komponenten von MIF beinhalten ein CXXC-Motiv in Position 57–60. Dieses könnte relevant für die Proteinfaltung oder die Protein-Protein Interaktion sein [91]. Da die vorhandenen biologischen *assays* zur MIF-Aktivität nicht sehr verlässlich und reproduzierbar waren, stellten *Fingerle-Rowson et al.* durch Mutagenese von Prolin1 eine Maus mit enzymatisch inaktivem MIF her. Dies ermöglichte ihnen die Hypothese zu überprüfen, ob die enzymatische Aktivität von MIF als Tautomerase eine biologische Bedeutung besitzt.

Um möglichst nur minimale Anteile der Struktur der hoch konservierten Tasche zu verändern, welche eventuell als Bindungsstelle für interagierende Proteine fungieren könnte, wurde bei der Mutagenese von MIF *in vivo* darauf geachtet, dass lediglich die enzymatische Aktivität, nicht aber die Proteinkonformation zerstört wird. Es wurden einige rekombinante Proteine mit Mutationen im N-Terminus kreiert (*Fingerle et al.*, unpublizierte Daten). Die enzymatische Aktivität von MIF kann durch verschiedene Mutationen verloren gehen. Mutationen im C-Terminus des Proteins führen zum Zerfall des Trimers und damit zum Verlust der Enzymaktivität. Sobald man Prolin1 durch Aminosäuren mit aliphatischen Resten (zum Beispiel Alanin) oder mit aromatischen Seitenketten (zum Beispiel Phenylalanin) ersetzt, geht die Isomeraseaktivität ebenfalls komplett verloren [75], da diese Mutationen die Struktur der katalytischen Tasche durch ihre Seitenketten beeinflussen.

Mutagenese mit Hilfe des *gene targeting*

Sie führen auch dazu, dass die Initiator-Aminosäure Methionin beibehalten wird, wohingegen es im Wildtyp Protein abgespalten wird. Röntgenstrukturanalysen bewiesen, dass lediglich die Mutation von Prolin1 zu der kleinsten Aminosäure Glycin (G), die

1 Einleitung

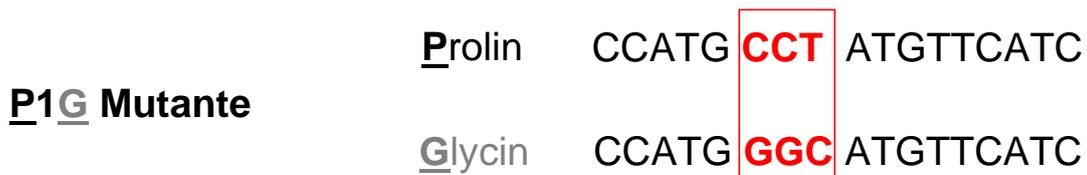


Abbildung 1.15: Strategie zur Mutation von MIF. *Fingerle-Rowson et al.* kreierten eine Maus, bei welcher das Prolin an Position 1, genannt Prolin1 durch Glycin ausgetauscht wurde. Dies geschah durch einen Austausch des „CCT“ Codons gegen ein „GGC“ Codon. Hierdurch wird die Konformation des Proteins trotz des Verlusts der Isomerase-Aktivität nicht gestört.

Struktur dieser Tasche erhalten kann und die Isomeraseaktivität von MIF trotzdem eliminiert [112]. Das N-terminale Prolin ist in der Maus durch ein Codon „CCT“ kodiert. Da unterschiedliche Codons in der Maus auch die Proteinexpression beeinträchtigen können, wurde für Glycin das häufigste Codon „GGC“ gewählt [136] (siehe Abbildung 1.15). *Fingerle-Rowson et al.* konnten zeigen, dass die P1G Mutation keine detektierbare enzymatische Aktivität aufwies. Ein auf der Cre-loxP-Technik basierender *targeting* Vektor wurde konstruiert, bei welchem die gewünschte Mutation von Prolin1 zu Glycin im Exon1 enthalten war. Die Selektionskassette bestand aus dem Neomycin-Resistenzgen unter Kontrolle des Polymerase II-Promoters und war mit dem Cre-Gen unter Kontrolle des spermienspezifischen Promoters *Angiotensin converting enzyme* (tACE). Diese mit loxP-flankierte Selektionskassette exzidiert sich selbst während der Expression von Cre in Spermatogonien und hinterlässt lediglich eine loxP-Sequenz im Genom. Dieser *targeting* Vektor wurde in C57Bl/6-ES-Zellen (Bruce-4) transfiziert, homologe Rekombinanten durch *Southern blotting* identifiziert und chimäre Mäuse durch Blastozysteninjektionen generiert. Einige männliche chimäre Mäuse übertrugen das mutierte Allel auf ihren Nachwuchs und diese heterozygoten Mäuse wurden zur Homozygotie gezüchtet (*Fingerle-Rowson et al.*, unveröffentlicht).

Um sicher zu gehen, dass potentielle Phänotypen in den mutierten Mäusen nicht auf eine insuffiziente Expression von mutantem MIF zurückzuführen waren, testete die Arbeitsgruppe die Menge der MIF-Expression in männlichen Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren mittels *Northern* und *Western Blotting*. MIF^{P8} mRNA wurde in äquivalenter Menge wie Wildtyp MIF exprimiert, das MIF^{P8} Protein war wie Wildtyp exprimiert. Die Mäuse mit der P1G Mutation zeigten normale Fertilität. Bei einer histologischen Untersuchungsreihe der Haut, der Milz, der Leber, Niere, Herz, Lunge, Sklettsystem und Muskeln, sowie des Gastrointestinaltrakts, der Ovarien, der Nebenniere und des Gehirns von acht Wochen alten homozygoten weiblichen Mäusen, fanden sich keine morphologischen Abnormalitäten (*Fingerle-Rowson et al.*, unveröffentlicht.).

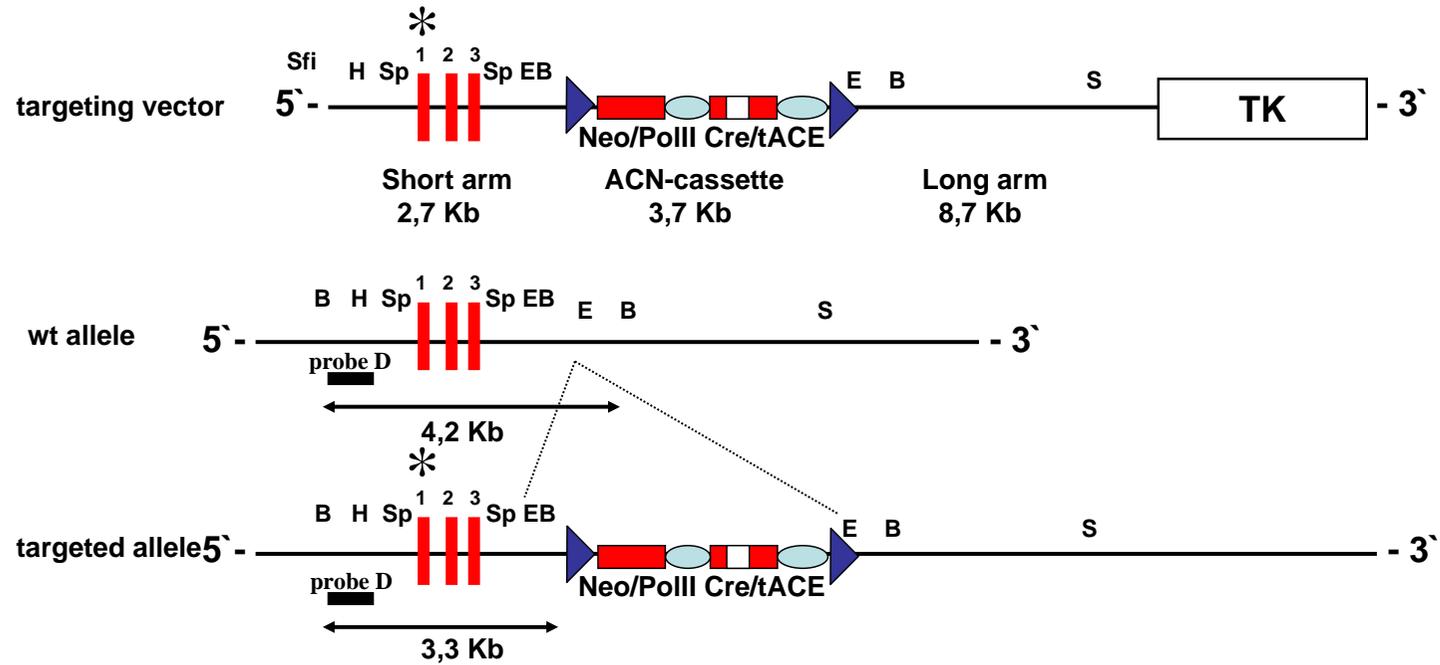


Abbildung 1.16: Die Mutagenese des MIF Gens. Targeting Strategie: H = Hind III, Sp = Spe I, E = EcoR I, B = BamH 1, S= Sal I, Neo = Neomycin, TK = Thymidinkinase, * = Mutation. (Fingerle-Rowson *et al.*, unveröffentlicht).

1.3.5 Das Prinzip des Gentransfers in Fibroblasten

Unter Gentransfer versteht man die Übertragung von Genen und anderen genomischen Elementen in Zellen. Hierbei bedient man sich verschiedener Techniken, die sich sowohl darauf beziehen, in welchem Vektor ein Gen übertragen wird als auch mit Hilfe welcher Technik ein Gentransfer stattfindet. Techniken des Gentransfers ermöglichen zunehmend Gene zu identifizieren, die für bestimmte Erbkrankheiten verantwortlich sind. Durch gezielte Korrektur zellulärer Defekte und damit mutierter Gene und Übertragung des Wildtyp-Gens kann gezeigt werden, ob ein mutiertes Gen eine bestimmte Krankheit zu verursachen vermag. Als Beispiele für Erbkrankheiten, deren Ursache ein mutiertes Gen darstellt, sind die *Xeroderma pigmentosum*, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sowie die Fanconi-Anämie zu nennen.

Einteilung der Methoden des Gentransfers

Die Methoden des Gentransfers sind vielfältig und bieten jeweils gewisse Vor- und Nachteile. So muß in jedem Fall individuell entschieden werden, welche Technik am besten geeignet ist und am ehesten zum erwünschten Erfolg führt.

Zunächst wäre die Kalziumphosphat-Transfektion zu nennen, welche eine der ältesten und ebenso der am weitesten verbreiteten Methoden darstellt. Hierbei macht man sich das Prinzip der phagozytotischen Aufnahme eines Kopräzipitats aus DNA und Kalziumphosphat zu Nutze [68]. Nach Phagozytose dieses Kopräzipitats gelangen einige DNA Moleküle zum Zielort Zellkern, wo sie nun transkribiert werden können. Auf diese Art und Weise können in etwa 3 % transiente Transfektanten und in etwa 0,05 % stabile Transfektanten erzielt werden, wobei die Effizienz sowohl durch Verwendung zirkulärer DNA als auch durch Temperatur, pH-Wert und Zugabe von Dimethylsulfoxid optimiert werden kann.

Eine weitere Methode stellt die auch von uns verwendete Transfektion mit Hilfe von Lipofectamin dar. Hierbei bringt man die DNA als Teil eines Komplexes mit Lipopolyaminen in eine eukaryontische Zelle ein. Nachdem die einzubringende DNA an Lipofectamin gebunden wurde, wird sie durch das Lipofectamin von einer kationischen Schicht umgeben. Der hier entstandene Komplex kann mit der Zellmembran fusionieren und die DNA so in das Zytoplasma transportiert werden. Die Effizienz dieser Methode beträgt für die Expression eines übertragenen Gens 10 %, für das Entstehen stabiler Transfektanten etwa 0,05–0,1 %.

Bei der Elektroporation werden mittels eines kurzen elektrischen Impulses, welcher die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig erhöht, größere DNA Moleküle in Zellen eingebracht [38, 139]. Die Effizienz dieser Methode hängt wesentlich von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, von der Dauer des elektrischen Impulses, der

1 Einleitung

Temperatur vor und nach dem Impuls, aber auch von der Menge der DNA und vom verwendeten Elektroporationsmedium ab. Um demnach maximale Elektroporationseffizienzen zu erzielen, müssen all diese Parameter für den jeweiligen Zelltyp individuell optimal eingestellt werden [192].

Das Prinzip der Mikroinjektion verfolgten als erste *Diacumakos et al.* [50], indem sie zeigten, dass kultivierte menschliche Zellen mit ausgezogenen Glaskapillaren erfolgreich mikroinjiziert werden können. Die effektive Translation von heterospezifischer mRNA nach Mikroinjektion konnte von *Stacey, Allfrey* [163] und *Graessmann* [67] demonstriert werden. Diese Methode eignet sich besonders für die transiente Expression, da bis zu 100 % der injizierten Zellen die Expression eines übertragenen Gens zeigen können. Daraus ergibt sich mit 0,1–0,2 % auch eine hohe Rate an stabilen Transfektanten. Einen wesentlichen Nachteil stellt jedoch die geringe Zahl derjenigen Zellen dar, welche korrekt injiziert werden können.

Wirkprinzip des retroviralen Gentransfers

Von besonderem Interesse im Rahmen der Gentechnik ist die retrovirale Transduktion. Hierbei kommen Retroviren zum Einsatz, sogenannte RNA-Viren, deren RNA-Genom nach Infektion einer Wirtszelle in DNA revers transkribiert und anschließend ins Wirtszellgenom mit Hilfe von Integrasen integriert wird. Man unterscheidet ecotrope und antitrope Retroviren. Letztere können murine und humane Zellen infizieren, ecotrope Retroviren infizieren nur Mauszellen. Die Infektion einer Zelle findet über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose statt. Voraussetzung für die experimentelle Verwendung solcher Retroviren ist jedoch, dass der Virus eine eukaryote Zelle nur einmal infizieren kann und sich in der Zelle nicht mehr vermehrt (replikationsdefiziente Retroviren). Nach Konstruktion eines Vektors *in vitro* wird dieser via Transfektion in eine eukaryote *packaging cell* gebracht, wo er von Hüllenproteinen verpackt wird. Dieses infektiöse Virus infiziert jede Zelle nur einmal. Sobald nach Infektion der Wirtszelle das Genom in diese integriert worden ist, entstehen mehrere Zellklone, welche ein homogenes Virus synthetisieren. Derjenige Klon, der den korrekten retroviralen Vektor auch in ausreichenden Mengen produziert, wird für das weitere Vorgehen verwendet.

Effizienz und Einsatzmöglichkeiten des retroviralen Gentransfers

Leider ist die Effizienz, die mit Hilfe solcher retroviraler Vektoren erzielt werden können, nach wie vor noch enttäuschend. So ist es lediglich in 20 % der Fälle möglich Mauszellen zu transduzieren und nur in 1–5 % können menschliche Blutstammzellen transduziert werden. Trotz berechtigter Erfolgsaussichten, die diese Methode bietet, wirkt die potentielle Gefährdung durch Retroviren hemmend auf die Arbeit mit diesen. In

1 Einleitung

diesem Zusammenhang wären die mögliche Rekombination mit der Folge der Produktion replikationsfähiger Retroviren, aber auch die mutagene Aktivierung eines Onkogens durch retrovirale Integration, welche Neoplasien verursachen können, zu nennen. Replikationsfähige Viren sind im Stande eine Zelle über einen längeren Zeitraum wiederholt zu infizieren, sie somit chronisch zu infizieren, was die Wahrscheinlichkeit für eine durch Integration begünstigte Onkogenaktivierung erhöht.

2 Ziele der Arbeit

MIF spielt in verschiedenen biologischen Prozessen, wie Embryogenese, Wachstum und Proliferation, Entzündung und Tumorgenese eine wichtige Rolle. In bisherigen Forschungsergebnissen basierend auf MIF *Knockout*-Mäusen und Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass MIF als Inhibitor der tumorsuppressiven Aktivität von p53 agiert und die maligne Transformation in Mausfibroblasten fördert. Somit kann MIF als Tumorpromoter klassifiziert werden. Der Wirkmechanismus von MIF ist noch nicht gänzlich geklärt und sowohl enzymatische Aktivität, rezeptorvermittelte Zellaktivierung und intrazelluläre Regulation via MIF-bindenden zytosolischen Regulatoren kommen in Frage. Da die Inhibition von MIF eine neue mögliche Therapiestrategie zur Behandlung von Tumorerkrankungen darstellt, sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Liegt die Isomerase-Aktivität von MIF der biologischen Aktivität von MIF bei der malignen Transformation zugrunde?
2. Kann MIF unabhängig von p53 die Tumorentstehung beeinflussen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer (50×)	2 M Tris/HCl 1 M NaAcetat 62,5 mM EDTA pH 8,5
Tautomerase Assay Puffer	50 mM Phosphat 1 mM EDTA pH 6,0
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-Lösung	1,21 % Tris base 0,75 % Glycin
DNA-Auftragspuffer (10×)	10 mM Tris/HCL pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 50 % Glycerin 0,01 % Bromphenolblau
BSA	(Sigma, St.Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, St.Louis, USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	(PAN, Aidenbach)

3.1.2 Mausstämme

Genotyp	Beschreibung	Stammname und Herkunft
MIF ^{-/-}	homozygoter <i>knockout</i> des MIF Gens	<i>Fingerle-Rowson et al.</i> , unveröffentlicht
MIF ^{wt}	Wildtyp-Kontrolle zur MIF ^{-/-} -Maus	C57Bl6, Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA
MIF ^{Pg/Pg}	homozygote Mutante des MIF Gens von Prolin1 zu Glycin	<i>Fingerle-Rowson et al.</i> , unveröffentlicht
p53 ^{-/-}	homozygoter <i>knockout</i> des p53 Gens	C57Bl6-Tip53 tml Tyj, Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA
p53 ^{-/-} -MIF ^{-/-}	enthält einen homozygoten <i>knockout</i> des p53 Gens und einen homozygoten <i>knockout</i> des MIF Gens	<i>Fingerle-Rowson et al.</i> , unveröffentlicht

Alle Mauszüchtungen wurden unter einem von der Universität München genehmigten Tierversuchsanzeige durchgeführt.

3.1.3 Zelllinien

Emryonale Maus Fibroblasten der Passage 2–6
 NIH3T3 Maus Fibroblasten (ATTC)
 Phönix Zellen E Linie (Nolan Lab, Stanford)

3.1.4 Bakterienstämme

E.coli XL-1 Blue (Stratagene, Heidelberg)

3.1.5 Retrovirale Vektoren

Folgende ecotrope und replikationsdefiziente retrovirale Vektoren wurden uns dankenswerterweise von Dr. O. Petrenko, SUNY, Stony Brook, NY, USA zur Verfügung gestellt:

REBNA
 REBNA-GFP
 REBNA-E1A
 REBNA-H-ras

3.1.6 Zellkulturmedien

DMEM Medium (PAN, Aidenbach)
Fötale Kälberserum (FCS)(PAN, Aidenbach)
Fötale Kälberserum (FCS)(Sigma, Osterode)
Optimem (Invitrogen, Karlsruhe)
PBS (PAN, Aidenbach)
PBS ohne Kalzium, Magnesium, Natriumbicarbonat (Gibco, Niederlande)

3.1.7 Chemikalien, Enzyme, Antikörper

Chemikalien

2-Mercaptoethanol (Sigma, St.Louis, USA)
Acrylamid 40 % (Serva, Heidelberg)
Agarose (Serva, Heidelberg)
Ammoniumchlorid (Cellsystems, St.Katharinen)
Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, München)
Ampicillin (Sigma, St.Louis, USA)
BSA ((Sigma, St.Louis, USA)
Detektionsreagenz ECL (Amersham, Braunschweig)
Dimethylsulfoxid (Sigma, St.Louis, USA)
DNA Längenstandards (MBI)
DNA Präparationskits (Qiagen, Hilden)
DNeasy Kit (Qiagen, Hilden)
Ethidiumbromid (Sigma)
Flüssigstickstoff (Linde, München)
Gelatine 0,1 % (Stem cell)
Giemsa stain (Sigma, Aldrich) Glycin (ICN, Aurora, Ohio, USA)
ISO-1 (dankenswerterweise von *Dr. Y. Al- Abed*, NSUH, New York, USA, zur Verfügung gestellt)
L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Methyl Ester (Sigma, St. Louis, USA)
Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe) Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-dipehnyltetrazolium bromide) (Sigma, St.Louis, USA)
Nicht essentielle Aminosäuren Mixtur (Gibco)
Paraformaldehyd 4 %
PCR Primer (Metabion, Martinsried)
PCR Supermix (Gibco)
PCR Platinum Supermix (Gibco)

3 Material und Methoden

Proteinmarker See Blue®Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe)
Puromycin (Sigma, St.Louis, USA)
Ripa Lysis Buffer (hauseigene Apotheke, München)
Roti Load (Roth, Karlsruhe)
saures Isopropanol (0,06 % HCl in 100 ml Isopropanol)
SDS (ICN, Aurora, Ohio, USA)
Temed (Roth, Karlsruhe)
Tris (Amersham, Freiburg)
Tritium-markiertes Thymidin (Amersham, Braunschweig)
Trypanblau 0,5 % (Serva, Heidelberg)
Trypsin EDTA (Gibco)
Tween 20 (Sigma)
Alle anderen Chemikalien (Sigma, St. Louis, USA oder Rothburg, Karlsruhe)

Enzyme

DNA Polymerase
Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase) (Promega, Mannheim)
Proteinase K (Sigma)

Antikörper

Tabelle 3.1: Antikörper

Spezifität	Subtyp	Firma
p16	Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
p21(Waf1/Cip1)	Maus monoklonal (F5)	Santa Cruz, Heidelberg
p27	Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
p53	Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
β-Tubulin	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
MIF (Ka 565)	Kaninchen polyklonal	Prof. Dr. J. Bernhagen, RWTH, Aachen
Adenovirus-2 E1A	Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
H-ras	Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') ₂	Amersham, Baunschweig
anti-mouse IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') ₂	Amersham, Freiburg

3.1.8 Geräte und Labormaterial

- Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau)
- Bakterienschüttler (Schleicher und Schüll)
- Blotting Papier (Schleicher und Schüll, Dassel)
- ECL Filme (Amersham, Braunschweig)
- Einfriergerät (Cryoson, Schöllkrippen)
- Einfrierröhrchen (Nunc, Roskilde DK)
- ELISA Reader mit Filtern 570 nm + 690 nm Entwickler (Agfa-Gevaert, Leverkusen)
- Flüssigstickstofftank (Cryoson, Schöllkrippen)
- Geldokumentationsanlage (LFT, Wasserburg)
- Gelelektrophorese-Systeme (Bio-Rad, München und OWL, Portsmouth, USA)
- Geltransferkammer (Bio-Rad, München)
- Heizblock (Techne, Cambridge GB)
- Inkubator (WTB, Tuttlingen)
- Mikroskope (Zeiss, Oberkochen)
- Parafilm M (American National Can, Greenwich USA)
- PCR-Maschine (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

3 Material und Methoden

pH-Meter (WTW, Weilheim)
Photometer (Pharmacia, Freiburg)
Pipetten (Gilson, Langenfeld)
Pipetten, Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)
Reinstwasseranlage(USF, Ransbach Baumbach)
Schüttler (Bühler, Tübingen)
Sterilbänke (BDK Sonnenbühl)
Sterilfilter (Gelman Sciences,Ann Arbor USA)
Taumelrolleninkubator (CAT, Staufen)
Überkopftrotoren (Labinco, Breda, Niederlande)
Vortex (Heidolph, Kelheim)
Waage (Sartorius, Göttingen)
Wasserbad (Köttermann, Hänigsen)
Zählkammern (Brand, Wertheim)
Zellschaber (Beckton Dickinson, Heidelberg)
Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg und Sigma, Osterode)

3.2 Methoden

3.2.1 Eukaryontische Zellkultur

Kultivierung von adhärennten Zellen und Suspensionszellen

DMEM Medium wurde mit 1 % Streptomycin/Penicillin, 10 oder 5 % FCS und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren komplettiert.

Alle Zellen wurden in Begasungsbrutschränken unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Fibroblasten wurden alle 2–4 Tage 1:3 verdünnt, so dass die Zellzahl zwischen $5 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^6$ pro ml betrug. Phönix Zellen wurden alle 2 Tage 1:3 bis 1:5 verdünnt, nachdem sie für 3–5 min mit Trypsin bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Das Inaktivieren des Trypsins erfolgte durch 10 % FCS-haltiges DMEM Medium. Falls das Experiment einen kompletten Mediumwechsel oder das Waschen der Zellen mit PBS erforderte, wurden die Zellen bei 400 rpm, 20 °C für 5 min sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen.

Einfrieren von Zellkulturen

Zur Lagerung von Dauerkulturen wurden etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen bei $400 \mu\text{m}$, 4°C für 10 min abzentrifugiert und in einer 1:1 Mischung aus Kulturmedium und Einfriermedium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in einem Behälter mit Isopropanol langsam auf -80°C eingefroren und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 80 % FCS
20 % DMSO

Auftauen von Dauerkulturen

Die 2 ml-Einfrieröhrchen wurden aus dem Stickstofftank genommen, auf Eis transportiert und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und tropfenweise in das entsprechende Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen.

Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Die MIF^{wt}- und MIF^{ko}-Mäuse wurden unter Beobachtung verpaart. Der Tag, an dem ein vaginaler Schleimpfropf beim Weibchen gesichert wurde, wurde als Tag E 0,5 definiert und davon ausgehend die Tage gezählt (1,5 → 2,5 → 3,5 etc.)

Am Tag E 14,5 wurde die Mutter durch CO₂-Begasung getötet. Nach Besprühen mit Desinfektionsmittel wurde das Abdomen eröffnet und die steril aus dem Uterus entnommenen Embryos in 15 cm Kulturschalen mit PBS gegeben. Drei 15 cm Schalen wurden mit PBS gefüllt und die Embryos darin gewaschen indem sie von einer Schale zur nächsten transportiert wurden.

Nach Entfernen des Uterus und des Amnion Sacks wurden die Embryos erneut nach demselben Schema zweimal gewaschen. Alle roten Organe (Leber, Herz, Milz) wurden nun vorsichtig entfernt, der Kopf abgetrennt und der restliche Körper des Embryos in einer PBS Schale gewaschen. In einer Schale ohne PBS wurde der Körper mit Hilfe von einer kleinen Schere in möglichst kleine Teilchen zerkleinert.

Um die Gewebestückchen in eine Zellsuspension zu überführen, wurden sie in einen Erlenmeyerkolben in 50 ml Trypsin/EDTA mit Glaskügelchen gegeben und 30 Minuten bei 37°C unter ständigem Rühren trypsiniert. Das Trypsin wurde daraufhin mit 50 ml EF Medium blockiert, die Suspension durch ein Nylonnetz gefiltert und diese in einer Zellkulturschale oder einem 50 ml Tube gesammelt. Anschließend wurde 10 min bei 400–800 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in MEF Medium resuspendiert.

3 Material und Methoden

Die Zellen wurden gezählt und $3 \cdot 10^6$ Zellen pro 15 cm Platte in 20 ml MEF Medium ausplattiert. Die Zellen wurden etwa drei Tage kultiviert bis sie konfluent waren. Am Tag drei wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin/ EDTA für etwa 5 min im Brutschrank trypsiniert und daraufhin mit derselben Menge an DMEM Medium geblockt. Um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurden die Zellen mehrmals auf- und abpipettiert und diese Suspension von insgesamt sechs Platten in einem 50 ml Falcon gesammelt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 400–800 g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen, das verbliebene Pellet in MEF Medium resuspendiert und auf Eis gestellt. Nach langsamer Zugabe von Einfriermedium wurden die Zellen aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam eingefroren. Nach einem Tag wurden die Cryotubes in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2 Produktion von rekombinantem Retrovirus

Transfektion

Zur transienten Transfektion von Phönixzellen wurde Lipofectamine Transfektionsreagenz von Invitrogen verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden etwa $7 \cdot 10^6$ Zellen auf eine 6 cm Platte ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion 60–80 % konfluent waren. Als nächstes wurde die DNA (3 μg Plasmid-DNA) in 1 ml Optimem gegeben und gemischt. In einem weiteren Falconröhrchen wurde zu 2 ml Optimem 22,5 μl Lipofectamine gegeben und vermischt. Die beiden Falcons wurden nun zusammenpipettiert und durch leichtes Anstupsen vermischt. Anschließend wurde die Transfektionslösung für 30–45 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Etwa 2 min vor der Transfektion wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 2 ml frischem, kühlem Optimem Medium gewaschen. Danach wurde die Lösung tropfenweise vorsichtig auf die vorbereiteten Phönixkulturen gegeben. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, am nächsten Tag das Medium inklusive der Transfektionslösung entfernt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn konnte der Überstand inklusive Virus abgenommen, restliche Phönixzellen abzentrifugiert, steril filtriert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden.

Produktion von rekombinantem Virus

Um murine MEFs mit den Onkogenen H-ras und E1A effektiv zu infizieren, verwendeten wir die ecotrophen, retroviralen Plasmide REBNA-H-ras und REBNA-E1A, welche die cDNA für H-ras und E1A enthalten und nur Nagetierzellen infizieren können (freundlicherweise von *O. Petrenko et al*, SUNY Stony Brook, NY, USA zur Verfügung gestellt). Als Produktionszelllinie für rekombinanten, ecotrophen Retrovirus wurden

3 Material und Methoden

Phönixzellen verwendet, welche bereits ein Verpackungsplasmid in ihrem Genom enthalten. Das zu verpackende retrovirale Plasmid wurde in Phönix Zellen mittels Lipofectamin transfiziert. Vor der Transfektion wurde der Boden einer 6 cm Platte mit steriler 0,1 % Gelatine bedeckt und eine Stunde lang im Brutschrank inkubiert, damit die Phönix Zellen besser an der Platte adhären. Im Anschluss wurden etwa $7 \cdot 10^5$ Zellen auf eine 6 cm Platte ausplattiert. Etwa 24 Stunden darauf wurden die Zellen einmal mit 2 ml Optimem gewaschen. Für die darauffolgende Transfektion wurde das Lipofectamin nach Anleitung des Herstellers verwendet. 5 bis 12 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig gewechselt und 4 ml frisches vorgewärmtes Medium zugegeben. Alle 48 Stunden nach Transfektionsbeginn wurde das Medium, das nun den infektiösen Retrovirus enthielt, abgenommen und durch Abzentrifugieren von restlichen Phönixzellen gereinigt. Der so produzierte Virusüberstand wurde in 2 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

Bestimmung des Retrovirustiters

Die Titerbestimmung des GFP-Kontroll-Virus wurde über durchflusszytometrische Bestimmung von GFP-positiven Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurden NIH 3T3-Zellen in 6-Well Platten mit 250 μl , 125 μl , 62,5 μl , 31,25 μl , 15,6 μl und 7,8 μl Virusüberstand infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl pro Well und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Der Titer berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl pro 6-cm Platte} \times \text{Anteil GFP-positiver Zellen}}{\mu\text{l Viruspräparation}} = \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$$

Alternativ dazu wurde der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen der mit dem Kontrollplasmid REBNA-GFP transfizierten Kontrollplatte unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt.

3.2.3 Retrovirale Infektion

Retrovirale Infektion von MEF

Die retrovirale Infektion von NIH3T3 oder MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg} MEFs erfolgte in 6 cm Platten. Dazu wurden am ersten Tag $4 \cdot 10^5$ Zellen pro 6 cm Platte ausgesät. 4 Stunden nach der Aussaat, sobald die Zellen an der Platte adhären, wurden die Zellen mit

3 Material und Methoden

jeweils gleicher Menge an E1A-haltigem Retrovirus pro Genotyp, sprich mit einem Volumen von 2000 μl Virus mit Zugabe von 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren für 4–10 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben, um das Polybren, welches zelltoxisch wirken kann, zu verdünnen. 24 Stunden nach der Infektion wurde das Medium erneut gewechselt. Zur erneuten Infektion mit dem zweiten Onkogen H-ras, wurden die bereits mit E1A infizierten Fibroblasten am dritten Tag gezählt und erneut $4 \cdot 10^5$ Zellen pro 6 cm Platte ausgesät. Die weiteren Schritte erfolgten in ihrem Ablauf wie bei der E1A Infektion. Nach Beurteilung der Vitalität und Effizienz der Infektion anhand des Phänotyps der transformierten Zellen wurden diese je nach Zelldichte im Verhältnis 1:3 bis 1:5 gesplittet. Am zehnten Tag wurden die Fibroblasten von je drei 6 cm pro Genotyp auf drei 10 cm Platten pro Genotyp überführt, um am Tag 14 für weitere Versuche zur Verfügung zu stehen. Diese Versuche umfaßten proteinbiochemische Analysen und *focus formation assay*.

Retrovirale Infektion von NIH 3T3-Zellen

Zur retroviralen Infektion von NIH 3T3-Zellen wurden einen Tag vor der Infektion $2 \cdot 10^5$ Zellen in ein 6-Well ausgesät. Die Infektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml DMEM Medium mit 10 % FCS, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren und entsprechendem Virusüberstand. 24 Stunden nach Infektion wurde das Medium gegen 2 ml frisches Medium ausgetauscht. 48 Stunden später erfolgte die GFP-Messung mittels FACS-Analyse.

Anzucht und Selektion stabiler Zelllinien

Die Anzucht von stabilen Fibroblasten erfolgte nachdem die Zellen sequenziell durch rekombinanten Retrovirus infiziert wurden. E1A und H-ras induzieren – wenn sie alleine in die eukaryontische Zelle gebracht werden – Seneszenz und Wachstumsstop. Erst die kombinierte Infektion mit E1A und H-ras vermag Zelllinien zu transformieren und verhindert Kontaktinhibition. MEFs, welche beide Onkogene integriert haben, verändern ihre Morphologie zu kleinen spindelförmigen Zellen, die rasch proliferieren und binnen weniger Tage die nicht doppelt-infizierten Zellen überwachsen. Da diese transformierten Zellen dadurch einen sehr stabilen Wachstumsvorteil haben, wurden Zellen mit effektiver Onkogen-Transfektion selektiert.

3.2.4 Kultivierung von Bakterien

Herstellung kompetenter Bakterien

Um *E. coli* XL-1 blue kompetent zu machen, wurden die Bakterien zunächst auf MgCl_2 -LB Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten Einzel-

3 Material und Methoden

kolonie wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die über Nachtkultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD 600 von 0,5 bis 0,9 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zellschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden nun vorsichtig in je 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde der Niederschlag in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen, zügig zu 200 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei –80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 0,7 und $2,0 \cdot 10^8$ Kolonien pro µg Plasmid-DNA.

Transformation von Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter *E. coli* XL1 blue-Bakterien und die Plasmide auf Eis aufgetaut. Von der zu transformierenden DNA wurde 1 Pipettenspitze (entspricht ca. 1 µl) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Danach wurden die Bakterien sofort wieder für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 500 µl warmem SOC-Medium wurde die Kultur für 45 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

SOC-Medium:

Trypton 10 g
Hefeextrakt 2,5 g
NaCl 0,25 g
H₂O dd. 485 ml

nach dem Autoklavieren zugeben:

1 M MgCl₂ 5 ml
1 M MgSO₄ 5 ml
2 M Glucose 5 ml
sterilfiltrieren

Plattenkultur

Das autoklavierte LB-Medium wurde nach dem Abkühlen auf 55 °C in sterile Petrischalen gegossen und anschließend bei 4 °C invertiert gelagert. Für die Anlegung von Plattenkulturen wurden die Bakterien aus einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatel auf sterile LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

Flüssigkultur

Mittels einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien (von Plattenkulturen oder aus Kryokulturen) gepickt, in LB/Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen konnte dann die Plasmid-DNA isoliert werden.

Kryo-Kulturen von Bakterien

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur abzentrifugiert und in LB/Amp-Medium aufgenommen, das zusätzlich 20 % Glycerin enthielt. Diese Suspension wurde in 2 ml Röhrchen gefüllt und bei –80 °C gelagert.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterien über Anionenaustauschersäulen isoliert. Es wurden Präparationen im „Mini“- und „Maxi“- Maßstab mit den Präparationsreagenzien und nach den Protokollen von *Qiagen* durchgeführt.

Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen

Die Isolierung genomischer DNA aus 0,6 cm langen Mäuseschwänzen erfolgte nach dem *DNAeasy* Protokoll von *Quiagen*. Das Gewebe wurde zunächst in einem *Eppendorf Tube* mittels Proteinase K bei 55 °C auf dem Thermoschüttler für mindestens 4 Stunden lysiert. Um die freigesetzte DNA zu präzipitieren wurde AL-Puffer, gemischt mit Ethanol zugegeben und anschließend kurz gevortext. Die entstandene Verbindung und das Präzipitat wurden jetzt in eine vorbereitete *DNAeasy Mini spin* Säule überführt und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert um die DNA zu binden. Um die DNA zu waschen wurde die Mini Säule in ein neues Sammelgefäß überführt, AW1-Puffer hinzugefügt und daraufhin erneut bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Mittels AW2-Puffer wurde

3 Material und Methoden

die *DNAeasy* Membran nun in einem neuen Sammelgefäß zunächst gewaschen und anschließend durch dreiminütige Zentrifugation bei 14000 rpm getrocknet. Zuletzt wurde die Mini Säule in ein steriles *Eppendorf Tube* gesetzt und TE-Puffer auf die Membran gegeben, kurz inkubiert und anschließend bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und die DNA somit eluiert. Die gewonnene DNA wurde im Kühlraum bei 4 °C mindestens 2 Tage gelagert, bevor sie für die PCR Genotypisierung verwendet wurde.

Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA nach enzymatischer Reaktion erfolgte mittels des *Qiaquick-Spin-Kits* von *Qiagen* über eine Säule nach Anleitung des Herstellers.

Polymerasekettenreaktion zur Genotypisierung

Zur *in vitro* Amplifizierung wurde als Matrize die zuvor aus den Mäuseschwänzen extrahierte DNA verwendet.

Amplifizierung des MIF^{floxed}-Allels und des MIF^{wt}-Allels

PCR-Primer:

S2: 5' -TTg ccT ATc AcA cTg ccc TTc- 3' (*forward*)

A2: 5' -cTg ggT ggT Tgg gAA gAT gc- 3' (*reverse*)

Amplifizierung des MIF^{ko}-Allels:

PCR-Primer:

A1: 5' -Agg TTA gTc Act cTA cTG gcc- 3' (*forward*)

C1: 5' -ggc Tcc Tgg TcT cAG TcA gg- 3' (*reverse*)

Tabelle 3.2: PCR Protokoll für MIF^{floxed} und MIF^{wt}.

Reaktionsansatz	Protokoll:
22 µl PCR Platinum SuperMix (Invitrogen)	94 °C - 2 min
1 µl Primer S2/ A1	36 Zyklen:
1 µl Primer A2/ C1	Denaturierung: 94 °C - 1 min
1 µl DNA	Hybridisierung: 62 °C - 45 sec
total = 25 µl	Synthese: 72 °C - 45 sec
	nach 36 Zyklen:
	Synthese: 72 °C - 10 min
	Abkühlung: 4 °C - forever

Amplifizierung des p53^{wt}-Allels

PCR Primer:

P53 intron5: 5' -tct ccc ggc ttc tga ctt att ctt- 3' (*forward*)

P53 intron6: 5' -gtc gct ccc tac ctc act aca g- 3' (*reverse*)

Amplifizierung des p53^{ko}-Allels

PCR-Primer:

P53 neo1: 5' -ctt ggg tgg aga ggc tat tc -3' (*forward*)

P53 neo2: 5' -agg tga gat gac agg aga tc -3' (*reverse*)

Tabelle 3.3: PCR Protokoll für p53^{wt} und p53^{ko}.

Reaktionsansatz	Protokoll:
22 µl PCR Supermix	94 °C- 2 min
1 µl Primer p53 intron5/neo1	35 Zyklen
1 µl Primer p53 intron6/ neo2	Denaturierung: 94 °C - 1 min
1 µl DNA	Hybridisierung: 58 °C - 40 sec
total = 25 µl	Synthese: 72 °C - 40 sec
	nach 35 Zyklen:
	Synthese: 72 °C - 10 min
	Abkühlung: 4 °C - forever

Die Primer und die PCR-Lösung wurden auf Eis zusammenpipettiert. Anschließend wurde der Ansatz in ein verschließbares 100 µl Reaktionsgefäß gegeben und im Thermocycler mit dem oben angegebenen Protokoll durchgeführt. Das hierbei entstandene PCR Produkt wurde anschließend in einem 1,5–2 %igem Agarosegel ausgewertet.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration (0,8–2 %) mit 1 × TAE-Puffer aufgeschlänmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einem entsprechenden Kamm bestückt und nach dem Erstarren in die Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer mit 50 bis 100 Volt durchgeführt. Anschließend konnte die DNA durch UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Parallel aufgetragene Größenmarker er-

laubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente. Die erwarteten Längen für die DNA Fragmente betragen:

- MIF^{floxed}-Allel: 683 bp
- MIF^{wt}-Allel: 544 bp
- MIF^{ko}-Allel: 383 bp
- p53^{wt}-Allel: 518 bp
- p53^{ko}-Allel: 300 bp

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden

Lyse von Zellen und Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen

Um Gesamtprotein aus dem Intrazellulärraum von eukaryontischen Zellen zu isolieren, ist es nötig diese zu lysieren und damit die Zellmembran zu zerstören. Die Zusammensetzung des Lysepuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung und sollten je nach Fragestellung optimiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysepuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. NP40 ist ein stärkeres Detergens, aber in geringeren Konzentrationen macht es auch Membranproteine gut löslich. Zu den Funktionen der weiteren Komponenten: Glycerin dient als Gefrierschutz, EDTA zur Komplexbildung von Mg^{2+} und Mn^{2+} und damit der Inhibierung von Kinasen. NaCl ist wichtig für das Einstellen der Osmolarität, Tris-Cl dient als pH-Puffer, NaF fungiert als Serin- und Threonin-Phosphataseinhibitor und Phenylphosphat als Phosphataseinhibitor. Zusätzlich wurden dem Lysepuffer folgende Inhibitoren zugefügt:

PMSF, Leupeptin, Aprotinin (Proteaseinhibitoren), sowie Natriumorthovanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor). Alternativ dazu wurde Proteinaseinhibitor-Cocktail und Phosphataseinhibitor-Cocktail von *Sigma* zugegeben. Um Proteine und Proteinkomplexe vor Proteolyse oder Dissoziation zu schützen, wurden alle Kulturschalen sowie Lysate auf Eis gehalten. Alternativ wurde für die Lyse der Zellen Ripa Buffer als Lysepuffer verwendet, dem die Protease- und Phosphatase Inhibitoren in einer Konzentration von 1:1000 zugegeben wurde.

Lyse von transformierten Maus Fibroblasten

14 Tage nach der Infektion wurde das Medium einer 10 cm Platte abgenommen, die Platte zunächst zweimal mit 3 ml kaltem PBS gewaschen und der verbliebene Überstand mit einer Pipette entfernt. Jetzt wurden 400 μ l Ripa-Lysepuffer auf die Platte ge-

3 Material und Methoden

geben. Nach etwa zehnminütiger Inkubation wurden die Zellen inklusive dem Überstand mittels eines Zellschabers von der Platte gekratzt und in ein gekühltes *Eppendorf Tube* überführt. Anschließend wurden die Proben für 30 min in Lysepuffer bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert und kräftig gevortext. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 20 min bei 4 °C und 15000 rpm von unlöslichen Zellmembrananteilen befreit und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. In dem klaren Lysat befanden sich jetzt zytosolische, nukleäre und membranäre Zellproteine. Für einige Experimente wurde frisches Lysat hergestellt, für die meisten jedoch wurde das Lysat bei –80 °C eingefroren und später verwendet.

Lyse von Fibroblasten nach Behandlung mit Chemotherapeutika

$1 \cdot 10^7$ Zellen/400 µl Lysepuffer wurden 0, 2, 4 und 6 Stunden nach Behandlung mit Cisplatin während des exponentiellen Wachstums zweimal mit kaltem PBS gewaschen, 30 min im Kühlraum auf dem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend bei 15000 rpm zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Die Lysate konnten nun bei –80 °C eingefroren werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in einem Zelllysate erfolgte durch die BCA-Methode mit den Reagenzien von *Pierce* (Rockford, USA). Dazu wurden 900 µl BCA-Reagenz, 98 µl dd H₂O und 2 µl Lysat vermischt und für 5 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Als Referenz dienten 900 µl BCA-Reagenz mit 100 µl dd H₂O. Parallel dazu wurde auf dieselbe Weise mit bekannten Mengen an Rinderserum-Albumin (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg BSA oder alternativ 1, 3, 9, 27, 81 µg BSA) eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe über die Absorption die Proteinmenge bestimmt werden konnte. Alternativ wurde die Proteinbestimmung mittels Bradford Reagenz durchgeführt.

Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht über Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einem konstanten Verhältnis (1 SDS/2 Aminosäuren) an Proteine, so dass die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS markiert wird.

Herstellen der Polyacrylamidgele

Zwei Glasplatten (für 8×10 cm große Gele) wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Hierfür wurden die Reagenzien in der unten angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagrecht gehaltenen Glasplatten pipettiert. Der Zwischenraum wurde bis 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles mit 1 ml Isopropanol überschichtet und für mindestens 45 min zum Polymerisieren stehengelassen. Die Isopropanolschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgegossen und mit Filterpapier abgesaugt. Nach zweimaligem Ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt. Dann wurde ein vorher mit 70 % Ethanol gereinigter Kamm (10 Zähne) so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt. Diese wurde mit $1 \times$ Elektrophoresepuffer gefüllt.

Beladen der Gele mit Proteinproben

Die Proteinlysate wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 5 min auf 100°C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit $12 \mu\text{l}$ Proteinmarker beladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei Raumtemperatur statt. Der Gellauf erfolgte bei 80–110 V. Der Gellauf wurde beendet, wenn die blaue Bande des Farbmarkers im Probenpuffer den unteren Rand der Glasplatten erreicht hat. Dann wurde das Gel für Immunoblots weiter verwendet.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Tris-Puffers.

4 × Tris-Cl/SDS pH 8,8		4 × Tris-Cl/SDS pH 6,8	
dd H ₂ O	300 ml	dd H ₂ O	40 ml
Tris	91 g	Tris	6,05 g
SDS	2 g	SDS	0,4 g
dd H ₂ O	ad. 500 ml	dd H ₂ O	ad. 100 ml
mit HCl pH 8,8 einstellen		mit HCl pH 6,8 einstellen	
mit 0,45 µm Filter filtrieren			
mit 0,45 µm Filter filtrieren			
Trenngel 10%		Sammelgel	
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (40%)	1,25 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (40%)	150 µl
4 × Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml	4 × Tris-Cl/SDS pH 6,8	0,4 ml
dd H ₂ O	2,5 ml	dd H ₂ O	1 ml
TEMED	17 µl	TEMED	2 µl
APS ⁱ 10%	8,5 µl	APS ⁱ 10%	8,5 µl
5 × Elektrophoresepuffer		2 × Probenpuffer	
Tris	15,1 g	4 × Tris-Cl/ SDS pH 6,8	12,5 ml
Glycin	72 g	SDS 10%	20 ml
SDS	5 g	β-Mercaptoethanol	2 ml
dd H ₂ O	ad. 1000 ml	Glycerin	20 ml
		Bromphenolblau	1 mg
		dd H ₂ O	45,5 ml

ⁱ APS 10%: 10%-ige Lösung von APS in dd H₂O, die aliquotiert und bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert wurde.

3.2.7 Proteinimmunologische Methoden

Transfer (Western Blot)

Die zu analysierenden Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und zur weiteren Handhabung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine Nitrozellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in dd H₂O geschwenkt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman 3 MM-Papierstücke von der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Vom Polyacrylamidgel, das die nach Größe aufgetrennten Proteine enthält, wurde das Sammelgel abgeschnitten. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei durch Ausrollen mit einer Glaspipette aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Nitrozellulose-Membran, Whatman-Papier, Schwamm. Die Kassette wurde nun geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4 °C (Kühlraum) und 100 V für mindestens zwei Stunden.

Blockieren der Nitrozellulose-Membran

Die auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteine wurden durch Antikörper analysiert. Da Antikörper aber auch unspezifisch an verschiedene Materialien binden können, ist es notwendig, alle Stellen der Membran, an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem unspezifischen Protein zu blockieren. Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde in einer Plastikschaale mit Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in 1 × TBST oder 0,5 % Gelatine in Net) geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1 × TBST gespült und für 5 min in 1 × TBST geschüttelt, um überschüssige Blockierlösung wegzuwaschen. Wenn eine Inkubation mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt werden sollte, wurde die Membran an den entsprechenden Stellen mit einem Skalpell geschnitten.

Antikörper-Inkubation

Die meisten der verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:5000 Verdünnungen jeweils in Inkubationslösung eingesetzt.

Als Inkubationslösung wurde für alle Antikörper 1 % Magermilchpulver in 1 × TBST verwendet. Die Membran wurde in ein Schälchen gelegt, mit 10 ml der Antikörperlösung bedeckt und anschließend auf dem Schüttler für 1–2 Stunden inkubiert. Alterna-

3 Material und Methoden

tiv wurde die Membran in ein Falconröhrchen eingerollt, so dass die Proteinseite nach innen zeigte. Die Inkubation erfolgte in dem Röhrchen mit 3 ml der Antikörperlösung für 1–2 Stunden auf einem Taumelrolleninkubator. Dann wurde die Membran zunächst viermal mit $1 \times$ TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper ebenfalls in dem Röhrchen für 30 min inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem dreimaligen Waschen. Für die Anti-Phosphorylierungs-Antikörper wurde die Membran in Plastikschrälchen über Nacht auf einem Schwenkinkubator bei 4°C (Kühlraum) gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Membran viermal mit TBST gewaschen um anschließend für 45 min mit dem zweiten Antikörper inkubiert zu werden. Danach konnten nach erneutem Waschen mit TBST für 4×5 min die Proteine detektiert werden.

Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die ECL-Lösungen, die das Substrat für die Peroxidase enthalten, wurden 1:1 gemischt. Die Membran wurde in einer Plastikschräle mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch gut getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf ein mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt. Das Ganze wurde nun mit einer Plastikfolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für verschiedene Zeitabstände (1 Sek bis 10 min) mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Folienstift übertragen.

Strippen der ECL-Blots

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die Membran mehrfach (bis zu dreimal) einer Immun-detektion zu unterziehen. Bei dem sogenannten *Strippen* werden zunächst sowohl die sekundären als auch die primären Antikörper von der Membran entfernt. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich.

Die Membran wurde im Wasserbad bei 55°C für 45 min in *Stripping*-Lösung geschüttelt, dann mit $1 \times$ TBST einmal gespült und zweimal für 10 min gewaschen. Schließlich wurde erneut blockiert und mit Antikörpern inkubiert wie oben angegeben.

3 Material und Methoden

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der *Stripping*-Lösung.

Stripping-Solution:	Tris-Cl pH 6,7	3,78 g
	SDS	10 g
	β-Mercaptoethanol	3,5 ml
	dd H ₂ O	ad. 500 ml
10× TBST:	1 M Tris-Cl pH 8	100 ml
	5 M NaCl	300 ml
	Tween 20	5 ml
	dd H ₂ O	ad. 1000 ml

3.2.8 Zellbasierende Analyse-Methoden

Detektion der GFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen durch FACS-Analyse

Die Detektion von GFP-positiven Zellen erfolgte durch FACS-Analyse. Dazu wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in einem FACS Röhrchen abzentrifugiert. Sie wurden einmal mit 2 ml PBS gewaschen und zur FACS-Analyse in 500 ml PBS resuspendiert.

Konfluenzassay

Um die Sensitivität der einzelnen Fibroblasten-Zelllinien auf Kontaktinhibition miteinander zu vergleichen wurde die Methode des Konfluenzassays gewählt. An Tag 1 wurden hierzu Fibroblasten in 60 % Dichte auf einer 10 cm Platte in 10 ml Medium ausgesät. Die Zellen ließ man bis zur Konfluenz wachsen und bestimmte die Zellzahl und -dichte am Tag drei nach Erreichen der mikroskopischen Konfluenz. Zusätzlich wurden Proteinlysate nach den oben genannten Protokollen angefertigt.

Bestimmung der Zellvitalität durch Zählen der Zellen

Um die Anzahl lebender Zellen einer Zellpopulation zu bestimmen, ist die direkteste Methode, die Lebendzellzahl durch Zählen zu ermitteln. Um exakte Zellmengen zu bestimmen, wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblauausschluß-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden 20 µl einer Zellpopulation in eine 96-Well-Platte überführt und mit 20 µl 0,5 % Trypanblau-Lösung gut gemischt. Von dieser Mischung wurden etwa 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Blau-gefärbte Zellen gelten dabei als tote Zellen

3 Material und Methoden

und wurden nicht mitgezählt.

Aus der Zahl der ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor lässt sich nun folgendermaßen die Zellzahl berechnen:

Zellzahl im Quadrat $\cdot 1 \cdot 10^4 \cdot$ Verdünnungsfaktor = Zellzahl/ml Medium.

Zur Bestimmung der relativen Zu- oder Abnahme der Zellzahl kann man die Zellzahl einer Probe auf die Zellzahl einer unbehandelten Kontrolle beziehen.

Induzierte Apoptose mittels Gamma Bestrahlung

Zunächst wurden die MIF^{wt}- und MIF^{ko}-Fibroblasten auf kleine Platten (3–6 cm) plattiert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden jeweils eine Platte pro Konzentration und Genotyp mit 0, 500, 1000, 3000, und 6000 rad von einer Kobalt-Bestrahlungsanlage bestrahlt. Nach 0, 12, 24 und 48 stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd 5 min lang fixiert, um sie dann mit 1000 µl Trypanblau oder Hoechst 33342 (5 µg/ml) ca. 5 min inkubieren zu lassen. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS untersuchte man die Platten unter dem Lichtmikroskop, wobei man diejenigen Zellen zählte, deren Kern zerfallen war. Zuletzt wurde das Verhältnis der Zellen mit zerfallenem Zellkern zur Gesamtzellzahl bestimmt. Alternativ wurden die Apoptose-*assays* folgendermaßen angefertigt:

Die Fibroblasten wurden auf zuvor sterilisierten Deckgläsern angezchtet. Diese wurden sobald die Zellen konfluent waren bestrahlt, daraufhin mit Hoechst angefärbt und umgekehrt auf den Objektträger gegeben. Mit Hilfe von Öl sollte die Apoptoserate unter möglichst großer Vergrößerung ermittelt werden. Es wurden 3 Objektträger pro Genotyp für je 1000 rad, 3000 rad und 6000 rad gefertigt.

Induzierte Apoptose mit Hilfe des Chemotherapeutikums Cisplatin

Um zielgerichtet Apoptose in Zellpopulationen zu induzieren, wurden Fibroblasten in einer Dichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm Platte ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen wurde das bisherige Medium vorsichtig aspiriert und pro Platte 7 ml eines mit 20 µM Cisplatin-versetzten DMEM Mediums zugegeben. Nach jeweils 0, 2, 4 und 6 Stunden Inkubation wurden Proteinlysate hergestellt, die zur weiteren Analyse vorerst bei –80 °C eingefroren wurden.

Tautomerase Assay

Bevor der *assay* gestartet werden konnte, wurden der $2 \times$ Tautomerase-*assay*-Puffer nach Anleitung bei Raumtemperatur und in einem weiteren Reagenzglas eine 4 mM Lö-

3 Material und Methoden

sung aus L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-methylester und dd H₂O hergestellt. Für die Substratlösung wurde als eine Komponente 171,2 µg einer 3 mM Natriumperjodatlösung in 100 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurden die MIF Präparate in erwünschter Verdünnung, z. B. 500 ng wt MIF, in 2 × Assay Puffer gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Das Substrat wurde durch Mischen von 6 ml des 4 mM Dopamethylester mit 4 ml der 8 mM Natriumperjodatlösung zubereitet. In eine flache 96-Wellplatte wurden 70 µl der Enzymlösung pipettiert, dann 30 µl des Substratansatzes mittels Multipipette zugegeben und die optische Dichte bei 475 nm in einem *Elisa* Lesegerät unmittelbar danach gemessen und ausgewertet.

Focus Formation Assay

Für den *Focus formation assay* wurden $1 \cdot 10^3$ mit H-ras- und E1A-Retrovirus infizierte Zellen (transformierte Zellen) mit $3 \cdot 10^5$ nicht infizierten primären MEF (*feeder* Zellen) vermischt. Je nach Protokoll wurden bestimmte Genotypen kombiniert.

Folgende Kombinationen waren von Interesse:

- wt transformiert auf wt *feeder*
- wt transformiert auf *knockout feeder*
- ko transformiert auf *knockout feeder*
- ko transformiert auf wt *feeder*
- pg transformiert auf pg *feeder*
- pg transformiert auf wt *feeder*
- pg transformiert auf *knockout feeder*

Um eine möglichst genaue Anzahl an Zellen zu erhalten, wurden die Zellen dreimal unabhängig voneinander gezählt und der Mittelwert davon gebildet. Im Anschluß wurden die Fibroblasten in 3 ml 5 % FCS haltigem DMEM aufgenommen und auf eine 6 cm Platte gegeben. Nachdem die ersten Kolonien gebildet worden waren (etwa nach 5 Tagen), wurden sie weitere 5 Tage bei 37 °C inkubiert, wobei das Medium alle 3–4 Tage gewechselt wurde. Am Tag 12 wurde die Koloniebildung beurteilt, indem die Platte in vier Quadranten mittels Beschriftung dieser unterteilt wurde. Die Anzahl der Kolonien in jedem dieser Quadranten wurde systematisch ausgezählt und die Summe daraus gebildet. Nach vorheriger Aspiration des Mediums wurden die Zellkulturschalen anschließend mit 4 %igem Parafix 2–3 min inkubiert und anschließend mit Giemsa gefärbt. Zuletzt wurden die Kulturschalen zweimal mit H₂O und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Die Platten wurden mit offenem Deckel luftgetrocknet.

3 Material und Methoden

Zytotoxizitäts-Assay

Um die mögliche Zytotoxizität des MIF-Inhibitors ISO-1 zu erfassen, wurden primäre MIF^{wt} MEFs mit aufsteigenden Konzentrationen von ISO-1 über 7 Tage inkubiert und die Zellviabilität ermittelt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO		ISO-1			DMSO					
B	WT	0	10	50	100	200	D 0,01%					
C	WT	0	10	50	100	200	D 0,01%					
D	WT	0	10	50	100	200						
E	KO	0	10		100	200	D 0,01%					
F	KO	0	10	50	100	200	D 0,01%					
G	KO	0	10	50	100	200	50					
H												

Pro well wurden 10 000 Zellen in 200 µl, d. h. 50 000 Zellen/ml pipettiert
pro Genotyp 200 000/4 ml

Die grauen Wells wurden mit PBS oder Medium aufgefüllt.

Die schwarzen Wells wurden als Kontrollen für MTT leer gelassen werden.

0 bedeutet in diesem Fall 0,1 % DMSO .

MTT Assay

Für den MTT Assay wurde das MTT Reagenz zunächst immer frisch in einer Konzentration von 7 mg/ml in dd H₂O vorbereitet und daraufhin steril filtriert.

1 · 10⁴ Fibroblasten pro Well wurden in flachen 96-Well Platten kultiviert. Die Anordnung der Genotypen und die jeweiligen Konzentrationen des auf Zytotoxizität zu testenden Reagenz ISO-1 wurden laut dem Schema für den Zytotoxizität *assay* pipettiert. Nach zwei Tagen wurde ISO-1 erneut in gleicher Konzentration wie zuvor zugegeben. Nach weiteren zwei Tagen wurde 10 µl steriles MTT Reagenz pro Well hinzugefügt und die Ansätze schließlich für zwei bis vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. MTT wird durch mitochondriale Enzyme zu einem bräunlichen Stoffwechselprodukt metabolisiert. Die Colorierung sollte nach einer Stunde überprüft werden, da der Test dazu dient Zellen in ihrem Stoffwechselverhalten zu bewerten. Zellen, welche eine hohe Stoffwechselrate besitzen, bewirken eine stärkere Metabolisierung von MTT.

Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde der Überstand abgenommen und pro Well 100 µl saures Isopropanol zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Nach weiterer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur gab man 100 µl dd H₂O hinzu und löste die Präzipitate durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren vom Boden solange, bis alle

3 Material und Methoden

Präzipitate sich aufgelöst haben. Eventuell dabei entstandene Blasen wurden vorsichtig aufgestochen.

Zuletzt wurde die Absorption in der 96-Well Platte mittels *Elisa Reader* bei 570 nm mit einem Referenzwert von 690 nm gemessen. Die Abweichung der Absorption von den Kontrollwerten wurde ausgewertet.

Iso 1 Assay

Nachdem gezeigt wurde, dass Iso 1 in keiner von uns getesteten Konzentration zytotoxisch wirkte, wurden für den Iso 1 *assay* Konzentrationen von 20 und 100 μM verwendet. Als Kontrolle wählten wir DMSO, welches als Lösungsmittel für das hydrophobe ISO-1 diene. Zunächst wurden erneut 1 000 der transformierten MIF^{wt} und MIF^{ko} Fibroblasten mit 300 000 Fibroblasten jeweils des Wildtyps und des *knockout* Genotyps vermischt und anschließend im Brutschrank kultiviert. Nach bereits einem Tag erfolgte die erste Zugabe von Iso 1 in den soeben erwähnten Konzentrationen. Der Kontrolle wurde stattdessen DMSO beigefügt. Alle zwei Tage wurde dieser Vorgang wiederholt, gegebenenfalls wurden die Zellen gesplittet. Wieder wurden die Kolonien etwa am Tag 14 ausgezählt und mit Giemsa angefärbt.

3.2.9 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Student's t-Test vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Die mechanistische Grundlage der biologischen Aktivität von MIF

Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt, besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen MIF, Zellwachstumskontrolle und Tumorentstehung. MIF agiert dabei als Tumorpromoter und erhöht die Malignität von Tumoren [47, 130]. Mechanistisch scheint MIF den MAPK-Signaltransduktionsweg [131], p53 [80] und den proteosomalen Degradationsweg über Jab-1 [89] zu regulieren.

Die Deletion von MIF verursacht einen Defekt in der malignen Transformation von Fibroblasten, welcher funktionell durch verstärkte Aktivität von p53 oder RB/E2F erklärt werden kann. Da es jedoch keinen klaren Mechanismus hierfür gibt, weil ausser Jab-1, PAG und CD74 kein Bindungspartner für MIF existiert, der diese Wirkung erklären könnte, ist es wichtig zu wissen, ob die enzymatische Aktivität von MIF als Tautomerase die mechanistische Grundlage der biologischen Aktivität von MIF darstellt.

Viele Forschungsgruppen fokussieren ihre Arbeit auf die Entwicklung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von MIF, welche eine Vielzahl der MIF Effekte zu vermitteln scheint. In der Natur existieren bereits drei bakterielle Enzyme, welche MIF strukturell extrem ähnlich sind [175], wobei zwei dieser Enzyme sogar ein N-terminales Prolin als katalytische Base, entsprechend wie bei MIF, aufwiesen [75, 175]. *Swope et al.* konnte zunächst zeigen, dass ein katalytisches Substrat von MIF, p-Hydroxyphenylpyruvat, an die N-terminale Region bindet und mit Prolin1 interagiert.

Um die Rolle der enzymatischen Aktivität von MIF in der malignen Transformation zu klären, benutzten wir embryonale Mausfibroblasten von MIF^{ko}, MIF^{wt} und MIF^{pg} Mäusen (MEFs), da sich dieser Zelltyp für die maligne Transformation besonders gut eignet. Die enzymatische Aktivität von MIF befindet sich in einer hoch konservierten Tasche, welche als wichtige funktionelle Komponente Prolin1 besitzt. Durch gezielte Mutation des Prolin1 zu Glycin ist es möglich, zwar die Isomerase Aktivität von MIF auszuschalten, die hoch konservierte Tasche jedoch in ihrer dreidimensionalen Struktur nicht zu beeinflussen. Um herauszufinden, ob diese enzymatische Aktivität die mechanistische Grundlage darstellt, wurde eine Maus mit einer Punktmutation von Prolin1 zu Glycin generiert [59], welcher man den Namen MIF^{pg}-Maus oder MIF^{P1g}-Maus gab.

4 Ergebnisse

Mit Hilfe dieser wichtigen Mutation ist es Bezug nehmend zu der Fragestellung möglich MIF^{wt} , MIF^{ko} und MIF^{P8} Fibroblasten zu vergleichen und die biologische Aktivität der MIF^{P8} Fibroblasten zu ermitteln.

Um die biologische Wirkung dieser Mutationen zu ergründen, wurden MEFs von homozygoten (MIF^{P8}) Mäusen am Tag 14,5 präpariert und ihr Verhalten in der E1A/H-ras vermittelten Transformation untersucht. Als Vergleichsobjekt wurden Fibroblasten des Genotyps $MIF^{-/-}$ und $MIF^{+/+}$ herangezogen.

4.1.1 MIF^{P8} -Mausfibroblasten haben keine enzymatische Aktivität

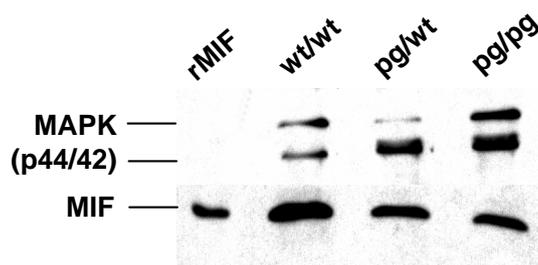


Abbildung 4.1: Expression des mutierten MIF-Protein.

Die *Western Blot* Analyse von Fibroblasten-Extrakten mit polyklonalem anti-MIF (R102) zeigte eine vergleichbare Expression von $MIF^{P8/P8}$ und $MIF^{+/+}$.

Weil wir zunächst sicherstellen wollten, dass MIF in Fibroblasten exprimiert wird, führten wir zunächst eine *Western Blot* Analyse durch, welche das Vorhandensein von MIF in Fibroblasten bestätigte und zeigte, dass die Expression von MIF^{P8} vergleichbar mit Wildtyp-MIF war (siehe Abbildung 4.1). Auch war es von besonderer Bedeutung zu zeigen, dass mutiertes MIF-Protein nach Austausch der Aminosäure Prolin1 zu Glycin keine enzymatische Aktivität mehr besitzt, da nur so die biologische Funktion überprüft werden kann.

Die Testung von rekombinantem MIF^{P8} -Protein zeigte im Gegensatz zum rekombinanten MIF^{wt} -Protein im Tautomerase-*assay* keine Enzymaktivität (siehe Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite, oberes Bild). Da unser experimentelles Vorgehen auf Fibroblasten beruhte, untersuchten wir im nächsten Schritt *in vivo* murine Fibroblasten von 8–12 Wochen alten männlichen Mäusen und deren enzymatische Aktivität. Hierbei verglichen wir $MIF^{+/+}$, $MIF^{-/-}$ und MIF^{P8} -Fibroblasten, indem wir Lysate der eben genannten Genotypen verwendeten. Die von uns beobachteten MIF^{P8} und $^{-/-}$ Zellen zeigten bei Verwendung von L-Dopachrom als Substrat keine enzymatische Aktivität mehr, wohingegen man eine Aktivität bei den Kontrollfibroblasten des Genotyps $MIF^{+/+}$ messen konnte (siehe Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite, unteres Bild).

4 Ergebnisse

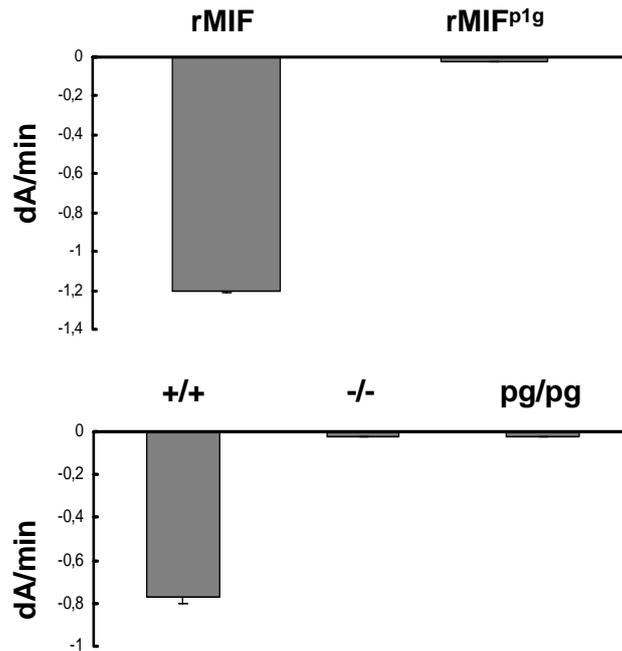


Abbildung 4.2: Die Aktivität der Tautomerase von rekombinantem murinen MIF.

Oberes Bild: Die Tautomerase Aktivität des rekombinanten murinen MIF und des menschlichen mutierten P1G (140 µg/ml)

Unteres Bild: Die Aktivität der Tautomerase in Fibroblastenlysaten von männlichen, 8–12 Wochen alten MIF^{+/+}, MIF^{-/-} und MIF^{pg/pg}-Mäusen (9 000 µg/ml in RIPA-Puffer). L-Dopachrommethylester wurde als Substrat verwendet. Die geringe Restaktivität in MIF^{-/-}- und MIF^{pg/pg}-MEFs erklärt sich durch die bekannte nicht-enzymatische Spontanaktivität der D-Dopachrom-Reaktion.

4.1.2 Analyse der malignen Transformation von MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg}-Mausfibroblasten

Es ist bekannt, dass Ras ein bedeutendes Proto-Onkogen darstellt, welches in menschlichen Tumoren häufig mutiert ist. Da MIF die Transformation durch H-ras beeinflusst, ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass MIF bei der malignen Transformation von Zellen beteiligt ist. Daher wurde von uns ein Transformationsmodell für murine Fibroblasten ausgewählt.

Bestätigung der Effektivität der malignen Transformation

Um die biologische Wirkung der MIF^{pg}-Mutation und des Verlustes der enzymatischen Aktivität auf die maligne Transformation zu ergründen, präparierten wir embryonischen Fibroblasten von homozygoten (MIF^{pg/pg}) Mäusen am Tag E14,5 und untersuchten ihr Verhalten in der E1A/H-ras vermittelten Transformation im Vergleich mit Fi-

4 Ergebnisse

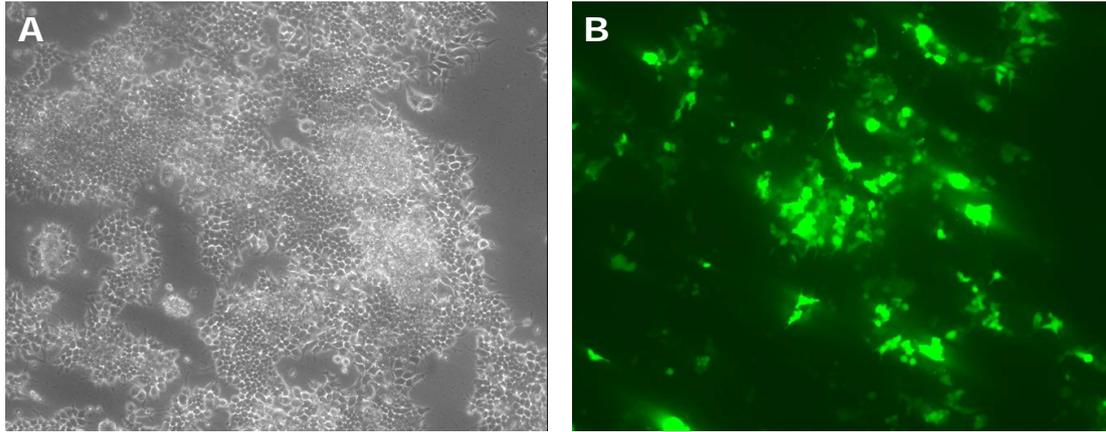


Abbildung 4.3: Beurteilung der Effizienz der Transfektion von Phoenixzellen mit Hilfe des Rebn-GFP-Vektors im Fluoreszenzmikroskop. Der Mittelwert der GFP positiven Zellen aller Experimente befand sich bei 56/100 Zellen \pm 9 Zellen. A: Nativaufnahme der Phönixzellen in lichtmikroskopischer Aufnahme. B: Fluoreszenzsignal der GFP-positiven Phönixzellen in vergrößerter Aufnahme. (Vergrößerung 1:40).

broblasten des Genotyps $MIF^{-/-}$ und $MIF^{+/+}$. Mit Hilfe replikationsdefizienter Retroviren wurden primäre embryonische MIF^{wt} , MIF^{ko} oder MIF^{FP8} Mausfibroblasten sowohl mit dem viralen Onkogen E1A zunächst immortalisiert, als auch darauffolgend mit dem onkogenen H-ras transformiert. Die Effizienz der Virusherstellung in Phoenixzellen wurde mittels einer GFP Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop sowie durch Messung im FACS ermittelt. In der Fluoreszenzmikroskopie war ersichtlich, dass

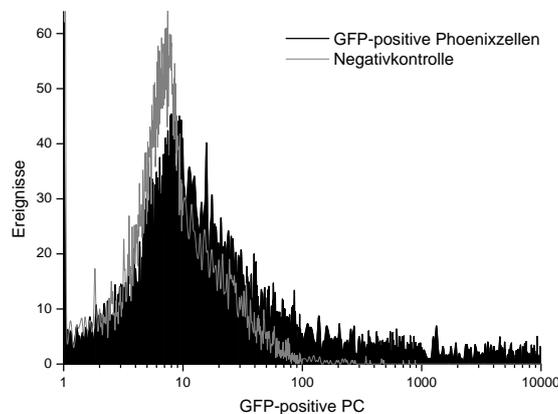


Abbildung 4.4: Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Durchflußzytometrie (FACS) Für unsere Experimente wurden die mit E1A und H-ras transfizierten Phönix Zellen (PC) auf ihren Anteil an GFP-positiven Zellen hin untersucht. Der durchschnittliche Wert lag hierbei bei 38 % \pm 16%.

die durchschnittliche Transfektion bei Zählung von 100 Phoenixzellen, eine Zahl von

4 Ergebnisse

56 ± 9 transfizierten Zellen ergab (siehe Abbildung 4.3 auf der vorherigen Seite). Im FACS lag der Mittelwert des durchschnittlichen Anteils der GFP positiven Zellen von allen Zellen bei 38 % ± 16 % (siehe Abbildung 4.4 auf der vorherigen Seite).

Die Infektion der Fibroblasten mit den Onkogenen E1A und H-ras wurde anschließend durch Nachweis der Expression und des Vorhandenseins des jeweiligen Onkoproteins in den Zelllysaten im Western Blot bestätigt (siehe Abbildung 4.5). Es wurden jeweils äquivalente Levels an Proteinexpression in allen drei Genotypen erreicht.

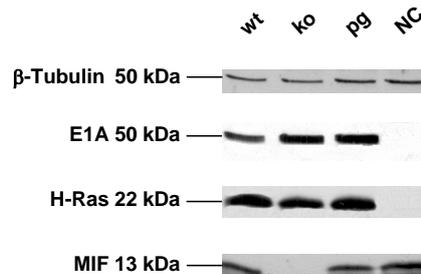


Abbildung 4.5: Kontrolle der Expression der onkogenen Proteine E1A und H-ras in MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg} Fibroblasten. Western Blots für E1A, H-ras und MIF. β -Tubulin wurde als Kontrolle für die Menge an geladenem Protein verwendet. Es wurden jeweils gleiche Mengen (20 μ g) an Protein geladen und mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert.

MIF^{ko}-MEFs zeigen eine reduzierte Effizienz in der Ras-vermittelten Transformation.

Diese nun erfolgreich transformierten Zellen (1 000 Zellen wurden verwendet) wurden mit nicht transformierten *feeder*-Zellen (300 000 Zellen) in derselben Kulturschale kultiviert. Nach etwa 10–14 Tagen konnte ein Koloniewachstum verzeichnet werden. Hier war zu beobachten, dass durch H-ras und E1A transformierte MIF^{+/+} auf MIF^{+/+}-*feeder* sehr schnell wachsende und expandierende Kolonien bildeten, welche sowohl in Größe als auch in der Anzahl deutlich größer und mehr waren als die entsprechenden Kolonien der MIF^{-/-} Fibroblasten auf einem MIF^{-/-}-*feeder*-Hintergrund (siehe Abbildung 4.6 auf der nächsten Seite). Die Zahl der Kolonien betrug somit bei MIF^{wt} 280 ± 43, bei MIF^{ko} 111 ± 57 und bei MIF^{pg} 289 ± 87 (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 72). Wir bestätigten also die bereits vorherbeschriebene reduzierte Effizienz der Ras-vermittelten Transformation in MIF^{-/-}-MEFs [70] (siehe Abbildung 4.7 auf Seite 72 und Tabelle 4.1 auf Seite 72).

4 Ergebnisse

Die P1G-Mutation bewirkt keinen Verlust der Transformationskapazität in MEFs.

Als nächstes testeten wir, wie sich die P1G-Mutation funktionell auf die Fähigkeit der MEFs zur malignen Transformation durch E1A + H-ras auswirkt. Denn besonders das Fehlen des Prolin1 der katalytischen Tasche von MIF führt zur fehlenden Enzymaktivität und damit möglicherweise zur reduzierten biologischen Funktion von MIF in der Transformation, falls jene Enzymaktivität in diesem malignen Geschehen eine Rolle spielt.

Bei der Auswertung der Koloniezahl der MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg} Platten zeigte sich schließlich beim zusätzlichen Betrachten der transformierten MIF^{pg} Kolonien, dass die MIF^{pg}-Kolonien in Zahl und Größe denen der MIF^{wt}-entsprechen (siehe Abbildung 4.6 und Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite). Dies bedeutet, dass die Mutation von Prolin-1 zu Glycin und der damit einhergehende Verlust der enzymatischen Funktion von MIF keine biologische Bedeutung für die maligne Transformation hat.

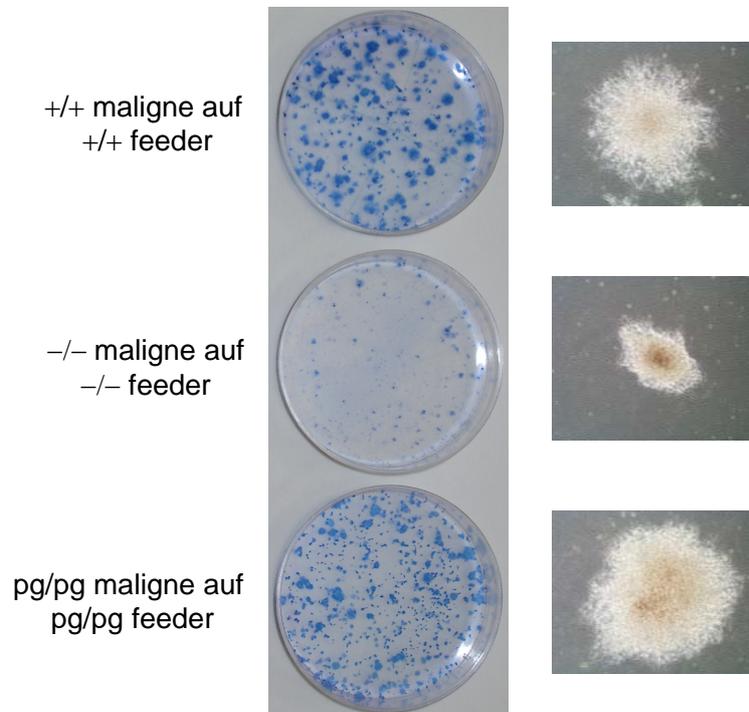


Abbildung 4.6: Die Morphologie der Kolonien der ko-Mutanten im Rahmen der malignen Transformation unterscheidet sich deutlich von der der wt- und pg-Mutanten. Die Morphologie der Kolonien der drei getesteten malignen Genotypen hängt vom jeweiligen Genotyp ab. Hierbei präsentierten sich Kolonien von malignen MIF^{-/-}-Zellen in ihrer Größe kleiner als entsprechende transformierte MIF^{pg/pg}-Fibroblasten und transformierte MIF^{+/+}-Fibroblasten. Somit entsprechen maligne MIF^{pg/pg}-Fibroblasten sowohl in Zahl als auch in Größe in ihrer Transformationskapazität den malignen MIF^{+/+}-Fibroblasten.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1: Kolonieanzahl auf gleichem genetischen Hintergrund

	wt(T) auf wt feeder	ko(T) auf ko feeder	pg(T) auf pg feeder
1	282	42	360
2	286	85	384
3	257	107	408
4	346	64	224
5	304	85	260
6	322	76	221
7	215	112	209
8	213	122	180
9	276	220	356
10	300	196	
\bar{X}	280	111	289
σ	43	57	87

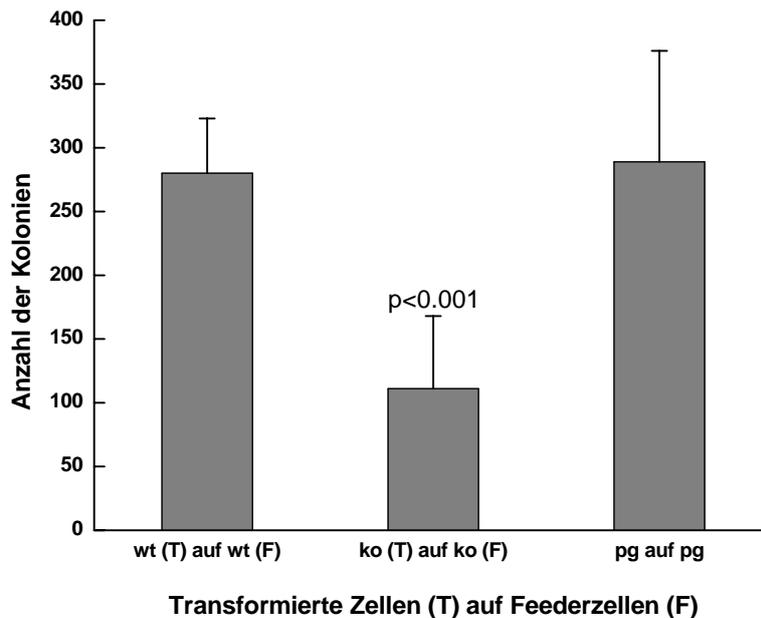


Abbildung 4.7: MIF^{pg}-MEFs sind in ihrer Transformationsfähigkeit vergleichbar mit MIF^{wt}-MEFs. Zahl der Kolonien im *focus formation assay* mit E1A und H-ras transformierten Mausfibroblasten ko(T), wt(T), pg(T), angezüchtet auf *feeder*-Zellen des jeweils gleichen Genotyps. MIF^{ko}-Fibroblasten zeigen hier eine signifikant niedrige Anzahl an Kolonien, wohingegen die Zahl der Kolonien der P1G-Mutante mit der der MIF^{wt}-Fibroblasten vergleichbar ist ($p < 0,001$ im Student's t-Test).

4 Ergebnisse

Unsere Ergebnisse bezüglich der Transformationskapazität verschiedener Genotypen korrelierten annähernd mit der Proliferationskapazität. So zeigten MIF^{ko}-Fibroblasten nach Zählung der Zellen am Tag 11 *post infectionem*, unmittelbar vor Ansetzen des FFA, eine niedrigere Zellzahl als transformierte MIF^{wt}- oder MIF^{pg}-MEFs. Die genaue Zellzahl der MIF^{ko}-Fibroblasten belief sich dabei auf durchschnittlich $1,08 \cdot 10^6$, die der MIF^{wt}-Fibroblasten auf $1,31 \cdot 10^6$ und die der MIF^{pg}-Fibroblasten auf $1,22 \cdot 10^6$ (siehe Abbildung 4.8).

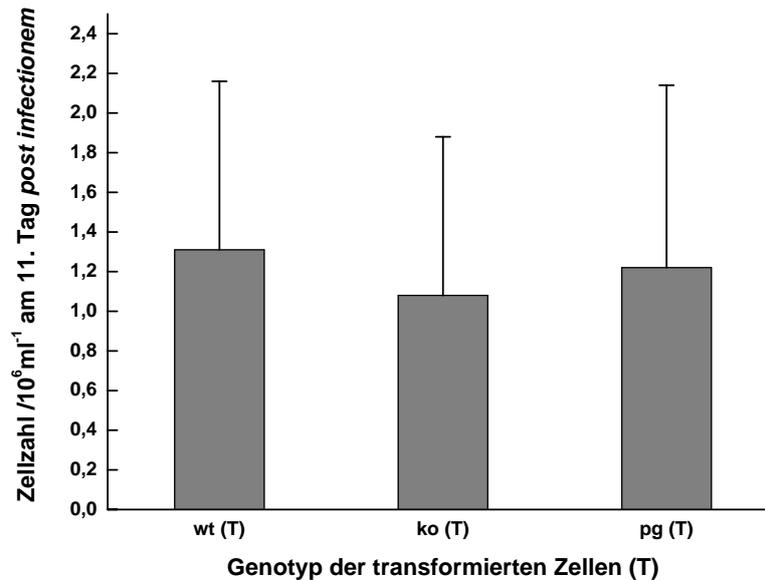


Abbildung 4.8: Die Zellzahl der transformierten MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg}-MEFs am Tag 11 nach retroviraler Infektion. Die transformierten Zellen der jeweiligen Genotypen wurden am 11. Tag *post infectionem* gezählt. Hierbei zeigte sich eine geringere Anzahl bei den MIF^{ko}-MEFs mit $1,08 \cdot 10^6$, als bei den MIF^{wt}-Fibroblasten mit $1,31 \cdot 10^6$ und den MIF^{pg}-Fibroblasten mit $1,22 \cdot 10^6$, was mit der ebenso geringeren Fähigkeit zur Koloniebildung einhergeht.

4.1.3 Auswirkungen von extrazellulärem MIF auf die Koloniebildungsfähigkeit

Da ein Teil des zellulären MIF sezerniert wird, könnte es als ein autokriner/parakriner Wachstumsfaktor wirken. Um herauszufinden ob der Effekt von MIF im Bereich der malignen Transformation auch auf extrazellulärem MIF basiert, unternahmen wir Kulturen mit gekreuzten Genotypen. Zum Vergleich wurden verschiedene Genotypen auf verschiedenen *feeder*-Zellen kultiviert, um auch die Abhängigkeit dieser *feeder*-Zellen in Bezug auf die Transformationskapazität zu untersuchen.

Es musste also getestet werden, ob sich das Wachstumsverhalten der MIF^{wt}, MIF^{ko} und

4 Ergebnisse

MIF^{PG} transformierten Zellen änderte, je nachdem auf welchem *feeder*-Hintergrund die Zellen kultiviert wurden. Dies würde bedeuten, dass sich die transformierten und die *feeder*-Zellen gegenseitig beeinflussen.

Auswirkungen verschiedener *feeder*-Hintergründe auf transformierte MIF^{wt}-MEFs

Nachdem wir zunächst gezeigt hatten, dass die Kolonienzahl der transformierten MIF^{ko}-MEFs deutlich niedriger war als die der MIF^{wt}- und MIF^{PG}-Fibroblasten, war der nächste Schritt den Einfluß diverser *feeder*-Hintergründe auf die malignen MIF^{wt}-MEFs zu testen. Daher ko-kultivierten wir transformierte MIF^{wt} mit *feedern* der beiden anderen Genotypen MIF^{ko} und MIF^{PG}. Interessanterweise beobachteten wir auch hier eine veränderte Koloniezahl insofern, dass nun die Zahl der Kolonien bei Kultivierung dieser auf MIF-defizientem Hintergrund einen leichten Rückgang von 280 ± 43 auf 242 ± 34 erfuhr (siehe Tabelle 4.2, sowie Abbildung 4.9 auf der nächsten Seite). Somit deuten auch diese Ergebnisse daraufhin, dass ein Fehlen von extrazellulärem MIF, wie es auf einem MIF defizienten *feeder*-Hintergrund der Fall ist, die Transformationskapazität muriner Fibroblasten auffallend verändert. Die Fähigkeit zur mali-

Tabelle 4.2: Anzahl der Kolonien auf verschiedenen *feeder*-Hintergründen.

	wt(T) auf wt feeder	wt(T) auf ko feeder	wt(T) auf pg feeder
1	282	280	91
2	286	224	305
2	257	250	282
3	346	243	
4	304	229	
5	322	290	
6	215	195	
7	213	195	
8	276	268	
9	300		
\bar{X}	280	242	293
σ	43	34	12

gnen Transformation bei MIF^{ko}-Fibroblasten geht demnach deutlich zurück, wohingegen sich die P1G-Mutanten ähnlich wie der MIF^{wt} verhalten. Der Phänotyp der MIF^{ko} im FFA beruht auf einer kombinierten Defizienz sowohl in transformierten als auch in *feeder*-Zellen, denn er läßt sich durch MIF^{wt} und MIF^{PG} *feeder* verbessern (siehe Ab-

4 Ergebnisse

bildung 4.10 auf der nächsten Seite). Die Ähnlichkeit der transformierten MIF^{P8}-Zellen mit den transformierten MIF^{wt}-Zellen, läßt einen zu dem Schluß kommen, dass die Mutation von Prolin1 zu Glycin keinen entscheidenden Funktionsverlust von MIF in der malignen Transformation als Folge hat.

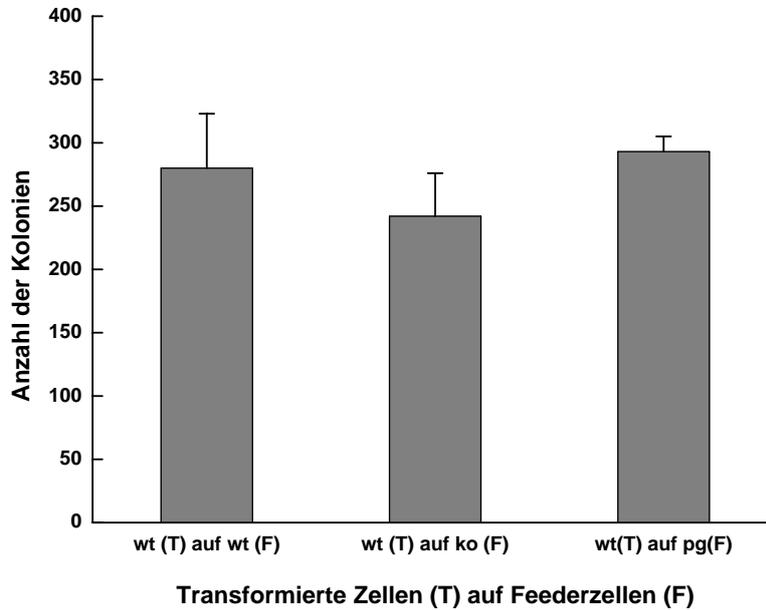


Abbildung 4.9: Der Phänotyp der MIF^{wt}-Mutanten im Rahmen der malignen Transformation. Koloniezahl im FFA der transformierten MIF^{wt}-MEFs(T) auf MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{P8} feeder-Zellen. MIF^{wt}-Fibroblasten zeigen hier eine signifikant niedrigere Anzahl an Kolonien auf einem MIF^{ko}-Hintergrund, wohingegen die Zahl der Kolonien auf MIF^{wt} und MIF^{P8}-feeder-Zellen zahlenmäßig relativ unverändert gleich bleibt ($p = 0,04$ im Student's t-Test).

Daher ist die Isomeraseaktivität wahrscheinlich auch nicht der entscheidende Mechanismus dieser Transformation. Dieses Ergebnis läßt weiter darauf schließen, dass Prolin1 zwar eine wichtige Funktion in der Kontaktinhibition zu haben scheint [65], aber nicht für die maligne Transformation. Das heisst für die zelluläre Transformation ist die enzymatische Aktivität nicht die mechanistische Grundlage.

Auswirkungen eines MIF defizienten Phänotyps und MIF^{ko} feeder-Hintergrundes

Die FFAs zeigten, dass MIF^{ko}-feeder-Zellen die Zahl der Kolonien aller transformierten Genotypen (MIF^{wt}, der MIF^{ko}, als auch der MIF^{P8}) deutlich herabsetzte. Diese Tatsache läßt darauf schließen, dass das Fehlen von MIF sowohl in den transformierten, als auch in den feeder-Zellen, die Zellinteraktion beeinflusst. Anders herum zeigte sich bei den transformierten, malignen MIF^{ko}-Zellen ebenfalls ein signifikanter Unterschied bei

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3: Koloniezahl der malignen MIF^{ko}-MEFs auf genetisch unterschiedlichen feeder-Hintergrund. Transformierte MIF^{ko}-MEFs bilden signifikant mehr Kolonien auf einem MIF^{wt}- oder MIF^{pg}-Hintergrund als auf einem MIF-defizienten Hintergrund.

	ko(T) auf ko	ko(T) auf wt	ko(T) auf pg
1	42	142	150
2	85	131	180
2	107	151	177
3	64	116	
4	85	149	
5	76	139	
6	112		
7	122		
\bar{X}	87	138	169
σ	27	13	17

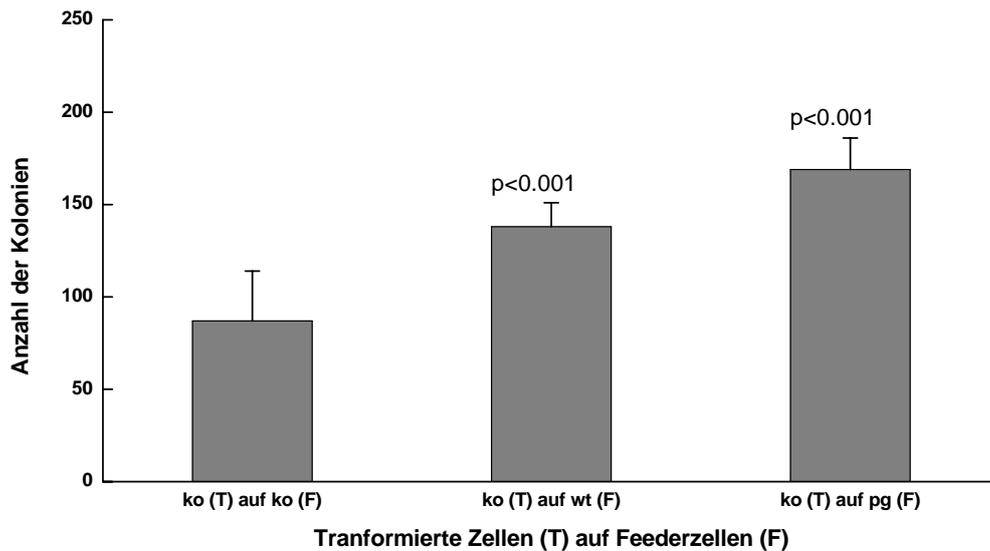


Abbildung 4.10: Der Phänotyp der transformierten MIF^{ko}-Mutanten im Rahmen der malignen Transformation. Zahl der Kolonien im FFA mit E1A und H-ras transformierten Mausefibroblasten ko(T) angezüchtet auf feeder-Zellen (F) der Genotypen MIF^{wt}, MIF^{ko} und MIF^{pg}. MIF^{ko}-Fibroblasten zeigen hier eine signifikant niedrigere Anzahl an Kolonien auf einem MIF^{ko}-Hintergrund, wohingegen die Zahl der Kolonien auf MIF^{wt} und MIF^{pg}-feeder-Zellen signifikant ansteigt.

der Kultivierung auf verschiedenen feeder-Genotypen insofern, dass sie im Vergleich

zur Kultivierung auf MIF-defizienten Hintergrund eine deutlich höhere Zahl an Kolonien aufwiesen, sobald sie auf einem MIF^{wt} oder MIF^{pg}-*feeder*-Hintergrund kultiviert wurden. Die Kolonienzahl der MIF^{ko}-MEFs erhöhte sich dabei von 87 ± 27 mit MIF^{ko}-*feeder*-Hintergrund auf 138 ± 13 mit MIF^{wt}-*feeder*-Hintergrund (siehe Tabelle 4.3 auf der vorherigen Seite und Abbildung 4.10 auf der vorherigen Seite). Allerdings bewirkte die Verwendung der MIF^{wt} MEFs als *feeder* nur eine partielle Rettung des Phänotyps der MIF-Defizienz, da die Kolonienbildung der transformierten MIF^{ko} Fibroblasten nicht das Niveau der MIF^{wt} Fibroblasten erreichte. Dies spricht dafür, dass ein Teil des Phänotyps entweder durch extrazelluläres MIF oder durch direkte Zellinteraktionen vermittelt wird.

4.1.4 Ist die maligne Transformation zwar nicht durch Prolin1 aber durch die gesamte katalytische Tasche vermittelt?

MIF ist in der Evolution von einzelligen Eukaryonten bis hin zum Menschen hoch konserviert. Die konservierten Aminosäuren (Prolin1, Lys32, Isoleucin64, Asparagin97 und Tyrosin95) bilden in der dreidimensionalen Struktur eine hoch konservierte Tasche, welche wahrscheinlich der Effektor der biologischen Aktivität von MIF ist. Nachdem der Verlust von Prolin1 nicht zum Funktionsverlust des Moleküls führte, wurde als nächstes versucht die Bedeutung der katalytischen Tasche bei der malignen Transformation näher zu charakterisieren. Um die Hypothese zu bestätigen, dass die maligne Transformation zwar nicht durch Prolin1, wohl aber durch die gesamte Tasche vermittelt wird, erwarteten wir, dass die Fähigkeit von MIF^{wt}-Fibroblasten zur malignen Transformation abnehmen sollte, wenn man die katalytische Aktivität der Tasche spezifisch inhibiert.

Hierzu wurde ein spezifischer Inhibitor der D-Dopachrome Tautomeraseaktivität, genannt ISO-1, welcher in anderen biologischen Tests in Konzentrationen von 20–50 μM die biologischen Funktionen von MIF inhibieren konnte [2], verwendet. Die Kristallstruktur von MIF bildet einen Komplex mit ISO-1 und ISO-1 bindet damit an dieselbe Stelle, wie p-Hydroxyphenylpyruvat, ein Substrat von MIF [111]. Daher gehen *Lubetsky et al.* davon aus, dass ISO-1 einige der biologischen Aktivitäten verhindern kann, und es somit möglich ist, die Rolle des katalytisch aktiven Zentrums von MIF näher zu ergründen [111]. Um auszuschließen, dass der Inhibitor unspezifisch toxisch wirkt, musste zunächst einmal die Toxizität von ISO-1 getestet werden. Hierfür verwendeten wir den MTT-*assay*, welcher die Zellviabilität bestimmt. Die getesteten Konzentrationen reichten von 0 μM bis 200 μM ISO-1. In unserem *assay* konnte gezeigt werden, dass ISO-1 in allen getesteten Konzentrationen nicht zytotoxisch wirkte (siehe Abbildung 4.11 auf der nächsten Seite). Anschließend wurde erneut ein *focus formation assay* angesetzt,

4 Ergebnisse

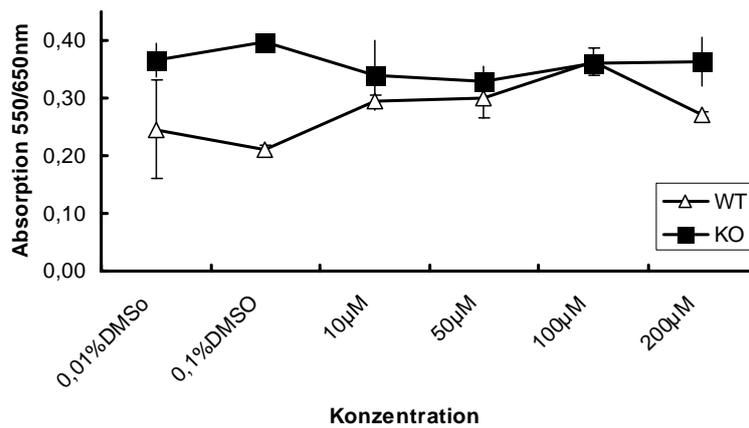


Abbildung 4.11: Die Bestimmung der Zytotoxizitätsgrenze von ISO-1 im MTT-assay. Um zu ermitteln ab welcher Konzentration ISO-1 auf Fibroblasten zelltoxisch wirkt, wurden im MTT-assay Konzentrationen zwischen 0 und 200 μM in MIF^{wt} und MIF^{ko} getestet. ISO-1 ist in keiner der getesteten Konzentrationen toxisch.

wobei dem Medium jetzt ISO-1 alle zwei Tage in Konzentrationen von 0, 20 und 100 μM zugesetzt wurde. Als Kontrollen wurde DMSO in der gleichen Konzentration wie im Iso1 100 μM -Ansatz verwendet.

Sollte ISO-1 ein effektiver Inhibitor von MIF und die katalytische Tasche tatsächlich im Rahmen der malignen Transformation muriner Fibroblasten beteiligt sein, so sollte man bei den MIF^{wt} Kulturschalen ein Koloniewachstum annähernd den MIF^{ko} -Fibroblasten des vorherigen Experiments erwarten, sobald ISO-1 zugegeben ist. Obwohl sich bei zunehmender ISO-1 Konzentration eine Tendenz dahingehend beobachten ließ, dass der Unterschied in der Koloniezahl zwischen transformierten MIF^{wt} und MIF^{ko} minimal geringer wurde, so war dennoch dieser Unterschied zwischen MIF^{wt} und MIF^{ko} erstaunlicherweise nicht signifikant. Die Kolonienzahl der MIF^{wt} reduzierte sich von 346 ± 24 Kolonien unter DMSO zu im Mittel 301 ± 12 Kolonien bei einer Konzentration von 20 μM . Bei Erhöhung der ISO-1 Konzentration auf 100 μM blieb diese Zahl mit etwa 311 ± 14 Kolonien weitestgehend konstant. Die Kolonienzahl der transformierten MIF^{ko} zeigte bei ansteigenden ISO-1 Konzentrationen keine auffallende zahlenmäßige Änderung. Sie belief sich auf durchschnittlich 188 ± 22 in der DMSO Kontrolle, 199 ± 18 bei einer ISO-1 Konzentration von 20 μM und schließlich 219 ± 17 bei einer ISO-1 Konzentration von 100 μM . Die Zugabe von ISO-1 in Konzentrationen von 20 μM –100 μM brachte somit keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($p = 0,13$) (siehe Tabelle 4.4 auf der nächsten Seite und Abbildung 4.12 auf der nächsten Seite). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die maligne Transformation nicht über die konservierte Tasche von MIF vermittelt wird.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.4: Kolonienzahl nach Zugabe von ISO-1. Die Zahl der MIF^{wt}-Kolonien nimmt in unseren Experimenten mit zunehmender ISO-1 Konzentration ab, wohingegen sich die Zahl der MIF^{ko}-Kolonien erhöht, so dass sich insgesamt der Unterschied in der Kolonienzahl zwischen MIF^{wt} und MIF^{ko} statistisch nicht signifikant verringert.

	DMSO	20 μ M	100 μ M
ko	168	200	232
	212	216	224
	184	180	200
	\bar{X} =188	\bar{X} =199	\bar{X} =219
wt	352	304	324
	320	312	296
	368	288	312
	\bar{X} =346	\bar{X} =301	\bar{X} =310

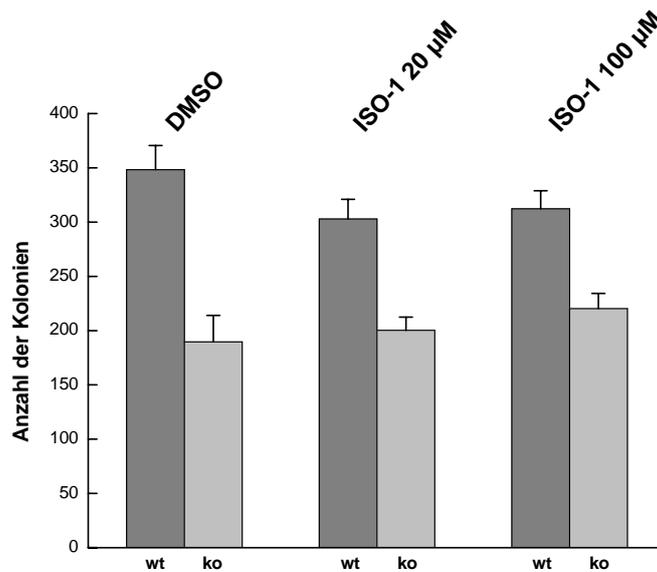


Abbildung 4.12: Bestimmung der Kolonienzahl bei MIF^{+/+} und MIF^{-/-}-Fibroblasten nach Zugabe von ISO-1. Im Rahmen eines *focus formation assays* wurde die maligne Transformationskapazität von MIF^{+/+} und MIF^{-/-}-Fibroblasten nach Zugabe von ISO-1 in verschiedenen Konzentrationen (0 μ M– 100 μ M ISO-1) mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Hierzu wurde ein FFA mit malignen MEFs in gleicher Art und Weise wie in den vorherigen Versuchsreihen angesetzt und anschließend im Abstand von zwei Tagen mit den angegebenen ISO-1 Konzentrationen bis zum Tag der Auswertung (etwa Tag 12 nach Beginn des Experiments) behandelt ($p = 0,13 =$ nicht signifikant).

Alternativ wäre es denkbar, dass das verwendete ISO-1 einen zu schwachen MIF-Inhibitor darstellt. Bessere Inhibitoren und MIF-Mutanten wären in diesem Zusammenhang nötig, um diese These zu testen.

4.2 Vergleich der Lebensspanne und Tumorinduktion von p53^{ko}-Mäusen mit p53- und MIF-DKO-Mäusen

Aktuelle Studien [70, 123, 182] zeigten, dass MIF über Hemmung der p53-vermittelten Genaktivierung das Zellwachstum und die Apoptose reguliert. Darüber hinaus beeinflusst MIF RB/E2F [145] und bindet an JAB-1 [89]. P53 fungiert in der Zelle als sehr wichtiger Tumorsuppressor. In 50 % der menschlichen Tumoren findet man eine Mutation oder Deletion im p53-Gen. Auch ist der Funktionsverlust von p53 typischerweise mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert [49]. Desweiteren reguliert p53 die Seneszenz, indem es weiteres Wachstum einer genetisch vorgegebenen Zahl der Zellteilungen durch Induktion eines Wachstumsstops verhindert.

Hudson *et al.* entdeckten im Zusammenhang mit ihrer Suche nach negativen Regulatoren von p53, dass MIF eine Funktion als Hemmer der transkriptionellen Aktivität von p53 besitzt.

Wie bereits in vielen Studien beobachtet wurde, leiden p53-*knockout*-Mäuse (sogenannte *Onkomäuse*) an vermehrtem Auftreten von Lymphomen, Fibrosarkomen und Osteosarkomen [180]. Diese Tumoren verkürzen die Lebensspannen der Mäuse auf 3–5 Monate damit erheblich. Wir wollten herausfinden, ob MIF auch auf einem p53-defizienten genetischen Hintergrund als Tumorpromoter agiert. Um diese Hypothese zu testen, verwendeten wir die p53^{-/-} Maus und verpaarten diese mit MIF^{-/-} und MIF^{flox/flox}-Mäusen, um p53^{-/-} MIF^{flox/flox} und p53^{-/-} MIF^{-/-}-Mäuse (*Doubleknockout*= DKO) zu generieren. Als Beobachtungsparameter wurden der Phänotyp, Lebensspanne, die Tumorzinzidenz und die Vererbung der Allele gewählt.

4.2.1 Zucht von p53^{-/-} und DKO-Mäusen

Mit der Methode der PCR wurde mit Hilfe von p53- und MIF-spezifischen Primern (p53intron5+6 und p53neo1 und neo2, MIF A1, A2, C1, C2) der Genotyp der zu verpaarenden Mäuse bestimmt.

Eine Maus wurde dann als p53^{-/-} klassifiziert, wenn die wt-Bande nicht darstellbar war, und zugleich bei derselben Maus die neo-Bande nachzuweisen war. Die Maus wurde als p53^{-/+} genotypisiert, wenn man sowohl die wt-Bande, als auch die neo-Bande nachweisen konnte (siehe Abbildung 4.13 auf der nächsten Seite). Hinsichtlich

4 Ergebnisse

der Lebensspanne der $p53^{-/-}$ - und der DKO-Mäuse wurde die Dauer in Tagen ermittelt, die von Geburt der Maus bis zum Tod jener verging. Diese Lebensspanne lag im Durchschnitt bei 159 ± 60 Tagen. Die Ergebnisse wurden auch getrennt für Männchen des Genotyps DKO und Weibchen desselben Genotyps aufgeschlüsselt, da eventuell der genetische Hintergrund in einem weiblichen Individuum differiert und somit auch der Einfluß von MIF ein anderer sein könnte (siehe Tabelle 4.5 auf Seite 83). Die durchschnittliche Lebensdauer einer DKO Maus wurde mit der einer $p53^{-/-}$ MIF^{flx/flx}-Maus anschließend verglichen, um einen eventuellen Unterschied zu erhalten.

Bei der Beobachtung der spontanen Tumorzinzidenz konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines Allels oder beider Allele keine statistische Signifikanz zeigen konnte.

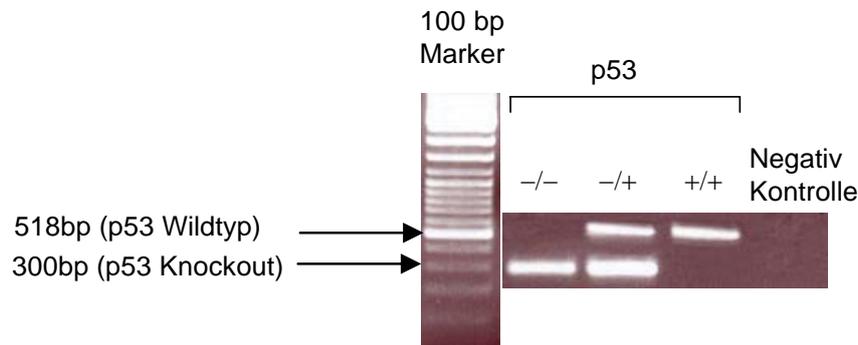


Abbildung 4.13: Bestimmung der $p53^{wt}$ und $p53^{ko}$ -Allele mittels PCR. Um das $p53^{wt}$ und $p53^{ko}$ -Allel nachzuweisen, wurden die Primer p53intron5+6 und die Primer p53neo1+2 verwendet.

4.2.2 Verpaarung und Genotypisierung von MIF^{flx/flx} $p53^{-/-}$ -Mäusen

Als Kontrolltiere zu den DKO-Mäusen generierten wir $p53^{-/-}$ MIF^{flx/flx}-Mäuse durch Verpaarung von $p53^{-/-}$ -Mäusen mit MIF^{flx/flx}-Mäusen. Bei MIF^{flx/flx}-Mäusen ist das MIF-Gen lediglich von loxP-Sequenzen flankiert und es wird weiterhin normal exprimiert (*Fingerle-Rowson*, unveröffentlicht).

Als Primer verwendeten wir hier zum Nachweis des MIF^{ko}-Allels die Primer A1 und C1, welche nur ein Produkt ergeben, wenn das MIF-Gen deletiert ist (siehe Abbildung 4.14 auf der nächsten Seite). Eine 383 bp große Bande in der PCR bestätigte dabei das Vorhandensein des MIF^{ko}-Allels (siehe Abbildung 4.14 auf der nächsten Seite). Mittels der Primer A2 und S2 konnte sowohl das MIF^{flx}-Allel als auch das MIF^{wt}-Allel nachgewiesen werden. In der PCR wurden solche Mäuse als MIF^{flx/flx} markiert, welche weder ein Signal im Bereich des MIF^{wt}-Allels, sprich bei 504 bp, noch ein Signal im Bereich des MIF^{ko}-Allels bei 383 bp hatten, jedoch die wt-Bande nachweisbar war im

4 Ergebnisse

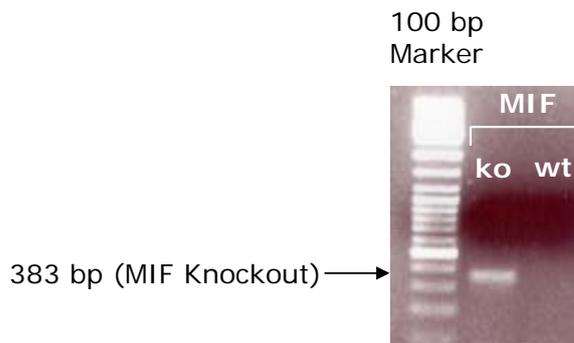
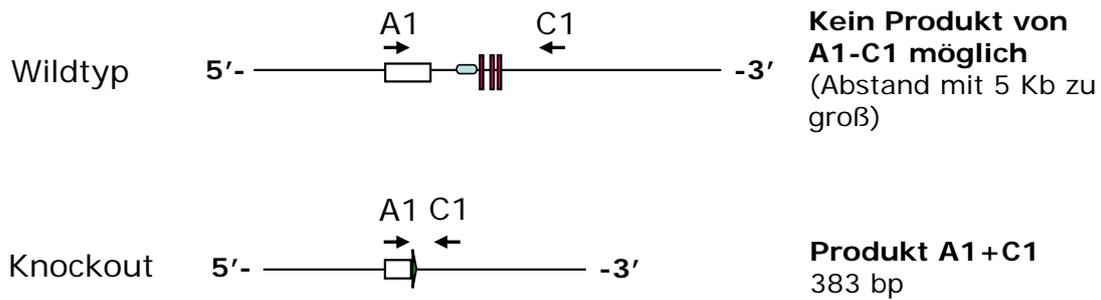


Abbildung 4.14: Genotypisierung der MIF^{ko}-Maus mittels PCR. Um das MIF^{ko}-Allel nachzuweisen, wurden die Primer A1 und C1 verwendet, welche die hier besonders gekennzeichneten Genlokalisationen amplifizieren [70]. Die DNA einer Maus wurde dann als MIF^{ko} deklariert, wenn sie das MIF^{ko}-Allel aufwies, jedoch kein MIF^{wt}-Allel bei der PCR nachzuweisen war.

Bereich von 645 bp (siehe Abbildung 4.15 auf der nächsten Seite).

Bei der Verpaarung der MIF^{-/-} bzw. der MIF^{flox/flox}-Mäuse mit der p53^{-/-}-Maus war auffallend, dass die Verteilung des zu erwartenden Genotyps nicht den Mendelschen Regeln folgte. Die Rate an p53^{-/-}- Mäusen aus heterozygoten Verpaarungen (p53^{+/-} x p53^{+/-}) war deutlich reduziert. Dieser Effekt war besonders stark bei den Weibchen ausgeprägt und ist vermutlich auf die bei p53-Verlust berichteten Defekte der Gehirnentwicklung (Exencephalie) zurückzuführen [155]. Diese Abweichung von den Mendelschen Vererbungsregeln war bei MIF^{flox/flox}p53^{-/-}-Mäusen und bei MIF^{-/-}p53^{-/-}-Mäusen gleichermaßen stark zu beobachten.

4 Ergebnisse

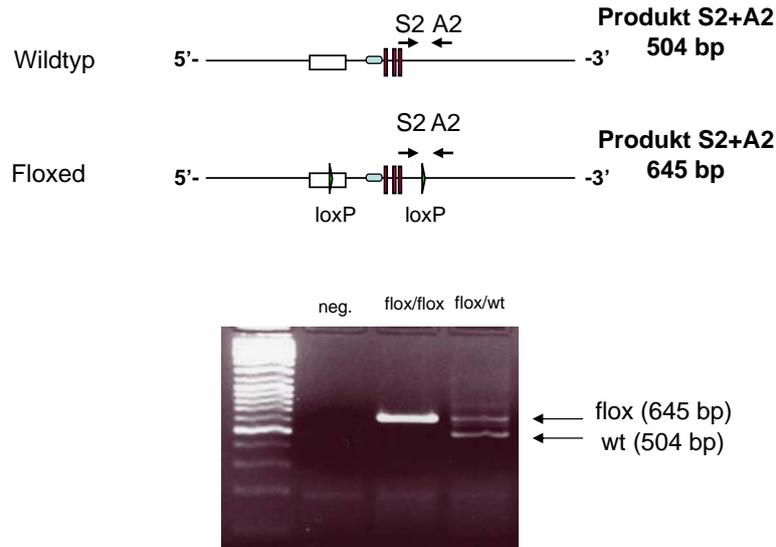


Abbildung 4.15: Genotypisierung der MIF^{flox}-Maus mittels PCR. Eine Maus wurde dann als MIF^{flox/flox}-Maus charakterisiert, wenn sie das hier dargestellte Bandenmuster aufwies. Als Primer wurden Primer A2 und S2 eingesetzt.

4.2.3 Lebensspanne

Die zusätzliche Deletion von MIF soll Aufschluß darüber bringen, ob MIF auch einen von p53 unabhängigen Phänotyp erzeugen kann. Diese Erkenntnis ist von besonderem Interesse um der Frage nachzugehen, wo genau die Wirkung von MIF anzusetzen ist. Hierbei könnte man sowohl an eine Funktion auf p53 direkt, als auch auf einen Einfluß auf Proteine, welche durch p53 reguliert werden, denken.

Tabelle 4.5: Vergleich der Lebensspannen

	Anzahl		\bar{X} [Tage]		σ [Tage]	
	ges.	sex	ges.	sex	ges.	sex
DKO (MIF^{-/-}p53^{-/-})	51	♀ = 16 ♂ = 35	159	♀ = 156 ♂ = 161	60	♀ = 87 ♂ = 45
Kontrolle (MIF^{flox/flox}p53^{-/-})	30	♀ = 6 ♂ = 24	158	♀ = 150 ♂ = 157	45	♀ = 48 ♂ = 46

\bar{X} = mittlere Lebensspanne in Tagen

σ = Standardabweichung der Lebensspanne in Tagen

4 Ergebnisse

Allerdings wäre ebenso eine p53-unabhängige Wirkung [22] denkbar. Die Bestim-

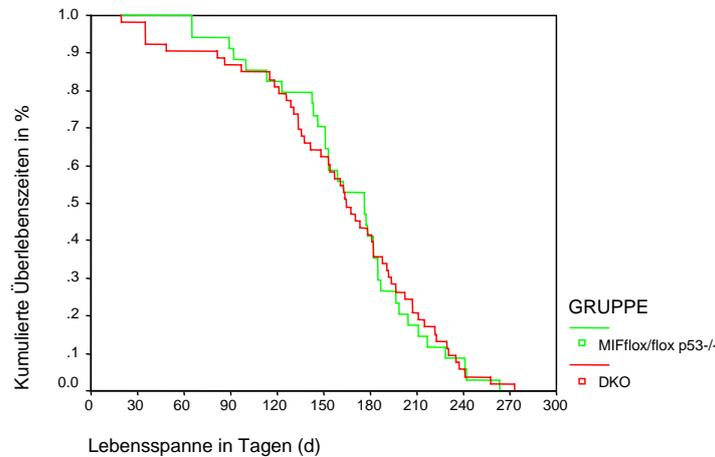


Abbildung 4.16: Lebensspanne der DKO und $p53^{-/-}$ -MIF^{flox/flox} Maus. In unserem Kollektiv beobachteten wir die Überlebenszeit von DKO (n=51) und MIF^{flox/flox} $p53^{-/-}$ -Mäusen (n=30). Hierbei wurden in den beiden Graphen die Überlebenszeiten der MIF^{flox/flox} $p53^{-/-}$ mit den DKO Mäusen verglichen, indem wir den prozentualen Anteil der Mäuse berechneten, die nach x Tagen noch gelebt haben. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigte keinen Unterschied.

Die Lebensspanne von $p53^{-/-}$ MIF^{flox/flox} und $p53^{-/-}$ MIF^{flox/flox} Mäusen (n = 51 für DKO, n = 30 für Kontrollen) ergab eine fast identisch liegende mittlere Lebenserwartung (159 Tage \pm 60 Tage für DKO, 158 Tage \pm 45 Tage bei den Kontrollen, p= nicht signifikant) (siehe Tabelle 4.5 auf der vorherigen Seite). Damit in Übereinstimmung ergaben die Überlebenszeiten der MIF^{flox/flox} $p53^{-/-}$ - und der DKO-Mäuse in der Kaplan-Meier-Kurve keinen Unterschied (siehe Abbildung 4.16). Beide Genotypen entwickelten vorrangig Lymphome und Osteosarkome. Interessanterweise zeigte sich auch in der Anzahl der Geburten ein Unterschied in der Geschlechterverteilung. Bei den DKO-Mäusen war das Verhältnis von Männchen zu Weibchen nahezu 2:1 mit 35 Männchen und nur 16 Weibchen, wohingegen bei den Kontrolltieren die Zahl der Männchen mit 24:6 sogar vierfach so hoch war (siehe Tabelle 4.5 auf der vorherigen Seite).

Da als Ursache des Verlusts an $p53^{-/-}$ -Weibchen eine Exencephalie beschrieben ist, könnten die vorläufigen Daten darauf hindeuten, dass der zeitgleiche Verlust von MIF diesen Defekt wieder kompensiert. Dieser fragliche Trend muss allerdings durch größere Zahlen untermauert werden, bevor man diese Schlussfolgerung ziehen kann. Auch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen Männchen und Weibchen des jeweiligen Genotyps, was den Einfluß des Geschlechts und der damit verbundenen unterschiedlichen Genetik eher in den Hintergrund rücken läßt. Die DKO- Männchen zeigten mit 161 Tagen im Vergleich zu den DKO- Weibchen mit 156 Tagen eine nur minimal längere Lebensspanne. Ebenso verhielten sich

4 Ergebnisse

die $p53^{-/-}$ $MIF^{flox/flox}$ Mäuse, bei denen die Männchen mit 157 Tagen knapp über den Weibchen mit 150 Tagen lagen (siehe Tabelle 4.5 auf Seite 83). Insgesamt läßt sich schlußfolgern, dass auf dem $p53$ -defizienten C57Bl/6 Hintergrund die zusätzliche Deletion von MIF keine signifikante Änderung der Lebensspanne ergibt. Dies bedeutet, dass der Tumorpromotor MIF seine tumorregulierende Wirkung im Wesentlichen über den $p53$ -Signaltransduktionsweg ausübt.

5 Diskussion

Als man in den sechziger Jahren ein Protein aus dem Überstand von aktivierten Lymphozyten isolierte, welchem man den Namen *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) gab, wusste man noch nicht, dass man ein in der Evolution hoch konserviertes Molekül mit fast ubiquitärer Expression sowie wachstumsregulatorischer Aktivität vor sich hatte. So schenkte man zunächst lediglich seiner Zytokin-ähnlichen Funktion Beachtung und assoziierte MIF mit der Aktivierung des Immunsystems [22, 44]. So fand man es im Rahmen des septischen Schocks als proinflammatorisches Zytokin und als gegenregulatorisches Protein von Glukokortikoiden [18, 30]. In zahlreichen Tiermodellen behinderten Antikörper gegen MIF die Progression von entzündlichen Krankheiten wie Glomerulonephritis [196], septischer Schock [18] oder Arthritis [102]. Erst mit der Entwicklung der Molekularbiologie rückten die wachstumsregulatorischen Eigenschaften von MIF in den Vordergrund. Die Beobachtung, dass MIF nahezu ubiquitär exprimiert wird und dass es einerseits bei der Differenzierung von Gewebe [92], andererseits bei der Regulation von Zellwachstum und Proliferation mitwirkt [130], führte zu erhöhten Anstrengungen die Wirkmechanismen von MIF aufzuklären und zu verstehen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konzentrierten wir uns auf zwei Fragestellungen mit hoher Relevanz:

1. Sind die tumorfördernden Effekte von MIF *in vivo* p53-vermittelt?
2. Ist die enzymatische Aktivität von MIF die Grundlage seiner biologischen Aktivität bei der malignen Transformation?

Von besonderem Interesse für uns war seine biologische Funktion im Rahmen der Zellproliferation, malignen Transformation und Tumorentstehung, da bereits eine vermehrte Expression von MIF beispielsweise in Magenkarzinomzellen beobachtet werden konnte [74].

Mehrere Arbeitsgruppen haben verschiedene Mechanismen beschrieben, die die Wirkung von MIF bei der Tumorgenese erklären könnten. Dies beinhaltet eine verstärkte Bildung von Metalloproteinasen, Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges, sowie eine funktionelle Inhibierung von p53 und Rb/E2F.

Der Tumorsuppressor p53 besitzt eine wichtige Rolle in der Proliferation und der Regulation des Zellzyklus. Über eine Aktivierung oder Inhibition bestimmter Proteine stromabwärts der Signalkaskade im p53-Pfad, werden Wachstumsstop und Apop-

tose vermittelt. Wir wollten in unseren Arbeiten herausfinden, inwieweit die *in vivo*-Wirkung von MIF von p53 abhängt und kreierten daher ein Experiment, in dem wir die Lebensspanne und die Tumorzinzidenz von DKO Mäusen mit der von p53^{ko}-Mäusen verglichen.

5.1 Sind die tumorfördernden Effekte von MIF durch p53 vermittelt?

Bisherige Studien [80] legten nahe, dass MIF die Funktion von p53 antagonisiert. P53 induziert seinerseits vielerlei Proteine, welche die Zelle in Apoptose schicken, falls die Zelle einen DNA Schaden aufweist. Dadurch wird der Zelle der natürliche Schutz vor unkontrollierter Proliferation genetisch beschädigter Zellen gewährt. Es wurde gezeigt, dass MIF Makrophagen vor der durch p53 vermittelten Apoptose schützen kann und dass es die Überlebenszeit von kultivierten MEFs verlängern kann. *Fingerle et al.* [70] bestärkten die These von der p53 antagonistischen Wirkung von MIF, indem sie zeigen konnten, dass ein Wachstumsstopp in MIF^{ko} embryonischen Mausfibroblasten (MEF) mit einer vermehrten Expression von p21 assoziiert war, einem wichtigen Zielprotein stromabwärts von p53. Ebenso wurde ein unterschiedliches Wachstumsverhalten, sowie eine vermehrte Kontaktinhibition und eine vermehrte Seneszenzrate verzeichnet. Der Defekt der MIF^{-/-} Fibroblasten bei der malignen Transformation schien p53-abhängig zu sein, da auf einem p53-defizienten Hintergrund der Unterschied zwischen MIF^{+/+} und MIF^{-/-} Zellen aufgehoben war [70]. In näheren Untersuchungen waren auch die Expressionslevels von p130, p107 und p16 in DKO und p53^{-/-}-Fibroblasten äquivalent, was darauf hinweist, dass diese Wachstumsveränderungen p53-abhängig sind [70].

In vivo Modelle zeigten, dass MIF^{-/-} Mäuse zwar eine normale Entwicklung aufwiesen, jedoch stellten sich entstandene Fibrosarkome kleiner und mit niedrigerem mitotischem Index dar [60]. Um den vermuteten Zusammenhang in der Tumorgenese und Lebensspanne zwischen MIF und p53 *in vivo* näher charakterisieren zu können, züchteten wir DKO Mäuse, welche sowohl kein p53- als auch kein MIF-Protein bilden können. Wir zeigten in unseren Experimenten, dass es keinen Unterschied in der Überlebenszeit von p53^{-/-}-MIF^{flox/flox} C57Bl/6- und DKO C57Bl/6-Mäusen gibt.

Somit scheinen die Effekte von MIF im Wachstum und der Tumorentwicklung bei der *Onkomaus* nach unseren Erkenntnissen nicht existent zu sein. Dies bedeutet, dass MIF in Abwesenheit von p53 keine signifikante tumorfördernde Wirkung zeigt. Interessanterweise scheint jedoch der genetische Hintergrund einer Maus eine wichtige Rolle zu spielen. So fanden *Petrenko et al.* heraus, dass es in einem identischen Experiment bei

5 Diskussion

Mäusen auf einem 129/Sv-genetischen Hintergrund einen Unterschied in der Überlebenszeit gab (Petrenko *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). So scheint die 129/Sv-Maus ein anderes Genom zu besitzen, bei welchem MIF auch p53-unabhängige Wirkungen zeigt. Daraus wurde geschlossen, dass MIF möglicherweise an der genetischen Modifizierung zwischen 129/Sv und C57Bl/6 murinen Stämmen beteiligt ist. [195]. Einen ähnlichen Fall diskutierten bereits Yamasaki *et al.* [195], die eine verlängerte Lebensspanne bei 129/Sv Mäusen, welchen E2f1 fehlte, im Vergleich zu korrespondierenden C57Bl/6 Mäusen auf dem Rb^{+/-}-Hintergrund fanden. Das Wächterprotein, besser der Tumorsuppressor p53 besitzt zwei bedeutende Funktionen in der Regulation der Proliferation zum Schutz der Zelle vor unkontrolliertem Wachstum. Indem es einerseits den programmierten Zelltod induziert und andererseits einen Stop im Zellzyklus bewirkt, werden Zellen, welche eine genetische Schädigung erfahren haben, eliminiert. Daher wird p53 als Tumorsuppressor-Gen *in vivo* bezeichnet. Die Wirkungen von p53 basieren auf einer Aktivierung oder Suppression verschiedener Gene [201], welche sowohl den Zellzyklus als auch die Apoptose beeinflussen. Obwohl p53 also die Expression vieler unterschiedlicher Gene induziert, bleibt der genaue molekulare Mechanismus, über den p53 diese Gene beeinflusst noch teils unaufgeklärt. Einige Studien postulierten, dass p53 die Histonacetylierung und die Chromatinkondensation an bestimmten chromosomalen Stellen verändern könnte. So erfordert zum Beispiel die durch p53 vermittelte Aktivierung von p21 die Bereitstellung von Histonacetyltransferase p300 [56].

MIF scheint die Interaktionen zwischen p53 und seinen Kofaktoren an einer bisher unbekanntem Stelle dieser komplexen Signalkaskade zu beeinflussen. Kleemann *et al.* [89] zeigten, dass MIF an intrazelluläres Jab-1 bindet und damit die durch Jab-1 vermittelten Wirkungen inhibiert [89]. Jab-1 stellt einen Koaktivator des Transkriptionsfaktors AP-1 dar, welcher seinerseits zusammengesetzt ist aus Mitgliedern der Familie der Fos und Jun Proteine und eine entscheidende Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung spielt. Ebenso weiß man, dass AP-1 ein wichtiger Effektor von Ras ist. So wurde in mehreren Versuchen bewiesen, dass die c-Jun Komponente von AP-1 für das Transformationsgeschehen essentiell ist. Dies verwundert nicht, da die c-Jun Aktivität bekanntermaßen durch die Aktivierung von Ras induziert wird und eine Überexpression von dominanten, negativen c-Jun Allelen die Transformation durch Ras-Proteine hemmen kann [109, 160, 161]. Desweiteren ist c-Jun unter bestimmten Bedingungen potentiell onkogen [24, 109]. Erst kürzlich wurde dies in c-Jun^{-/-}-MEFs bestätigt, welche sich auffallend anders in ihrer Transformationsfähigkeit durch aktivierte Ras-Proteine verhielten [83]. Da das *knockout* für Jab-1 embryonal lethal ist, konnte der Einfluss von Jab-1 auf die AP-1 Funktion im Rahmen der Transformation noch nicht getestet werden.

Man weiß jedoch, dass Jab-1 neben der Aktivierung von AP-1 noch einen weiteren

5 Diskussion

Einfluss auf das Zellzyklusgeschehen besitzt. So stimuliert Jab-1 hier die Degradation der $p27^{Kip1}$ Expression, was zu einer verminderten Inhibition Zyklin-abhängiger Kinasen führt. Das Protein $p27^{Kip1}$ aktiviert zwar laut mancher Meinung das CDK4/cyclinD [36], seine hauptsächliche Funktion beruht jedoch auf einer Inhibition des CDK2/CyclinE und entspricht damit einer Wirkung als Tumorsuppressor [133].

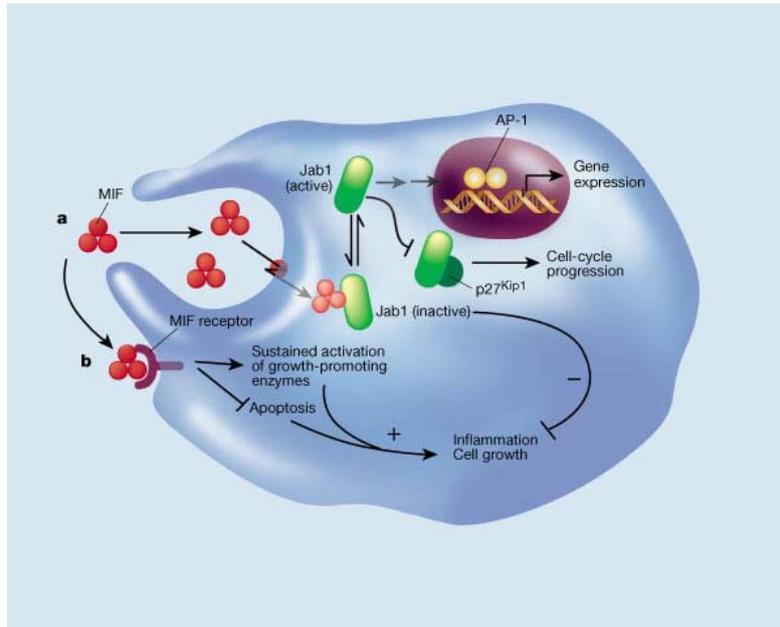


Abbildung 5.1: Die Interaktion zwischen MIF und Jab-1. Dieses Schema entstand in Anlehnung an *Kleemann et al.* [89].

MIF stabilisiert $p27^{Kip1}$ und erhöht dessen Expressionslevel durch Hemmung von Jab-1 [89]. In unseren Experimenten haben wir gezeigt, dass $MIF^{-/-}$ Fibroblasten weniger Kolonien bilden und somit in ihrer Transformationskapazität eingeschränkt sind. Da Transformation und Zellzyklusregulation in nahezu direktem Zusammenhang stehen, kann man daraus folgern, dass MIF als Tumorpromoter fungieren muß. Würde es seine Wirkung in der Transformation von Fibroblasten über Jab-1 ausüben, so würde es ebenfalls den Tumorsuppressor $p27^{Kip1}$ erhöhen, was zu einer erniedrigten Transformationsrate führen würde. Da dies in den von uns ausgeführten FFAs nicht der Fall war, gehen wir davon aus, dass die Effekte von MIF bei der malignen Transformation nicht über Jab-1 vermittelt werden.

5.2 Die Bedeutung von MIF in der malignen Transformation

Zellwachstum und maligne Transformation stellen verwandte Prozesse dar, weil sie über ähnliche Signalkaskaden und Moleküle wirken. Mit der Erkenntnis, dass Onkogene (z.B. adenovirales E1A oder H-ras) und Protoonkogene (z.B. c-Myc) eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums und Zellzyklus spielen und damit bei der Aufklärung der Biologie des Krebses mitwirken könnten, fokussierten viele Forscher ihre Experimente auf diese.

In unseren Studien verwendeten wir konstitutiv aktives Ras (H-ras^{V12}), um die Fibroblasten zu transformieren. Ras besitzt eine Schlüsselfunktion in der Regulierung von Zellwachstum in allen eukaryotischen Zellen. So wird Ras laut molekulargenetischer und biochemischer Studien in der Signalübertragung als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli wie Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren freigesetzt. Ras liegt in zwei Formen vor:

Einmal als inaktives an GDP gebundenes Ras und einmal als aktives an GTP gebundenes Ras. Das Verhältnis von GTP zu GDP, welches an zelluläres Ras gebunden ist, wird durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) und durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) geregelt [25]. Sobald Mutationen in den Aminosäuren 12, 13 und 61 des Proteins Ras vorliegen, reagiert es nicht mehr auf die GTPase-Aktivität und erhält damit in seiner aktiven Form die Fähigkeit Säugetierzellen zu transformieren [23]. Mutationen im Ras Gen, welche eine Aktivierung von Ras zur Folge haben, finden sich interessanterweise in etwa 30 % aller menschlichen Tumore, wobei die Häufigkeit vom Tumortyp abhängt. Die größte Häufigkeit besitzen hierbei Pankreas- (90 %), Kolon- (50 %), Schilddrüsen- (50 %) und Lungenkarzinome (30 %). Die Wirkungen von Ras werden über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt. Als eine der zentralen Signalkaskaden gilt die durch Bindung an Raf in Gang gesetzte Aktivierung verschiedener Kinasen. Nicht alle Effekte von Ras finden über die Bindung an Raf statt. So wird zum Beispiel die Transformation mancher epithelialer Zellen nicht über Raf vermittelt [141]. Somit sind für manche Effekte diverse andere Signalkaskaden verantwortlich, wie beispielweise jene via p120 Ras GAP [198], via GEFs für kleine GTPase Ral [58], via AF6/Canoe [58, 97], via RIN1 [72] und via PI3K (phosphatidylinositol-3 Kinase) [147]. Genetische Studien in normalem zellulärem Zusammenhang bestätigen jedoch lediglich für Raf eine fundamentale Rolle in der Ras Signalkaskade als Ras Zielprotein. Interessanterweise führte eine Ras Mutante mit einem Cystein statt Thyrosin an Position 40 zu keiner Bindung von Raf, trotzdem aber zu einer tumorösen Transformation, was wiederum dafür spricht, dass die durch Ras induzierte Transformation einen Raf-unabhängigen Mechanismus darstellt [187].

Da die alleinige Transfektion mit H-ras zur Seneszenz in Primärzellen führt [53], ist

5 Diskussion

eine zweite Transfektion mit einem immortalisierenden Onkogen wie E1A nötig. Jene Onkoproteine ermöglichen ein Umgehen der Seneszenzkrise und damit eine Immortalisierung von Primärzellen. Immortalisierung ist die notwendige Voraussetzung für eine vollständige Transformation durch Ras.

Das Adenovirus E1A Protein bewirkt einerseits durch Dissoziation des E2F von pRb [15, 34] eine erhöhte Expression S-Phase spezifischer Gene, andererseits behindert es die p53 Funktion und fördert so die Tumorgenese, indem es auf die Tumorsuppressorproteine CBP/p300 wirkt. CBP/p300, zwei homologe nukleäre Proteine, kontrollieren Transkriptionskaskaden durch Umbau des Chromatins und damit sowohl Zellzyklus, Zelldifferenzierung und die Entwicklung menschlichen Gewebes, als auch die durch p53 vermittelte Apoptose. [66] Über seine Wirkung auf CBP/p300 kann Ad E1A effizient die p53 Funktion ausschalten und so die Tumorentstehung fördern.

Sobald wir aktives Ras (H-ras^{V12}) in MIF^{-/-} Fibroblasten, welche zuvor mit E1A immortalisiert wurden, einbrachten, fanden wir eine klar erkennbare morphologische Transformation dieser Zellen im Sinne einer Veränderung der Zellkonfiguration und einen Verlust der Kontaktinhibition. Diese beiden Beobachtungen kennzeichnen typischerweise das Frühstadium der Tumorgenese. Demzufolge produzierten diese Zellen transformierte Kolonien auf dem Feederlayer im *focus formation assay*. Die entsprechend durch H-Ras und E1A transformierten MIF^{-/-} Fibroblasten zeigten jedoch im Vergleich zu den transformierten MIF^{+/+} Fibroblasten eine erhöhte Kontaktinhibition und eine signifikant geringere Anzahl an transformierten Kolonien. Desweiteren stellten sich die MIF^{-/-} Kolonien morphologisch kleiner dar, als die entsprechenden MIF^{+/+} Fibroblasten. *Petrenko et al.* [145] fanden heraus, dass bei Reintroduktion von MIF in MIF^{-/-} Fibroblasten die Folgen der Transformation aufgehoben werden konnten, und sich diese Zellen wieder wie Wildtypzellen verhielten. Dieser Effekt blieb jedoch bei der Verwendung von rekombinanten MIF oder von mit MIF-versetztem Medium aus [145]. Dies spräche dafür, dass diese Aktivität von MIF auf einer intrazellulären Wirkung basiert. Auch die Beobachtung von *Takahashi et al.* [178] bestätigte diese Annahme. In seinen Experimenten zeigte er, dass eine Inhibition von MIF in WEHI-Zellen durch die *antisense* Technik den durch anti-IgM vermittelten Wachstumsstopp und die Apoptose verhinderten [178]. Durch rekombinantes MIF konnte diese Wirkung nicht aufgehoben werden [178].

Daher scheint MIF eine intrazelluläre Wirkung in der malignen Transformation zu besitzen, was die Frage aufwirft, ob MIF ein Teil der durch Ras induzierten Signalkaskade der malignen Transformation ist. *Mitchell et al.* demonstrierten, dass die Stimulation von NIH 3T3 Fibroblasten mit MIF zu einer erhöhten Proliferation und zur anhaltenden Aktivierung der ERK1/2 führte [131] [113]. ERK1/2 sind wichtig im Rahmen des Entzündungsgeschehens, in der Regulation des Immunsystems, der Zellproliferation

und der Angiogenese [55, 143], sind aber auch bedeutende Mediatoren in der durch Ras vermittelten Transformation. Somit bleibt weiterhin unklar, welche genaue Rolle extrazelluläres und intrazelluläres MIF bei der malignen Transformation spielt.

5.3 Die Tautomeraseaktivität von MIF entspricht nicht der biologischen Aktivität von MIF

Viele derzeitige Studien, die im Rahmen der Inhibitorsuche stattfinden, zielen auf Inhibitoren, welche die katalytische Tasche blockieren und damit eine enzymatische Aktivität von MIF annehmen. Man erhofft sich damit, dass relevante biologische Aktivitäten von MIF so gezielt kontrolliert werden können. Eine eindeutige Korrelation zwischen diesen katalytischen Eigenschaften und den physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von MIF ist jedoch noch nicht ganz ergründet [16, 75, 90, 91, 175]. Bisher konnte lediglich durch *Jung et al.* [85] das Redox-PAG-Protein als mögliches Substrat der enzymatischen Tasche von MIF identifiziert werden.

In unseren Experimenten interessierten wir uns für den Mechanismus, über den MIF seine biologische Aktivität in Fibroblasten ausübt. Bekanntermaßen besitzt MIF Tautomeraseaktivität. So fand man in der Natur bereits drei bakterielle Enzyme, welche MIF strukturell aussergewöhnlich ähnlich sind [175]. Desweiteren weisen zwei dieser Enzyme ebenso wie MIF ein N-terminales Prolin als katalytische Base auf [75, 175]. *Swope et al.* postulierten als biologische Grundlage von MIF eine enzymatische Reaktion und konnten zunächst zeigen, dass ein katalytisches Substrat von MIF, p-Hydroxyphenylpyruvat, an die N-terminale Region bindet und mit Prolin1 interagiert. Eine Mutation des N-terminalen Prolin1 zu Glycin führte in einem auf Neutrophilen basierendem Bioassay zu einer Verminderung seiner enzymatischen und Zytokin-ähnlichen Aktivität [175]. Eben genanntes Substrat stellt jedoch kein physiologisches Substrat von MIF dar und bisher konnten keine physiologischen Substrate für MIF identifiziert werden, so dass die biologische Bedeutung der Aktivität von MIF als Tautomerase fraglich erscheint. Die Mutation des Prolin1 steht in vielen Untersuchungen im Vordergrund, da man annimmt, dass jene Aminosäure eine Schlüsselfunktion im Rahmen der katalytischen Aktivität des MIF besitzt. *Lubetsky et al.* konnten in ihren Experimenten zeigen, dass das Einbringen eines Alanin zwischen Prolin1 und Methionin2 die glukokortikoidantagonistische Wirkung von MIF *in vitro* aufhebt [111].

Bei der Klärung dieser Sachverhalte bestand allerdings das Problem, dass ein verlässlicher Bioassay fehlte, der die Aktivität von MIF wiedergibt. Dennoch gibt die strenge Konservierung der katalytischen Tasche von MIF im Laufe der Evolution Grund zur

Annahme, dass diese eine wichtige Funktion besitzt. Auch wurde in etlichen Beobachtungen in Bezug auf Migrationshemmung von Makrophagen und glukokortikoidantagonistischer Aktivität gegen eine Rolle von MIF als Tautomerase argumentiert [16,75].

Prolin1 der Aminosäuresequenz vom MIF-Protein ist ein hochkonservierter Bestandteil der Tasche und startet die enzymatische Katalyse indem es ein Elektron vom Substrat abzieht. Basis unserer Untersuchungen bildete daher die MIF^{pg}-Maus, welche eine Punktmutation von Prolin1 zu Glycin trägt und durch *knock-in*-Technologie generiert wurde (*Fingerle-Rowson*, unveröffentlichte Daten). Somit wurde es möglich zu eluieren, ob diese Tasche, vielmehr das Prolin1 dieser Tasche, eine Rolle in der malignen Transformation muriner Fibroblasten spielt und diese somit die mechanistische Grundlage der biologischen Funktion darstellt.

So galt es nun einen robusten Bioassay zu etablieren, um diese Tautomerase Aktivität zu untersuchen. Mit der Methode des *focus formation assays* als etablierter und sehr gut reproduzierbarer Bioassay für MIF, wollten wir die Tautomerase-Hypothese testen. Anhand von Mäusen, welchen eine Mutation von Prolin1 zu Glycin durch *knock-in-gene-targeting* eingefügt wurde, welche die Struktur des Moleküls nahezu vollständig erhielt, jedoch seine Tautomeraseaktivität eliminierte [112], testeten wir, ob die enzymatische Aktivität die Grundlage der biologischen Aktivität ist. Wie erwartet zeigten sowohl Extrakte aus der Leber jener Mäuse als auch Fibroblasten nach Mutation keinerlei Tautomeraseaktivität mehr [65], bei normaler Expression des mutierten Protein *in vivo*. Obwohl Prolin1 hochkonserviert ist, konnten wir im FFA keine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität durch Verlust der Enzymaktivität feststellen.

Hermanowski et al. [75] verwendeten in ihren Versuchsreihen zwei MIF Mutanten, in denen einmal Prolin1 durch Serin und auf der anderen Seite Prolin1 durch Phenylalanin ausgetauscht wurde. Interessanterweise führte dies zu keiner eingeschränkten Inhibition der Monozytenchemotaxis, obwohl die Tautomeraseaktivität signifikant reduziert war [75]. Somit bestätigen auch diese Daten, dass die enzymatische Aktivität von MIF nicht die Grundlage zu sein scheint für seine Monozyten- Migrations-hemmenden Eigenschaften [75].

Im *focus formation assay* zeigten wir, dass MIF^{pg}-Fibroblasten ebenso effizient mit H-ras und E1A transformierbar sind, wie MIF^{wt}-Fibroblasten, denn die MIF^{pg}-Fibroblasten zeigten ähnliches Koloniewachstum wie die MIF^{wt}-Fibroblasten. Ebenso waren die Kolonien der MIF^{pg}-Fibroblasten größer als die Kolonien der zu vergleichenden MIF^{ko}.

Nachdem wir herausgefunden hatten, dass die pg Mausfibroblasten keine enzymatische Aktivität mehr besaßen, zeigten wir, dass MIF^{ko}-Fibroblasten eine Art Protektion vor maligner Transformation aufwiesen. Jedoch ist es nicht das Prolin1 der katalytischen Tasche, welches für dieses Effekte verantwortlich ist, da transformierte MIF^{pg}-Fibroblasten einen den MIF^{wt} ähnlichen Phänotyp zeigten. Somit scheint MIF in der

malignen Transformation zwar eine Rolle zu spielen, wobei das Prolin1 allerdings hierbei nicht essenziell für die biologischen Wirkungen von MIF ist. Obwohl es weiterer Studien bedarf, so kann doch sehr wahrscheinlich daraus gefolgert werden, dass MIFs Tautomeraseaktivität nicht maßgeblich zu sein scheint für seine biologische Aktivität in Fibroblasten. Diese Tatsache hätte erhebliche Konsequenzen für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren von MIF. So würde die momentan im Vordergrund stehende Suche nach Inhibitoren basierend auf MIFs Tautomeraseaktivität, stark an Bedeutung verlieren. Sollte die katalytische Tasche nicht die biologisch entscheidende Region von MIF sein, wird es hinfällig bessere Ansätze als das spezifische Targeting von Prolin1 zur Blockierung der ganzen Tasche zu finden.

Alternativ wäre es jedoch möglich, dass die konservierte Tasche von MIF zwar ein Protein bindet, das Fehlen von Prolin1 diese Bindung aber nicht ausreichend schwächt, um biologisch wirksam zu sein. So erscheint es sinnvoll, weitere Mutanten der konservierten Tasche zu gestalten, welche die Tasche verschliessen oder zerstören. Von Interesse wären hier beispielsweise C-terminale Mutanten, welche die Dimerisierung und damit ebenfalls die Taschenbildung verhindern. Interessant wären auch Mutanten (z.B. P1A, P1F), welche die katalytische Tasche blockieren. Dies hätte ebenso therapeutische Auswirkungen insofern, dass man statt die konservierte Tasche zu blockieren, in den Faltungsprozess von MIF eingreifen könnte. Insgesamt scheinen somit weitere Bioassays oder *in vivo* Modelle notwendig, um die genauen strukturellen Erfordernisse von MIF sowohl in der malignen Transformation als auch in dessen sonstiger biologischer Aktivität zu ergründen.

5.4 Ist intra- oder extrazelluläres MIF bei der malignen Transformation aktiv?

Viele Untersuchungen über MIF versuchten die genaue Wirkungsweise von MIF aufzuklären. Neben seiner möglichen enzymatischen Aktivität könnte MIF demnach ebenso über einen Rezeptor in der Zellmembran in die Zielzelle eindringen, um seine Wirkung zu entfalten. Ein solcher für Zytokine typischerweise vorhandener Rezeptor, welcher normalerweise einige Jahre nach dem erfolgreichen Klonen des Zytokins gefunden wird [10], wurde vor kurzem für MIF identifiziert. MIF bindet an CD74, die unvariable Kette des MHC II-Komplexes, welches auch an der Zelloberfläche exprimiert wird. CD74, welches selbst keine Signaltransduktionsdomäne besitzt, assoziiert mit CD44, einem Adhäsionsmolekül und Rezeptor für Hyaluronsäure und andere Proteine der extrazellulären Matrix [104, 113]. Durchaus sprechen einige Argumente dafür, dass ein Rezeptor für MIF existiert.

In diesem Zusammenhang zeigten *Mitchell et al.*, dass sowohl exogen zugeführtes rekombinantes, humanes MIF als auch sezerniertes MIF die Proliferation von ruhenden Fibroblasten stimulieren konnten [131]. Hierbei zeigte sich ebenso eine erhöhte Phosphorylierungsrate und Aktivierung der ERK1/2. Auch *Hudson et al.* [80] bestätigten, dass es keine Rolle spiele ob rMIF exogen zugegeben werde oder endogen exprimiert wird. In beiden Fällen bewirkt es eine Umgehung des durch p53 induzierten Wachstumsstops, der Seneszenz und der Apoptose, indem es die transkriptionale Aktivität von p53 supprimiert. Beide Ergebnisse beruhen allerdings auch MIF-exprimierenden Zellen und waren nicht an MIF^{ko}-Zellen validiert.

In unseren Experimenten konnten wir mit Hilfe des robusten *focus formation Assay* zeigen, dass transformierte MIF-defiziente Fibroblasten in Anwesenheit von Zellen, welche im Stande sind MIF zu exprimieren, ihre eingeschränkte maligne Transformationskapazität bessern konnten. So zeigten diese nun im Gegensatz zu denjenigen Zellen, welche auf MIF-defizienten *feeder*-Zellen kultiviert wurden, eine partielle Annäherung der Kolonienzahl an die der MIF-Wildtyp Fibroblasten. In einem weiteren *focus formation assay* beobachteten wir, dass transformierte MIF^{Pg}-Fibroblasten auf einem MIF^{wt} *feeder*-Hintergrund mehr Kolonien bildeten als auf einem MIF^{-/-} *feeder*-Hintergrund. Auch bei MIF^{Pg}-Fibroblasten scheint MIF demnach über eine extrazelluläre oder autokrine Weise einen Teil seiner Wirkung zu entfalten. Dies widerspricht nicht zwangsläufig der Hypothese, dass MIF eine intrazelluläre Wirkung besitzt, wie es *Takahashi et al.* postulierte [178]. Vielmehr weist es auf eine weitaus komplexere Wirkung von MIF als bisher vermutet hin und wir postulieren, dass sowohl intrazelluläres wie auch extrazelluläres MIF in den Prozess der malignen Transformation eingreift.

5.5 Die hochkonservierte Tasche von MIF, nicht aber Prolin1 vermittelt die maligne Transformation

Man sollte insgesamt vorsichtig sein mit der Annahme, dass es einen einzigen übergreifenden, molekularen Signalpfad gibt, über den alle Effekte von MIF in allen physiologischen und pathophysiologischen Situationen, in denen MIF eine Rolle spielt, vermittelt werden. Vielmehr könnten drei voneinander unabhängige Mechanismen zur Signalübertragung vorhanden sein. Hier sind einmal der möglicherweise durch einen Rezeptor vermittelte Pfad, dann der auf Jab-1/CSN5 basierende Pfad und schließlich der Pfad, welcher auf der enzymatischen Aktivität von MIF beruht, zu nennen.

Um herauszufinden, inwieweit die katalytische, aktive Region von MIF eine Rolle in der malignen Transformation muriner Fibroblasten spielt, setzten wir einen weiteren *focus formation assay* an, in welchem wir dem Kulturmedium ausgewählte Men-

5 Diskussion

gen an ISO-1 zugaben. ISO-1 als spezifischer kompetitiver Inhibitor der enzymatischen Isomeraseaktivität von MIF [111] veränderte das Transformationsverhalten der MIF^{wt}-Fibroblasten in unseren Untersuchungen jedoch nicht. So zeigten die mit ISO-1 behandelten MIF^{wt}-Fibroblasten nach wie vor eine signifikant höhere Kolonienzahl als die MIF^{ko}-Fibroblasten. Somit wäre auch die enzymatische Aktivität von MIF unerheblich für die maligne Transformation. Ebenfalls wäre es jedoch möglich, dass die eingesetzten Konzentrationen von ISO-1 möglicherweise zu niedrig angelegt waren, aber auch höhere Konzentrationen von ISO-1 bis 300 µM konnten nicht die Transformationskapazität der MIF^{+/+}-MEFs beeinträchtigen. Daher vermuten wir, dass es am wahrscheinlichsten ist, dass ISO-1 ein zu schwacher Inhibitor der Aktivität von MIF ist, oder nicht in ausreichender Konzentration ins Zellinnere gelangt.

Wir halten es in nächster Zukunft demnach für besonders wichtig, neue Inhibitoren zu entwickeln, um die biologischen Wirkmechanismen von *macrophage migration inhibitory factor* weiter aufzuklären zu können.

MIF stellt also ein vielseitiges Protein dar, welches überraschenderweise nicht nur als Zytokin fungiert. Nicht umsonst wurde es als *most interesting factor* = MIF bezeichnet [28]. Im Bereich der entzündlichen Erkrankungen haben sich MIF-Antikörper bereits als mögliche, wirkungsvolle Therapeutika herausgestellt. Auch in der Tumorgenese spielt MIF eine unumstrittene Rolle. Um auch im Bereich der Krebserkrankungen neue, effiziente Therapieansätze entwickeln zu können, ist es weiterhin erforderlich die genauen Mechanismen und Wirkprinzipien von MIF zu entschlüsseln. Somit käme man dem Ziel der Heilung dieser bisher nahezu unbeherrschbaren Erkrankungen wieder ein weiteres Stück näher.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung der Entzündung und die Entstehung von Neoplasien ist gekennzeichnet durch komplexe Abläufe innerhalb des Organismus, welche die genaue Kontrolle des Zellzyklus und der Proliferation erfordern. *Makrophage migration inhibitory factor* (MIF) wurde zunächst als ubiquitärer Mediator mit proinflammatorischer und glukokortikoidantagonistischer Wirkung im Immunsystem entdeckt. In den letzten zehn Jahren wurde auch klar, dass MIF ebenso als ein Wachstums- und Überlebensfaktor agiert. Die exakte biologische Funktion von MIF ist in vielen Geweben weiterhin 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.

Um die Funktion von MIF als Tautomerase auf genetischer Basis zu analysieren, untersuchten wir die MIF^{P8} Maus, welche durch Punktmutation von Prolin1 zu Glycin einen Kompletterlust der enzymatischen Aktivität von MIF aufweist. Der Phänotyp der MIF-Defizienz in Fibroblasten besteht in verstärkter Kontaktinhibition, einem Defekt bei der malignen Transformation. Um die These über MIF als Enzym zu testen, untersuchten wir Fibroblasten von P1G-mutanten Mäusen. Laut unseren *in vivo* Analysen besitzen mutierte MIF^{P8}-MEFs keine enzymatische Aktivität mehr. Die MIF^{P8}-Maus, welche eine Mutation des Prolin1 aufweist, jener Aminosäure, welche als katalytische Basis der Isomeraseaktivität gilt, zeigte, dass MIF^{P8}-Fibroblasten zwar einen Verlust der enzymatischen Aktivität als Isomerase, jedoch keine Defekte in der Ras-vermittelten Transformation aufwiesen. Daraus folgend beruht die biologische Aktivität von MIF nicht auf dessen Isomeraseaktivität.

Die p53^{-/-} Mäuse entwickelten früh Tumore, meist Lymphome und Osteosarkome, mit einer daraus resultierenden frühen Letalität der adulten Maus. Die meisten Effekte von MIF scheinen durch p53 vermittelt zu werden, denn in Mäusen, welche sowohl für MIF als auch für p53 defizient sind, verschwindet der in MIF^{ko}-Mäusen beobachtete Phänotyp der verzögerten Tumorentstehung. Auch der in unseren Experimenten fehlende Unterschied in der Überlebenszeit von DKO im Vergleich zu p53^{-/-} MIF^{flox/flox} Mäusen, unterstützt die Annahme, dass die meisten Effekte von MIF in der Tumorgenese *in vivo* über p53 stattfinden. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die tumorregulierende Aktivität von MIF im Wesentlichen über Regulation der p53-

6 Zusammenfassung

Aktivität durch MIF auf dem C57Bl/6 Hintergrund erklärt ist. Zudem zeigen wir, dass diese Aktivität nicht durch die enzymatische Aktivität von MIF als Tautomerase erklärt ist. Diese Erkenntnisse bringen wichtige Informationen über mögliche Wirkmechanismen von MIF und die damit verbundene mögliche Entwicklung spezifischer Inhibitoren in naher Zukunft, womit neue Therapiekonzepte und -ansätze in der Behandlung maligner Erkrankungen geschaffen werden können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Abe, T. Shimizu, A. Ohkawara und J. Nishihira. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (mif) expression in injured epidermis and cultered fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 1500:1–9, 2000.
- [2] Y. Al-Abed, D. Dabideen, B. Aljabari, A. Valster, D. Messmer, M. Ochani, M. Tannovic, K. Ochani, M. Bacher, F. Nicoletti, C. Metz, V. A. Pavlov, E. J. Miller und K. J. Tracey. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem*, 280(44):36541–36544, Nov 2005.
- [3] J. M. Almendral, D. Sommer, H. Macdonald-Bravo, J. Burckhardt, J. Perera und R. Bravo. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 8(5):2140–2148, May 1988.
- [4] C. Andrei, C. Dazzi, L. Lotti, M. R. Torrisi, G. Chimini und A. Rubartelli. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*, 10(5):1463–1475, May 1999.
- [5] P. Angel und M. Karin. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072(2-3):129–157, Dec 1991.
- [6] R. S. Apte, D. Sinha, E. Mayhew, G. J. Wistow und J. Y. Niederkorn. Cutting edge: Role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting nk cell activity and preserving immun privilege. *J. Immunol.*, 160:5693–5696, 1998.
- [7] P. Argos, A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. Narayana und L. S. Pierson. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J*, 5(2):433–440, Feb 1986.
- [8] N. Auphan, J. A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg und M. Karin. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270(5234):286–290, Oct 1995.

7 Literaturverzeichnis

- [9] S. Austin, M. Ziese und N. Sternberg. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, 25(3):729–736, Sep 1981.
- [10] A.W.Thomson, editor. *The Cytokine Handbook*. Academic Press, 1998.
- [11] M. Bacher, A. Meinhardt, H. Y. Lan, F. S. Dhabhar, W. Mu und C. N. Metz. Mif expression in the rat brain: Implications for neuronal function. *Mol. Med.*, 4:217–230, 1998.
- [12] M. Bacher, A. Meinhardt, H. Y. Lan, W. Mu, C. N. Metz und J. A. Chesney. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am.J Pathol.*, 150:235–246, 1997.
- [13] M. Bacher, C. N. Metz, T. Calandra, K. Mayer, J. Chesney und M. L. et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in t-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93:7849–7854, 1996.
- [14] P. A. Baeuerle und D. Baltimore. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87(1):13–20, Oct 1996.
- [15] S. Bagchi, P. Raychaudhuri und J. R. Nevins. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, 62(4):659–669, Aug 1990.
- [16] K. Bendrat, Y. Al-Abed, D. J. Callaway, T. Peng, T. Calandra, C. N. Metz und R. Bucala. Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry*, 36(49):15356–15362, Dec 1997.
- [17] F. Benigni, T. Atsumi, T. Calandra, C. Metz, B. Echtenacher, T. Peng und R. Bucala. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J Clin Invest*, 106(10):1291–1300, Nov 2000.
- [18] J. Bernhagen, T. Calandra, A. Cerami und R. Bucala. Macrophage migration inhibitory factor is a neuroendocrine mediator of endotoxaemia. *Trends Microbiol*, 2(6):198–201, Jun 1994.
- [19] J. Bernhagen, T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey und W. Voelter. Mif is a pituitary- derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365:756–759, 1993.
- [20] J. Bernhagen, R. A. Mitchell, T. Calandra, W. Voelter, A. Cerami und R. Bucala. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human

7 Literaturverzeichnis

- macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*, 33(47):14144–14155, Nov 1994.
- [21] F. A. Blocki, L. B. Ellis und L. P. Wackett. MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs. *Protein Sci*, 2(12):2095–2102, Dec 1993.
- [22] B. R. Bloom und B. Bennett. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 111:514–521, 1966.
- [23] J. L. Bos. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49(17):4682–4689, Sep 1989.
- [24] T. J. Bos, F. S. Monteclaro, F. Mitsunobu, A. R. Ball, C. H. Chang, T. Nishimura und P. K. Vogt. Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev*, 4(10):1677–1687, Oct 1990.
- [25] H. R. Bourne, D. A. Sanders und F. McCormick. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305):117–127, Jan 1991.
- [26] M. Bozza, L. F. Kolakowski, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, J. R. David und C. Gerard. Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes. *Genomics*, 27(3):412–419, Jun 1995.
- [27] A. Bradley, M. Evans, M. H. Kaufman und E. Robertson. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965):255–256, 1984.
- [28] R. Bucala. A most interesting factor. *Nature*, 408:167–168, 2000.
- [29] M. Budarf, T. McDonald, B. Sellinger, C. Kozak, C. Graham und G. Wistow. Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics*, 39(2):235–236, Jan 1997.
- [30] T. Calandra, J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami und R. Bucala. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377(6544):68–71, Sep 1995.
- [31] T. Calandra, J. Bernhagen, R. A. Mitchell und R. Bucala. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.*, 179:1895–1902, 1994.

7 Literaturverzeichnis

- [32] T. Calandra, B. Echtenacher, D. L. Roy, J. Pugin, C. N. Metz, L. Hültner, D. Heumann, D. Männel, R. Bucala und M. P. Glauser. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 6(2):164–170, Feb 2000.
- [33] T. Calandra, L. A. Spiegel, C. N. Metz und R. Bucala. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11383–11388, Sep 1998.
- [34] S. Chellappan, V. B. Kraus, B. Kroger, K. Munger, P. M. Howley, W. C. Phelps und J. R. Nevins. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10):4549–4553, May 1992.
- [35] H. Chen, M. Centola, S. F. Altschul und H. Metzger. Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J. Exp. Med.*, 188:1657–1668, 1998.
- [36] M. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts und C. J. Sherr. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK ‘inhibitors’ are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*, 18(6):1571–1583, Mar 1999.
- [37] J. Chesney, C. Metz, M. Bacher, T. Peng, A. Meinhardt und R. Bucala. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*, 5(3):181–191, Mar 1999.
- [38] G. Chu, H. Hayakawa und P. Berg. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*, 15(3):1311–1326, Feb 1987.
- [39] W. H. Churchill, W. F. Piessens, C. A. Sulis und J. R. David. Macrophages activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells. *J. Immunol.*, 115:781–786, 1975.
- [40] F. X. Claret, M. Hibi, S. Dhut, T. Toda und M. Karin. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, 383(6599):453–457, Oct 1996.
- [41] A. R. Clarke, C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper und A. H. Wyllie. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362(6423):849–852, Apr 1993.

- [42] M. Coggan, L. Whitbread, A. Whittington und P. Board. Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J*, 334 (Pt 3):617–623, Sep 1998.
- [43] J. M. Daun und J. G. Cannon. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(3):R1043–R1049, Sep 2000.
- [44] J. David. *Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell- antigen interaction*. Proc Natl Acad Sci USA, 1966.
- [45] J. David. 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.
- [46] Y. P. de Jong, A. C. Abadia-Molina, A. R. Satoskar, K. Clarke, S. T. Rietdijk, W. A. Faubion, E. Mizoguchi, C. N. Metz, M. Alsahli, T. ten Hove, A. C. Keates, J. B. Lubetsky, R. J. Farrell, P. Michetti, S. J. van Deventer, E. Lolis, J. R. David, A. K. Bhan, C. Terhorst und M. A. Sahli. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol*, 2(11):1061–1066, Nov 2001.
- [47] M. T. del Vecchio, S. A. Tripodi, F. Arcuri, L. Pergola, L. Hako, R. Vatti und M. Cintonino. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate*, 45(1):51–57, Sep 2000.
- [48] J. C. Deutsch. Determination of p-hydroxyphenylpyruvate, p-hydroxyphenyllactate and tyrosine in normal human plasma by gas chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 690(1-2):1–6, Mar 1997.
- [49] H. Döhner, K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy und S. Stilgenbauer. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 85(6):1580–1589, Mar 1995.
- [50] E. G. Diacumakos, S. Holland und P. Pecora. A microsurgical methodology for human cells in vitro: evolution and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 65(4):911–918, Apr 1970.
- [51] C. A. Dinarello. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112(6 Suppl):321S–329S, Dec 1997.

7 Literaturverzeichnis

- [52] S. C. Donnelly, C. Haslett, P. T. Reid, I. S. Grant, W. A. Wallace, C. N. Metz, L. J. Bruce und R. Bucala. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, 3(3):320–323, Mar 1997.
- [53] J. Downward. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*, 8(1):49–54, Feb 1998.
- [54] A. S. Edwards und J. D. Scott. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2):217–221, Apr 2000.
- [55] B. P. Eliceiri, R. Klemke, S. Strömblad und D. A. Cheresh. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol*, 140(5):1255–1263, Mar 1998.
- [56] J. Espinosa und B. Emerson. *Mol. Cell.*, 8:57–59, 2001.
- [57] M. J. Evans und M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156, Jul 1981.
- [58] L. A. Feig, T. Urano und S. Cantor. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci*, 21(11):438–441, Nov 1996.
- [59] G. Fingerle-Rowson. *A genetic approach to the biological function of macrophage migration inhibitory factor (MIF)*. PhD thesis, The Picower School of Molecular medicine, New York, USA, 2001.
- [60] G. Fingerle-Rowson, O. Petrenko, C. N. Metz, T. G. Forsthuber, R. Mitchell, R. Huss, U. Moll, W. Müller und R. Bucala. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16):9354–9359, Aug 2003.
- [61] M. C. Fitzgerald, I. Chernushevich, K. G. Standing, C. P. Whitman und S. B. Kent. Probing the oligomeric structure of an enzyme by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14):6851–6856, Jul 1996.
- [62] K. R. Folger, E. A. Wong, G. Wahl und M. R. Capecchi. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol*, 2(11):1372–1387, Nov 1982.
- [63] A. D. Frankel, D. S. Bredt und C. O. Pabo. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science*, 240(4848):70–73, Apr 1988.

- [64] C. Froidevaux, T. Roger, C. Martin, M. P. Glauser und T. Calandra. Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Crit Care Med*, 29(7 Suppl):S13–S15, Jul 2001.
- [65] F.-R. G. *A genetic approach to the biologic function of macrophage migration inhibitory factor (MIF)*. PhD thesis, The Pioneer Graduate School of molecular medicine, Manhasset, New York, USA, 2001.
- [66] R. H. Giles, D. J. Peters und M. H. Breuning. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet*, 14(5):178–183, May 1998.
- [67] M. Graessmann und A. Graessman. Earlyßimian-virus-40-specific RNA contains information for tumor antigen formation and chromatin replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(2):366–370, Feb 1976.
- [68] F. Graham und A. van der Eb. A new technique for the assay of infektivty of human adenovirus iv dna. *Virology*, 52:465, 1973.
- [69] S. D. Griffiths, A. R. Clarke, L. E. Healy, G. Ross, A. M. Ford, M. L. Hooper, A. H. Wyllie und M. Greaves. Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene*, 14(5):523–531, Feb 1997.
- [70] G. Rowson-Fingerle, O. Petrenko, C. N. Metz, T. G. Forsthuber, R. Mitchell, R. Huss, U. Moll, W. Müller und R. Bucala. The p53- dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *PNAS*, 100:9354–9359, 2003.
- [71] M. Göttlicher, S. Heck und P. Herrlich. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*, 76(7):480–489, Jun 1998.
- [72] L. Han, D. Wong, A. Dhaka, D. Afar, M. White, W. Xie, H. Herschman, O. Witte und J. Colicelli. Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10):4954–4959, May 1997.
- [73] M. Harvey, A. T. Sands, R. S. Weiss, M. E. Hegi, R. W. Wiseman, P. Pantazis, B. C. Giovanella, M. A. Tainsky, A. Bradley und L. A. Donehower. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene*, 8(9):2457–2467, Sep 1993.
- [74] X.-X. He, J. Yang, Y.-W. Ding, W. Liu, Q.-Y. Shen und H. H.-X. Xia. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis. *Gut*, 55(6):797–802, Jun 2006.

7 Literaturverzeichnis

- [75] A. Hermanowski-Vosatka, S. S. Mundt, J. M. Ayala, S. Goyal, W. A. Hanlon, R. M. Czerwinski, S. D. Wright und C. P. Whitman. Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry*, 38(39):12841–12849, Sep 1999.
- [76] K. Hibi, H. Mitomi, W. Koizumi, S. Tanabe, K. Saigenji und I. Okayasu. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Pathol*, 108(1):26–34, Jul 1997.
- [77] L. Hochman, N. Segev, N. Sternberg und G. Cohen. Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology*, 131(1):11–17, Nov 1983.
- [78] R. H. Hoess und K. Abremski. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(4):1026–1029, Feb 1984.
- [79] R. H. Hoess, M. Ziese und N. Sternberg. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(11):3398–3402, Jun 1982.
- [80] J. D. Hudson, M. A. Shoaibi, R. Maestro, A. Carnero, G. J. Hannon und D. H. Beach. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*, 190(10):1375–1382, Nov 1999.
- [81] D. C. Jaworski, A. Jasinskas, C. N. Metz, R. Bucala und A. G. Barbour. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol Biol*, 10(4):323–331, Aug 2001.
- [82] J. R. Jenkins, K. Rudge und G. A. Currie. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 312(5995):651–654, 1984.
- [83] R. Johnson, B. Spiegelman, D. Hanahan und R. Wisdom. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol*, 16(8):4504–4511, Aug 1996.
- [84] W. H. Johnson, R. M. Czerwinski, S. L. Stamps und C. P. Whitman. A kinetic and stereochemical investigation of the role of lysine-32 in the phenylpyruvate tautomerase activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry*, 38(48):16024–16033, Nov 1999.

7 Literaturverzeichnis

- [85] H. Jung, T. Kim, H. Chae, K. Kim und H. Ha. Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein pag by direct interaction. *J. Biol. Chem.*, 276:15504–15510, 2001.
- [86] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein und R. W. Craig. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51(23 Pt 1):6304–6311, Dec 1991.
- [87] Y. Kato, T. Muto, T. Tomura, H. Tsumura, H. Watarai, T. Mikayama, K. Ishizaka und R. Kuroki. The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta-sheets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7):3007–3010, Apr 1996.
- [88] R. Kühn, F. Schwenk, M. Aguet und K. Rajewsky. Inducible gene targeting in mice. *Science*, 269(5229):1427–1429, Sep 1995.
- [89] R. Kleemann, A. Hausser, G. Geiger, R. Mischke, A. Burger-Kentischer, O. Flieger, F. J. Johannes, T. Roger, T. Calandra, A. Kapurniotu, M. Grell, D. Finkelmeier, H. Brunner und J. Bernhagen. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 408(6809):211–216, Nov 2000.
- [90] R. Kleemann, A. Kapurniotu, R. W. Frank, A. Gessner, R. Mischke, O. Flieger, S. Jüttner, H. Brunner und J. Bernhagen. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol*, 280(1):85–102, Jul 1998.
- [91] R. Kleemann, R. Mischke, A. Kapurniotu, H. Brunner und J. Bernhagen. Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes. *FEBS Lett*, 430(3):191–196, Jul 1998.
- [92] S. Kobayashi, K. Satomura, J. M. Levisky, T. Scenath, G. J. Wistow und I. Semba. Expression pattern of macrophage migration inhibitory factor during embryogenesis. *Mech. Dev.*, 84:153–156, 1999.
- [93] S. Kobayashi, K. Yoshida, T. Ohshima, N. Esumi, V. M. Paralkar, G. J. Wistow und A. B. Kulkarni. DNA sequence motifs are associated with aberrant homologous recombination in the mouse macrophage migration inhibitory factor (Mif) locus. *Gene*, 215(1):85–92, Jul 1998.

7 Literaturverzeichnis

- [94] M. Krishna, B. Woda, L. Savas, S. Baker und B. Banner. Expression of p53 antigen in inflamed and regenerated mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Mod Pathol*, 8(6):654–657, Aug 1995.
- [95] T. Kudo. Identification of macrophage migration inhibitory factor (mif) in rat gastrointestinal tract and its role in rat stomach. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 73:317–325, 1998.
- [96] S. J. Kuerbitz, B. S. Plunkett, W. V. Walsh und M. B. Kastan. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16):7491–7495, Aug 1992.
- [97] M. Kuriyama, N. Harada, S. Kuroda, T. Yamamoto, M. Nakafuku, A. Iwamatsu, D. Yamamoto, R. Prasad, C. Croce, E. Canaani und K. Kaibuchi. Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J Biol Chem*, 271(2):607–610, Jan 1996.
- [98] H. Y. Lan, M. Bacher, N. Yang, W. Mu, D. J. Nikolic-Paterson, C. Metz, A. Meinhardt, R. Bucala und R. C. Atkins. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med*, 185(8):1455–1465, Apr 1997.
- [99] A. Lanahan, J. B. Williams, L. K. Sanders und D. Nathans. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol*, 12(9):3919–3929, Sep 1992.
- [100] D. P. Lane. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381):15–16, Jul 1992.
- [101] M. Leech, C. Metz, P. Hall, P. Hutchinson, K. Gianis, M. Smith, H. Weedon, S. R. Holdsworth, R. Bucala und E. F. Morand. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum*, 42(8):1601–1608, Aug 1999.
- [102] M. Leech, C. Metz, L. Santos, T. Peng, S. R. Holdsworth, R. Bucala und E. F. Morand. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, 41(5):910–917, May 1998.
- [103] F. A. Lemckert, J. D. Sedgwick und H. Körner. Gene targeting in C57BL/6 ES cells. Successful germ line transmission using recipient BALB/c blastocysts developmentally matured in vitro. *Nucleic Acids Res*, 25(4):917–918, Feb 1997.
- [104] L. Leng, C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell und R. Bucala. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 197(11):1467–1476, Jun 2003.

7 Literaturverzeichnis

- [105] G. Löffler. *Basiswissen Biochemie*. Springe-Verlag, 2001.
- [106] A. Lin, T. Smeal, B. Binetruy, T. Deng, J. C. Chambard und M. Karin. Control of AP-1 activity by signal transduction cascades. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 28:255–260, 1993.
- [107] S. G. Lin, X. Y. Yu, Y. X. Chen, X. R. Huang, C. Metz, R. Bucala, C. P. Lau und H. Y. Lan. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherosclerosis in rabbits. *Circ Res*, 87(12):1202–1208, Dec 2000.
- [108] Y. C. Liu, T. Nakano, C. Elly und K. Ishizaka. Requirement of posttranslational modifications for the generation of biologic activity of glycosylation-inhibiting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23):11227–11231, Nov 1994.
- [109] A. Lloyd, N. Yancheva und B. Wasylyk. Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. *Nature*, 352(6336):635–638, Aug 1991.
- [110] S. W. Lowe, E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne und T. Jacks. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362(6423):847–849, Apr 1993.
- [111] J. B. Lubetsky, A. Dios, J. Han, B. Aljabari, B. Ruzsicska, R. Mitchell, E. Lolis und Y. Al-Abed. The tautomerase active site of makrophage migration inhibitory factor is a potential traget for discovery of novel anti- inflammatory agents. *JBC*, 277:24976–24982, 2002.
- [112] J. B. Lubetsky, M. Swope, C. Dealwis, P. Blake und E. Lolis. Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity. *Biochemistry*, 38(22):7346–7354, Jun 1999.
- [113] H. Lue, A. Kapurniotu, G. Fingerle-Rowson, T. Roger, L. Leng, M. Thiele, T. Calandra, R. Bucala und J. Bernhagen. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal*, 18(5):688–703, May 2006.
- [114] H. Lue, R. Kleemann, T. Calandra, T. Roger und J. Bernhagen. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.*, 4(4):449–460, Apr 2002.
- [115] J. MacMicking, Q. W. Xie und C. Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15:323–350, 1997.

7 Literaturverzeichnis

- [116] R. Maestro, A. Gloghini, C. Doglioni, D. Gasparotto, T. Vukosavljevic, V. D. Re, L. Laurino, A. Carbone und M. Boiocchi. MDM2 overexpression does not account for stabilization of wild-type p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 85(11):3239–3246, Jun 1995.
- [117] B. Magi, L. Bini, S. Liberatori, B. Marzocchi, R. Raggiaschi, F. Arcuri, S. A. Tripodi, M. Cintorino, P. Tosi und V. Pallini. Charge heterogeneity of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human liver and breast tissue. *Electrophoresis*, 19(11):2010–2013, Aug 1998.
- [118] R. Maleszka, H. G. de Couet und G. L. Miklos. Data transferability from model organisms to human beings: insights from the functional genomics of the flightless region of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7):3731–3736, Mar 1998.
- [119] W. Maltzman und L. Czyzyk. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol*, 4(9):1689–1694, Sep 1984.
- [120] R. Marais, J. Wynne und R. Treisman. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73(2):381–393, Apr 1993.
- [121] J. M. Markert, C. M. Fuller, G. Y. Gillespie, J. K. Bubien, L. A. McLean, R. L. Hong, K. Lee, S. R. Gullans, T. B. Mapstone und D. J. Benos. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics*, 5(1):21–33, Feb 2001.
- [122] A. L. Marson, D. E. Tarr und A. L. Scott. Macrophage migration inhibitory factor (mif) transcription is significantly elevated in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. *Gene*, 278(1-2):53–62, Oct 2001.
- [123] A. McInnes und D. M. Rennick. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.*, 167:598–611, 1988.
- [124] C. N. Metz und R. Bucala. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv Immunol*, 66:197–223, 1997.
- [125] K. Meyer-Siegler. Increased stability of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in DU-145 prostate cancer cells. *J Interferon Cytokine Res*, 20(9):769–778, Sep 2000.

- [126] K. Meyer-Siegler und P. B. Hudson. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*, 48(3):448–452, Sep 1996.
- [127] P. Mühlhahn, J. Bernhagen, M. Czisch, J. Georgescu, C. Renner, A. Ross, R. Bucala und T. A. Holak. NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci*, 5(10):2095–2103, Oct 1996.
- [128] A. Mikulowska, C. N. Metz, R. Bucala und R. Holmdahl. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol*, 158(11):5514–5517, Jun 1997.
- [129] R. Mitchell, M. Bacher, J. Bernhagen, T. Pushkarskaya, M. F. Seldin und R. Bucala. Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (mif). *J. Immunol.*, 154:3863–3870, 1995.
- [130] R. A. Mitchell und R. Bucala. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol*, 10(5):359–366, Oct 2000.
- [131] R. A. Mitchell, C. N. Metz, T. Peng und R. Bucala. 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(25):18100–18106, Jun 1999.
- [132] Y. Mizue, J. Nishihira, T. Miyazaki, S. Fujiwara, M. Chida und K. Nakamura. Quantitation of macrophage migration inhibitory factor (mif) using the one-step sandwich enzyme immunosorbent assay: elevated serum mif concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of mif in erythrocytes. *Int. J. Mol. Med.*, 5:397–403, 2000.
- [133] M. B. Møller. P27 in cell cycle control and cancer. *Leuk Lymphoma*, 39(1-2):19–27, Sep 2000.
- [134] U. M. Moll, M. LaQuaglia, J. Benard und G. Riou. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastoma but not in differentiated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, 92:4407–4411, 1995.
- [135] U. M. Moll, G. Riou und A. J. Levine. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15):7262–7266, Aug 1992.

7 Literaturverzeichnis

- [136] Y. Nakamura, T. Gojobori und T. Ikemura. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucleic Acids Res*, 27(1):292, Jan 1999.
- [137] C. F. Nathan, M. L. Karnovsky und J. R. David. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 137:1356–1376, 1971.
- [138] C. F. Nathan, H. G. Remold und J. R. David. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J. Exp. Med.*, 137:275–290, 1973.
- [139] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P. H. Hofschneider. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, 1(7):841–845, 1982.
- [140] G. Odh, A. Hindemith, A. M. Rosengren, E. Rosengren und H. Rorsman. Isolation of a new tautomerase monitored by the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole. *Biochem Biophys Res Commun*, 197(2):619–624, Dec 1993.
- [141] S. M. Oldham, G. J. Clark, L. M. Gangarosa, R. J. Coffey und C. J. Der. Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14):6924–6928, Jul 1996.
- [142] L. J. Page, A. J. Darmon, R. Uellner und G. M. Griffiths. L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochim Biophys Acta*, 1401(2):146–156, Feb 1998.
- [143] G. Pagès, S. Guérin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger und J. Pouyssegur. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286(5443):1374–1377, Nov 1999.
- [144] V. Paralkar und G. Wistow. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics*, 19(1):48–51, Jan 1994.
- [145] O. Petrenko, G. Fingerle-Rowson, T. Peng, R. A. Mitchell und C. N. Metz. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation. *J. Biol. Chem.*, 278(13):11078–11085, Mar 2003.
- [146] K. Rajewsky, H. Gu, R. Kühn, U. A. Betz, W. Müller, J. Roes und F. Schwenk. Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 98(3):600–603, Aug 1996.
- [147] P. Rodriguez-Viciana, P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield und J. Downward. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370(6490):527–532, Aug 1994.

7 Literaturverzeichnis

- [148] K. Roovers, G. Davey, X. Zhu, M. E. Bottazzi und R. K. Assoian. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell*, 10(10):3197–3204, Oct 1999.
- [149] E. Rosengren, P. Aman, S. Thelin, C. Hansson, S. Ahlfors, P. Björk, L. Jacobsson und H. Rorsman. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett*, 417(1):85–88, Nov 1997.
- [150] E. Rosengren, R. Bucala, P. Aman, L. Jacobsson, G. Odh, C. N. Metz und H. Rorsman. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med*, 2(1):143–149, Jan 1996.
- [151] G. J. Rosenthal, P. Simeonova und E. Corsini. Asbestos toxicity: an immunologic perspective. *Rev Environ Health*, 14(1):11–20, 1999.
- [152] A. G. Rossi, C. Haslett, N. Hirani, A. P. Greening, I. Rahmann und C. N. Metz. Human circulating eosinophiles secrete macrophage migration inhibitory factor (mif). potential role in asthma. *J. Clin. Invest.*, 101:2869–2874, 1998.
- [153] A. Rubartelli, A. Bajetto, G. Allavena, E. Wollman und R. Sitia. Secretion of thio-redoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem*, 267(34):24161–24164, Dec 1992.
- [154] P. D. Sadowski. Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *FASEB J*, 7(9):760–767, Jun 1993.
- [155] V. P. Sah, L. D. Attardi, G. J. Mulligan, B. O. Williams, R. T. Bronson und T. Jacks. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet*, 10(2):175–180, Jun 1995.
- [156] R. I. Scheinman, P. C. Cogswell, A. K. Lofquist und A. S. Baldwin. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 270(5234):283–286, Oct 1995.
- [157] M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach und S. W. Lowe. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5):593–602, Mar 1997.
- [158] J. W. Shay, O. M. Pereira-Smith und W. E. Wright. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*, 196(1):33–39, Sep 1991.

- [159] T. Shimizu, R. Abe, H. Nakamura, A. Ohkawara, M. Suzuki und J. Nishihira. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 264:751–758, 1999.
- [160] T. Smeal, B. Binetruy, D. Mercola, A. Grover-Bardwick, G. Heidecker, U. R. Rapp und M. Karin. Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol Cell Biol*, 12(8):3507–3513, Aug 1992.
- [161] T. Smeal, B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer und M. Karin. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354(6353):494–496, Dec 1991.
- [162] T. Soares, D. Goodsell, R. Ferreira, A. J. Olson und J. M. Briggs. Ionization state and molecular docking studies for the macrophage migration inhibitory factor: the role of lysine 32 in the catalytic mechanism. *J Mol Recognit*, 13(3):146–156, 2000.
- [163] D. W. Stacey und V. G. Allfrey. Microinjection studies of duck globin messenger RNA translation in human and avian cells. *Cell*, 9(4 PT 2):725–732, Dec 1976.
- [164] J. T. Stivers, C. Abeygunawardana und A. S. Mildvan. ¹⁵N NMR relaxation studies of free and inhibitor-bound 4-oxalocrotonate tautomerase: backbone dynamics and entropy changes of an enzyme upon inhibitor binding. *Biochemistry*, 35(50):16036–16047, Dec 1996.
- [165] J. T. Stivers, C. Abeygunawardana, A. S. Mildvan, G. Hajipour und C. P. Whitman. 4-Oxalocrotonate tautomerase: pH dependence of catalysis and pK_a values of active site residues. *Biochemistry*, 35(3):814–823, Jan 1996.
- [166] J. T. Stivers, C. Abeygunawardana, A. S. Mildvan, G. Hajipour, C. P. Whitman und L. H. Chen. Catalytic role of the amino-terminal proline in 4-oxalocrotonate tautomerase: affinity labeling and heteronuclear NMR studies. *Biochemistry*, 35(3):803–813, Jan 1996.
- [167] J. T. Stivers, C. Abeygunawardana, C. P. Whitman und A. S. Mildvan. 4-Oxalocrotonate tautomerase, a 41-kDa homohexamer: backbone and side-chain resonance assignments, solution secondary structure, and location of active site residues by heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci*, 5(4):729–741, Apr 1996.
- [168] H. S. Subramanya, D. I. Roper, Z. Dauter, E. J. Dodson, G. J. Davies, K. S. Wilson und D. B. Wigley. Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and

7 Literaturverzeichnis

- mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry*, 35(3):792–802, Jan 1996.
- [169] H. Sugimoto, M. Suzuki, A. Nakagawa, I. Tanaka und J. Nishihira. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett*, 389(2):145–148, Jul 1996.
- [170] H. Sugimoto, M. Taniguchi, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki und J. Nishihira. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J Struct Biol*, 120(1):105–108, Oct 1997.
- [171] H. Sugimoto, M. Taniguchi, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki und J. Nishihira. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 38(11):3268–3279, Mar 1999.
- [172] H. W. Sun, J. Bernhagen, R. Bucala und E. Lolis. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11):5191–5196, May 1996.
- [173] H. Suzuki, H. Kanagawa und J. Nishihira. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol.Lett.*, 51:141–147, 1996.
- [174] T. Suzuki, A. Ogata, K. Tashiro, K. Nagashima, M. Tamura und J. Nishihira. Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain. *Brain Res*, 816(2):457–462, Jan 1999.
- [175] M. Swope, H. W. Sun, P. R. Blake und E. Lolis. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J*, 17(13):3534–3541, Jul 1998.
- [176] M. D. Swope und E. Lolis. Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme? *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 139:1–32, 1999.
- [177] M. D. Swope, H. W. Sun, B. Klockow, P. Blake und E. Lolis. Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and S-hexylglutathione. *J Biol Chem*, 273(24):14877–14884, Jun 1998.
- [178] A. Takahashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, K. Ogasawara, J. Nishihira und K. Onoe. Antisense macrophage migration inhibitory factor (mif) prevents anti-igm mediated growth arrest and apoptosis of a murine b cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol. Immunol.*, 43:61–67, 1999.

7 Literaturverzeichnis

- [179] N. Takahashi, J. Nishihira, Y. Sato, M. Kondo, H. Ogawa, T. Ohshima, Y. Une und S. Todo. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*, 4(11):707–714, Nov 1998.
- [180] F. Talos, P. Mena, G. Fingerle-Rowson, U. Moll und O. Petrenko. MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, 12(10):1319–1328, Oct 2005.
- [181] A. B. Taylor, R. M. Czerwinski, W. H. Johnson, C. P. Whitman und M. L. Hackert. Crystal structure of 4-oxalocrotonate tautomerase inactivated by 2-oxo-3-pentynoate at 2.4 Å resolution: analysis and implications for the mechanism of inactivation and catalysis. *Biochemistry*, 37(42):14692–14700, Oct 1998.
- [182] G. B. Thurmann, I. A. Braude, P. W. Gray, R. K. Oldham und H. C. Stevenson. Mif-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J Immunol*, 115:781–786, 1975.
- [183] M. Tomiyasu, I. Yoshino, R. Suemitsu, T. Okamoto und K. Sugimachi. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res*, 8(12):3755–3760, Dec 2002.
- [184] J. M. Turner, M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter und D. R. Littman. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*, 60(5):755–765, Mar 1990.
- [185] I. M. Verma, J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. V. Antwerp und S. Miyamoto. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, 9(22):2723–2735, Nov 1995.
- [186] E. Vivès, P. Brodin und B. Lebleu. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272(25):16010–16017, Jun 1997.
- [187] A. B. Vojtek und C. J. Der. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*, 273(32):19925–19928, Aug 1998.
- [188] G. Waeber, T. Calandra, R. Roduit, J. A. Haefliger, C. Bonny und N. Thompson. 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.

7 Literaturverzeichnis

- [189] A. B. Weitberg, S. A. Weitzman, M. Destrempe, S. A. Latt und T. P. Stossel. Stimulated human phagocytes produce cytogenetic changes in cultured mammalian cells. *N Engl J Med*, 308(1):26–30, Jan 1983.
- [190] S. A. Weitzman, A. B. Weitberg, E. P. Clark und T. P. Stossel. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science*, 227(4691):1231–1233, Mar 1985.
- [191] G. J. Wistow, M. P. Shaughnessy, D. C. Lee, J. Hodin und P. S. Zelenka. A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(4):1272–1275, Feb 1993.
- [192] H. Wolf, M. P. Rols, E. Boldt, E. Neumann und J. Teissié. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 66(2 Pt 1):524–531, Feb 1994.
- [193] J. R. Woodgett. Fos and jun: two into one will go. *Semin Cancer Biol*, 1(6):389–397, Dec 1990.
- [194] A. C. Wotherspoon. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *Br Med Bull*, 54(1):79–85, 1998.
- [195] L. Yamasaki, R. Bronson, B. O. Williams, N. J. Dyson, E. Harlow und T. Jacks. Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet*, 18(4):360–364, Apr 1998.
- [196] N. Yang, D. J. Nikolic-Paterson, Y. Y. Ng, W. Mu, C. Metz, M. Bacher, A. Meinhardt, R. Bucala, R. C. Atkins und H. Y. Lan. Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF): potential role of MIF in regulating glucocorticoid production. *Mol Med*, 4(6):413–424, Jun 1998.
- [197] H. Yao, R. D. York, A. Misra-Press, D. W. Carr und P. J. Stork. 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(14):8240–8247, Apr 1998.
- [198] A. Yatani, K. Okabe, P. Polakis, R. Halenbeck, F. McCormick und A. M. Brown. ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K⁺ channels. *Cell*, 61(5):769–776, Jun 1990.

7 Literaturverzeichnis

- [199] E. Yonish-Rouach, D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi und M. Oren. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352(6333):345–347, Jul 1991.
- [200] M. Zhang, P. Aman, A. Grubb, I. Panagopoulos, A. Hindemith, E. Rosengren und H. Rorsman. Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. *FEBS Lett*, 373(3):203–206, Oct 1995.
- [201] R. Zhao, K. Gish, M. Murphy, Y. Yin, D. Nottermann, W. H. Hoffmann, E. Tom, D. H.Mack und A. J. Levine. *Genes Dev.*, 14:981– 993, 2000.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Corinna Schlander
Geburtsdatum	23. Oktober 1980
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

Sep. 1987–Juli 1991	Besuch der Grundschule in München
Sep. 1991–Juli 2000	Besuch des Gymnasium Olching
Juli 2000	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Okt. 2000–Aug. 2006	vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Aug. 2002	Absolvierung der ärztlichen Vorprüfung
Okt. 2002–Okt. 2006	Klinisches Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 2003	Erstes Staatsexamen
Aug. 2005	Zweites Staatsexamen
Okt. 2005–Feb. 2006	PJ-Tertial Chirurgie, Spital Menziken, Lehrkrankenhaus der Universität Bern, Schweiz
Feb. 2006– Mai 2006	PJ-Tertial Innere Medizin, Krankenhaus München-Schwabing, Lehrkrankenhaus der LMU
Mai 2006–Sep.2006	PJ-Tertial Gynäkologie, Klinikum Starnberg, Lehrkrankenhaus der LMU
Okt. 2006	Drittes Staatsexamen

Dissertation

Juli 2003–Dez. 2005	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. Med. Michael Hallek und Dr. Med. Günter Fingerle-Rowson
---------------------	---