

**Untersuchungen zum unkonventionellen
Sekretionsweg des Zytokins
Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor
(MIF)**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der
Universität Stuttgart genehmigte Abhandlung zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Oliver Flieger

Hauptberichter: Prof. Dr. K. Pfizenmaier

Mitberichter: Prof. Dr. J. Bernhagen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2002

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik Universität Stuttgart

2002

Herzlichen Dank!

..... an Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier für die Übernahme des Hauptreferats.

..... an Prof. Dr. Jürgen Bernhagen vom Institut für Biochemie der RWTH Aachen für die Übernahme des Ko-Referats und während seiner Zeit am IGVT für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion am IGVT, für die Themenstellung, für die Betreuung, Motivation und Geduld, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

..... an Prof. Dr. Herwig Brunner für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik.

..... an Prof. Dr. Peter Scheurich, Dr. Annett Burzlaff und Eva Behrle vom SFB 495 für die Ermöglichung der mikroskopischen Aufnahmen und ihre Hilfsbereitschaft.

..... an Nina Botzenhart für die Durchführung der Experimente zur Sekretion in HeLa Zellen im Rahmen ihrer Studienarbeit und Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft.

..... an Matthias Rottmann und Dr. Kai Sohn vom Fraunhofer-IGB und PD Dr. Walter Nickel vom BZH der Universität Heidelberg für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen.

..... an alle Mitglieder des IGVT und des Fraunhofer-IGB für die freundliche Arbeitsatmosphäre und für viele Stunden mit lachenden und weinenden Augen.

..... an Susanne und meine Eltern für ihre immerwährende Unterstützung.

1 Inhalt

1	Inhalt	1
	Abkürzungen.....	4
2	Zusammenfassung	6
3	Summary.....	8
4	Einleitung.....	10
4.1	Struktur und enzymatische Aktivität von MIF	11
4.2	MIF als Zytokin	13
4.2.1	MIF ist ein wichtiges T-Zell-Zytokin.....	14
4.2.2	Makrophagen sind wichtige Zielzellen von MIF	14
4.2.3	Makrophagen sind MIF-Produzenten.....	14
4.2.4	MIF besitzt eine regulatorische Rolle für Glucocorticoide.....	15
4.3	MIF als Hormon und neuroendokriner Faktor	15
4.4	Molekulare Mechanismen von MIF	17
4.4.1	Der MIF-Rezeptor.....	17
4.4.2	MIF-Signaling über den MAPK/ERK-Weg	18
4.4.3	MIF inhibiert die p53-Tumorsuppressor-Aktivität	18
4.4.4	MIF interagiert direkt mit JAB1.....	19
4.4.5	COX-2 reguliert die MIF-Expression	20
4.5	Die Rolle von MIF bei Krankheiten	20
4.5.1	Bakterielle Sepsis und septischer Schock	20
4.5.2	Akute und chronische Entzündungskrankheiten.....	21
4.5.3	Zellproliferation, Angiogenese und Tumorigenese.....	23
4.6	Expression und Sekretion von MIF	24
4.7	Sekretorische Proteine ohne Signalsequenz	28
4.8	Alternative Sekretionswege	30
4.8.1	Interleukin-1 β wird über einen Zwei-Schritt-Mechanismus exportiert.....	30
4.8.2	Der Export von FGF wird von Cardenoliden inhibiert.....	32
4.8.3	Galektin-3 verlässt die Zelle mittels Ectocytose.....	32

4.8.4	MRP8/14 werden entlang des Tubulin-Netzwerks transportiert..	34
4.8.5	Der Import von VP22 erfordert ein intaktes Aktin-Cytoskelett.....	35
4.9	Zielsetzung	35
5	Material und Methoden	36
5.1	Medien, Puffer und Lösungen	36
5.2	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	37
5.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
5.2.2	Chemikalien.....	38
5.2.3	Enzyme.....	40
5.2.4	Antikörper	40
5.2.5	Modulatoren der Proteinsekretion.....	42
5.3	Zelllinien und stabile Transfektion.....	43
5.3.1	Zelllinien und Kulturmedien	43
5.3.2	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	44
5.4	Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	45
5.4.1	Immunfluoreszenzfärbung	45
5.4.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie.....	46
5.5	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	46
5.5.1	Sandwich-ELISA.....	46
5.5.2	SDS-PAGE	51
5.5.3	Western Blotting	54
5.5.4	<i>Pulse-Chase</i> -Markierung mit ³⁵ S	55
5.5.5	Immunpräzipitation	56
5.5.6	Autoradiographie	57
5.5.7	Deglykosylierung mit Peptid: N-Glycosidase F	57
5.6	Molekularbiologische Methoden	58
5.6.1	Plasmidpräparation.....	58
5.6.2	Klonierung des HA-MIF-Fusionsproteins	58
5.6.3	<i>In vitro</i> Translation	59
6	Ergebnisse.....	62
6.1	N-Glykosylierung von MIF.....	62
6.2	<i>In vitro</i> Translation in Mikrosomen	63

6.3	Sekretion von HA- <i>getaggt</i> em MIF in HeLa	65
6.3.1	Stabile Transfektion in HeLa.....	66
6.3.2	Sekretion von endogenem MIF in HeLa-Zellen	66
6.3.3	Sekretion von HA-MIF in HeLa _{HA-MIF} 42.1	67
6.4	Intrazelluläre Lokalisation von MIF.....	69
6.5	Kinetik des Exports von humanem MIF	72
6.6	Einfluß von Inhibitoren des klassischen Sekretionswegs.....	73
6.7	Tubulin-abhängige Sekretion von MIF	76
6.7.1	Einfluß von Inhibitoren des Tubulin-Systems.....	76
6.7.2	MAP 1A als möglicher Interaktionspartner von MIF.....	77
6.8	Einfluß von Inhibitoren von ABC-Transporterproteinen.....	80
7	Diskussion.....	85
7.1	MIF tritt nicht in den ER-Golgi-Weg ein.....	86
7.2	MIF wird nicht aus HeLa-Zellen sezerniert.....	87
7.3	Intrazelluläre Lokalisation von MIF.....	89
7.4	Kinetik des MIF-Exports.....	90
7.5	Klassische Inhibitoren stimulieren die alternative Sekretion	91
7.6	MIF-Sekretion erfordert ein intaktes Tubulin-Netzwerk	93
7.7	ABC-Transporter-vermittelter Export von MIF.....	96
8	Literaturverzeichnis.....	99

Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACTH	Adenocorticotrophes Hormon
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
CCCH	Carbonylcyanid-chlorophenylhydrazon
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
ddH ₂ O	Doppeltdestilliertes Wasser
Dex	Dexamethason
dFCS	Dialysiertes FCS
DIDS	<i>4,4'-Diisothiocyanatostilbene- 2,2'-disulfonic acid disodium salt</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Allergische Encephalitis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMEM	Minimum Essential Medium mit Earl's Salzen
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gravitationskonstante
GIF	Glykosylierungs-Inhibitionsfaktor
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HS	Hitzeschock (42°C)

huMIF	Humanes MIF
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
L-14	Lektin-14 (Galektin-1)
LLS	<i>leaderless secretory protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyten-chemotaktisches Protein 1
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MIF	Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor
min	Minute
MIP-1 α	Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 α
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP8/14	<i>myeloid-related protein 8/14</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MS	Multiple Sklerose
muMIF	Murines MIF
OD ₄₅₀	optische Dichte bei 450 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
rMIF	rekombinantes MIF
RT	Raumtemperatur
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
SPEA	<i>Streptococcal pyrogenic exotoxin A</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Triethylmethyl-ethyl-diamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor- α
TSH	Thyroid-stimulierendes Hormon
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute

2 Zusammenfassung

Der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor (MIF) wurde erst kürzlich als Hormon, proinflammatorisches Zytokin und Glucocorticoid-Regulator wiederentdeckt. MIF spielt eine wichtige Rolle beim septischen Schock, akuten und chronischen Entzündungskrankheiten sowie bei der natürlichen und der erworbenen Immunantwort. Obwohl MIF keine hydrophobe N-terminale Signalsequenz besitzt, wird es aus Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, bestimmten Epithelzellen und endokrinen Zellen nach spezifischer Stimulation sezerniert. In der vorliegenden Arbeit wurden die biochemischen Eigenschaften von MIF als *leaderless secretory*-Protein untersucht, die subzelluläre Lokalisation in Monozyten beschrieben und der Export von MIF über einen alternativen, nicht-klassischen Sekretionsweg charakterisiert.

Intrazelluläres und nach LPS-Stimulation exportiertes MIF werden weder in typischen murinen noch in humanen immunregulierten Zellen N-glykosyliert, obwohl das Protein zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen besitzt. Nach *in vitro*-Translation wird MIF weder in Mikrosomen translokalisiert noch dort posttranslational modifiziert. MIF scheint also nicht in den klassischen ER-Golgi-Sekretionsweg einzutreten.

Der Export von neusynthetisiertem sowie vorgeformtem MIF folgt einer ähnlichen Kinetik. Diese bewirkt eine schnell einsetzende Ausschüttung bereits 2 h nach LPS-Stimulation, die für 7-8 h anhält. LPS scheint die MIF-Sekretion sowohl über die Transkription/Translation von MIF als auch über einen posttranslationalen Mechanismus zu stimulieren.

In Immunzellen colokalisiert MIF nicht mit bekannten Markern des klassischen Sekretionsweges. Eine partielle Colokalisation scheint es nur mit dem LLS-Protein PDI zu geben, das trotz seiner vorherrschenden Lokalisation im ER auch extrazellulär nachgewiesen wurde.

Inhibitoren des klassischen Sekretionsweges wirken eher stimulierend als inhibierend auf den MIF-Export, der bei der Ausschüttung von vorgeformtem MIF einem energie-unabhängigen Mechanismus folgt. Es scheint ausgeschlossen, dass MIF über *recycling endosomes* aus der Zelle transportiert wird. Da aber die Sekretion von MIF durch einen Stimulator der Exocytose verstärkt und durch 18°C-Temperaturblock reduziert wird, assoziiert MIF möglicherweise mit Vesikeln des späten sekretorischen Transportweges.

Nocodazol, ein Inhibitor der Tubulin-Polymerisation, reduziert den MIF-Export über einen weiten Konzentrationsbereich, was darauf hinweist, dass für den Export ein intaktes Tubulin-Netzwerk notwendig ist. Andere Inhibitoren, die das Tubulin-Netzwerk der Zelle manipulieren, beeinflussen den MIF-Export dagegen nicht. Somit scheint Nocodazol spezifisch auf den alternativen Export von MIF aus der Zelle zu wirken.

Am Export von MIF sind ABC-Transporterproteine beteiligt, die unabhängig von einer konstanten Energieversorgung durch die Zelle niedermolekulare Stoffe, Peptide und Proteine über Membranen transportieren können. Die ABCA1-Transporter-Inhibitoren Glyburid und Probenecid reduzieren den MIF-Export konzentrationsabhängig um 70-95 %, ohne die Ausschüttung des klassisch sezernierten proinflammatorischen Zytokins TNF- α zu beeinflussen. Inhibitoren, die auf andere Subfamilien der ABC-Transporter wirken, haben keinen Einfluss auf den MIF-Export, was auch hier auf einen MIF-spezifischen Mechanismus hinweist.

Mit der Identifikation niedermolekularer Substanzen, die den MIF-Export inhibieren, könnten alternative Sekretionswege als bedeutende Zielstrukturen für den Einsatz von Therapeutika dienen. Nocodazol, Glyburid und Probenecid könnten potenzielle Basisstrukturen für das rationale Design von *small molecule drugs* liefern. Über den identifizierten Mechanismus können zukünftig assoziierte Proteine dieses Transportweges als weitere mögliche MIF-basierte Pharma-*targets* identifiziert und charakterisiert werden.

3 Summary

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) has recently been rediscovered as a hormone, proinflammatory cytokine and counterregulator of glucocorticoid action. MIF plays a pivotal role during septic shock, acute and chronic inflammatory diseases and during innate and acquired immunity. Although MIF lacks a classical leader sequence, it is specifically secreted from monocytes, macrophages, T lymphocytes, epithelial cells and certain endocrine cells. In the present studies, we aimed to examine the biochemical properties of MIF as a leaderless secretory protein, to reveal the subcellular localization of MIF in monocytes and to characterize the export of MIF via an alternative non-classical secretory pathway.

Upon stimulation with LPS, neither intracellular nor exported MIF from typical immune-regulated murine macrophages or human monocytes was found to contain N-linked glycosylation that could be removed by PNGase F. In addition, *in vitro* translation of MIF in the presence of microsomes produces no detectable post-translational modification. Thus, MIF appears to leave the cell via an alternative secretory pathway.

Export of *de novo* synthesized and preformed MIF follows similar kinetics. Upon stimulation with LPS, MIF was recovered from the medium as early as 2 hrs after stimulation and secretion sustained for 7-8 hrs. The amount of secreted MIF differs from large amounts for preformed MIF to a rather low rate for *de novo* synthesized MIF, suggesting that LPS stimulates MIF translation as well as involving a post-translational mechanism of stimulating MIF export.

In immune cells, MIF does not colocalize with marker proteins of the classical secretory pathway. Possible partial colocalisation was only observed with PDI, which could be due to the fact that the leaderless secretory protein PDI, besides

its typical localisation in the ER, has been shown to be exported to the cell surface.

Inhibitors of the classical secretory pathway rather enhance than reduce MIF export from monocytes. Also, secretion of preformed MIF seems to be independent of a continuous cellular energy source. MIF secretion is insensitive to brefeldin A and Monensin and does appear to use recycling endosomes to exit the cell. However, as MIF export is enhanced by calcium ionophore A23187, that stimulates exocytosis, and reduced by incubation at 18°C, an association of MIF with late secretory vesicles could be possible.

The export of MIF was reduced by nocodazole, an inhibitor of tubulin polymerization, over a wide concentration range, suggesting that this alternative mechanism of MIF release requires an intact tubulin network. As other tubulin network perturbing agents had no impact, nocodazole appears to act specifically on MIF release.

MIF export involves proteins of the ABC transporter superfamily. These proteins translocate a wide variety of substrates including sugars, amino acids, metal ions, peptides and proteins across extra- and intracellular membranes. Glyburide and probenecide, two inhibitors of ABCA1 transporters, reduce MIF export in a dose-dependent fashion between 70-95%, whereas TNF- α secretion is not reduced. Again, inhibitors of other ABC subfamilies do not reduce MIF export, indicating a distinct mechanism of alternative MIF release.

The identification of low molecular weight inhibitors of MIF export reveals alternative secretory pathways as valuable targets for the development of therapeutics. Nocodazole, glyburide and probenecide, as well as novel, yet unidentified proteins associated with this alternative pathway, could serve as lead structures in the development of small molecule drugs for an anti-MIF therapy.

4 Einleitung

Bereits im Jahre 1966 identifizierten Bloom und Bennett (Bloom, 1966) sowie David (David, 1966) unabhängig voneinander den Makrophagen-migrations-inhibierenden Faktor (*macrophage migration inhibitory factor*, MIF) als eines der ersten Zytokine, das jemals entdeckt wurde. MIF wurde ursprünglich beschrieben als eine lösliche, von T-Zellen gebildete Substanz, die die ungerichtete Migration von Makrophagen inhibierte. In den folgenden Jahren wurde die MIF-Aktivität mit der Hypersensitivität vom Spättyp (*delayed-type hypersensitivity*, DTH) und der Phagozytose von Makrophagen in Zusammenhang gebracht (David, 1966) (Nathan, 1971) (Nathan, 1973). Die molekulare Charakterisierung von MIF blieb zunächst unvollständig und widersprüchlich, da die Aufreinigung lange Zeit nicht möglich war. Angaben über Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt wiesen eine große Varianz auf, die sowohl durch die postulierte Existenz mehrerer MIF-Spezies als auch durch Verunreinigungen und Aufreinigungsartefakte erklärt wurden (Burmeister, 1986) (Weiser, 1981). Erst 1989 gelang die Klonierung von humanem MIF aus T-Zellen (Weiser, 1989) und 1993 die Klonierung vom murinem MIF aus der Hypophysen-Zelllinie AtT-20 (Bernhagen, 1993). Mit der rekombinanten Expression von biologisch aktivem MIF in *E. coli* im Jahre 1994 (Bernhagen, 1994b) begann die Aufklärung von Struktur, Aktivität und biologischen Eigenschaften. Eine Beteiligung von MIF an einer Vielzahl entzündlicher und immunvermittelter Krankheiten konnte daraufhin nachgewiesen werden. Wegen seiner vielzähligen, für ein Zytokin ungewöhnlichen Eigenschaften wurden für MIF im Laufe der Jahre die Begriffe „Interleukin-0“, „Cytozym“, „sezerniertes Enzym“, „Redoxkin“ oder „*most interesting factor*“ geprägt.

4.1 Struktur und enzymatische Aktivität von MIF

Humanes MIF besteht aus 115 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 12476.3 Da, wobei das N-terminale Methionin prozessiert wird. MIF ist in der Evolution stark konserviert, denn MIF-Homologe existieren bei Pflanzen, Nematoden und Vertebraten (Swope, 1998). Auf Aminosäureebene sind humanes und murines MIF 88.7% identisch, zwischen huMIF und seinem *C. elegans*-Homolog bestehen immerhin noch 33% Identität (Swope, 1998) (Fingerle-Rowson, 2001). MIF weist strukturelle Ähnlichkeiten zu den bakteriellen Enzymen 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat-Isomerase (CHMI) (Subramanya, 1996) und 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (4-OT) (Suzuki, 1996b) auf. MIF besitzt keine N-terminale hydrophobe Signalsequenz, wird jedoch spezifisch nach Stimulation aus Zellen sezerniert (Weiser, 1989) (Bernhagen, 1994b) (Calandra, 1994). MIF scheint über einen nichtklassischen unkonventionellen Sekretionsweg aus der Zelle transportiert zu werden, wie zum Beispiel Interleukin-1 β (Rubartelli, 1990), FGF-1 (Jackson, 1992) und FGF-2 (Mignatti, 1992). Humanes MIF wird als einzelnes funktionelles Gen exprimiert und nur ein einziges mRNA-Transkript wurde aus verschiedensten Geweben isoliert. Zu den Konsensussequenzen, die möglicherweise an der Transkriptionsregulation des MIF-Gens beteiligt sind, gehören ein Sequenzmotiv, welches an der Basalexpression des Protoonkogens *c-fos* beteiligt ist, ein SP-1 und ein AP-2 Motiv, ein cAMP *responsive element* (CRE), ein Cytokin-1 (CK-1) Motiv, eine NF κ B-Bindestelle und ein mögliches *negative glucocorticoid responsive element* (nGRE). Diese Elemente spiegeln sowohl die Zytokinaktivität, als auch die Hormon- und Glucocorticoid-antagonistische Funktion wieder (Metz, 1997) (Bernhagen, 1994b).

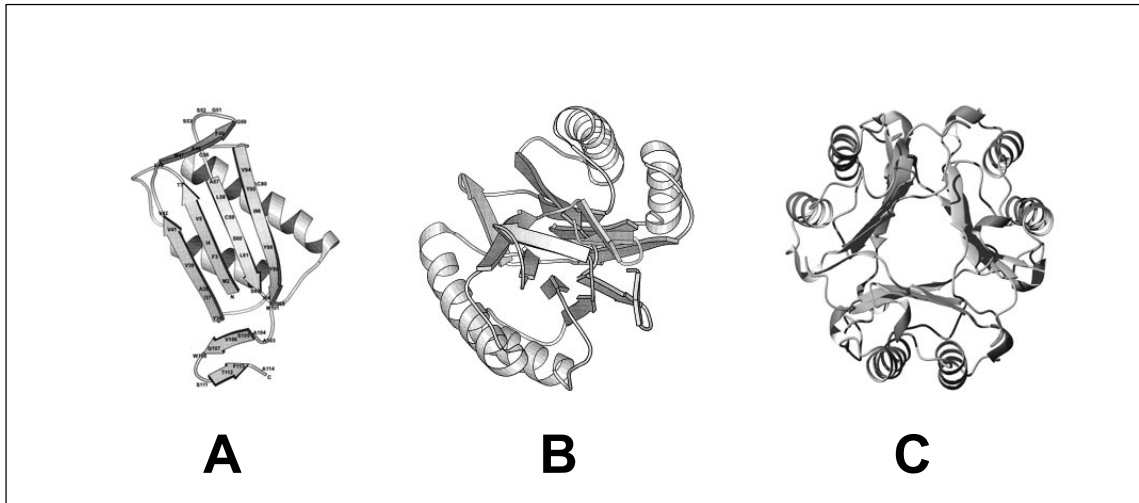


Abb. 1: Dreidimensionale Struktur von huMIF. A, Monomer B, Dimer C, Trimer. Die Abbildungen wurden mit dem Programm MOLSCRIPT erstellt (Kraulis, 1991).

Über den Oligomerisierungsstatus von MIF liegen bislang nur widersprüchliche Daten vor. Während Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass MIF als Trimer vorliegt (Kato, 1996) (Sugimoto, 1996) (Sun, 1996), wurde mittels NMR das Vorliegen eines Dimers bestimmt (Mühlhahn, 1996). *Cross-linking*-Studien ergaben, dass MIF bei physiologischen Konzentrationen als Mischung aus Monomer, Dimer und Trimer vorliegt, wobei die Monomer- und Dimer-Form vorherrschen (Mischke, 1998).

Neben den Eigenschaften, die für ein Zytokin charakteristisch sind, wurden für MIF auch mehrere Enzymaktivitäten beschrieben. MIF besitzt D-Dopachrom-Tautomeraseaktivität und katalysiert die Umwandlung des nicht-physiologischen Substrats D-Dopachrom zu DHICA (Rosengren, 1996). Zu den physiologischen Substraten gehören möglicherweise 3,4-Dihydroxyphenylaminchrom und Norepinephrinchrom, toxische Quinonprodukte der Catecholamine 3,4-Dihydroxyphenylamin und Norepinephrin (Matsunaga, 1999). Eine genaue Zuordnung der Substrate zur katalytischen Aktivität konnte jedoch nicht belegt werden.

Über seine Phenylpyruvat-Tautomeraseaktivität katalysiert MIF die Keto-Enol-Isomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat und Pyruvat, beides Abbau-Produkte von Phenylalanin und Tyrosin (Rosengren, 1997).

Über seine Thiol-Protein-Oxidoreduktaseaktivität katalysiert MIF die Reduktion von Disulfidgruppen in Polypeptiden wie Insulin und 2-Hydroxyethyl-disulfid (HED) (Mischke, 1997) (Kleemann, 1998a) (Kleemann, 1998b) (Kleemann, 1999). Zur selben Enzymklasse gehören unter anderem Thioredoxin (Takahashi, 1996), Glutaredoxin (Holmgren, 1979) und Proteindisulfid-isomerase (PDI) (Puig, 1994). Mit Thioredoxin hat MIF außerdem das Fehlen einer hydrophoben N-terminalen Signalsequenz gemeinsam (Wollman, 1988). Obwohl die katalytischen Zentren der Enzymaktivitäten sehr gut untersucht wurden, konnte eine Zuordnung der katalytischen Eigenschaften zu physiologischen oder pathophysiologischen Funktionen von MIF noch nicht etabliert werden (Kleemann, 1998a) (Kleemann, 1998b) (Kleemann, 1999). Einzig die Glucocorticoid-*Overriding*-Aktivität (siehe Abschnitt 1.2) scheint eher mit der Redox- als mit der Tautomeraseaktivität zusammenzuhängen (Kleemann, 1999) (Kleemann, 2000a) (Bendrat, 1997). In neueren Untersuchungen wurde erstmals mit *proliferation-associated gene* (PAG) ein Protein als Substrat der MIF-Enzymaktivität beschrieben (Jung, 2001).

4.2 MIF als Zytokin

Lange bevor der Name Zytokin für lösliche Mediatoren des Immunsystems geprägt wurde, erkannten Bloom und Bennett sowie David 1966, dass ein löslicher, von stimulierten T-Zellen gebildeter Stoff die Immunreaktion der Hypersensitivität vom Spättyp (*delayed-type hypersensitivity*, DTH) vermittelt (Bloom und Bennett, 1966) (David, 1966). *In vitro* wurde diese Aktivität dem Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktor (MIF) zugeschrieben. In den folgenden Jahren wurde die Wirkung von MIF auf Makrophagen genauer untersucht und neben der Migrationsinhibition auch Aktivierung von Oberflächenadhäsion und Phagozytose festgestellt (Nathan, 1971) (Nathan, 1973). Die heute bekannten Eigenschaften von MIF gehen jedoch weit über seine namensgebende Funktion hinaus.

4.2.1 MIF ist ein wichtiges T-Zell-Zytokin

Die Stimulation von primären T-Zellen durch mitogene oder antigenspezifische Reize induziert die Bildung von MIF-mRNA und MIF-Protein sowie dessen Ausschüttung (Calandra, 1998). MIF selbst wiederum stimuliert die Proliferation von T-Zellen (Bacher, 1996). Bacher und Kollegen zeigten außerdem einen Zusammenhang zwischen MIF und immunsuppressiv wirkenden Glucocorticoiden bei T-Zellen. Physiologische Glucocorticoid-Konzentrationen stimulieren die MIF-Sekretion aus T-Zellen. Umgekehrt ist rekombinantes MIF in der Lage, die Proliferationsinhibition und die Hemmung der Zytokinsynthese bei stimulierten T-Zellen, die mit hohen Glucocorticoiddosen behandelt wurden, aufzuheben.

4.2.2 Makrophagen sind wichtige Zielzellen von MIF

MIF wirkt überwiegend proinflammatorisch auf Makrophagen und induziert die Bildung von $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-1, -6 und -8. Bei Costimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ induziert MIF die Bildung von Stickstoffoxid (NO), NO-Synthase und Superoxidanion-Radikal (O_2^-) (Calandra, 1994) (Calandra, 1995) (Bernhagen, 1994b) (Jüttner, 1998) (Swope, 1998). MIF aktiviert Makrophagen zur Abtötung des intrazellulären Parasiten *Leishmania major* (Jüttner, 1998) (Xu, 1998). Ferner scheint MIF die Phagozytose in Makrophagen in autokriner und parakriner Weise zu stimulieren (Onodera, 1997). Aber auch anti-inflammatorische Effekte von MIF wurden beschrieben. Durch direkte Interaktion von MIF mit dem cytosolischen Protein JAB1 werden beispielsweise die anti-inflammatorischen und zellzyklus-inhibierenden Eigenschaften von JAB1 aufgehoben (Kleemann, 2000b).

4.2.3 Makrophagen sind MIF-Produzenten

Während MIF lange Zeit als reines T-Zell-Produkt, das auf Makrophagen wirkt, angesehen wurde, konnten Calandra und Kollegen 1994 zeigen, dass MIF sowohl in ruhenden Makrophagen-Zelllinien als auch in unstimulierten primären Monozyten vorgeformt in großen Mengen vorliegt (Calandra, 1994). Aus diesen Zellen wird MIF nach Stimulation mit Tumor-Nekrose-Faktor (TNF),

Interferon- γ (IFN- γ), *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) oder Lipopolysaccharid (LPS) ausgeschüttet (Calandra, 1994) (Bernhagen, 1998) (Calandra, 1998). Dass MIF als Antwort auf proinflammatorische Stimuli in einer glockenförmigen dosisabhängigen Kurve ausgeschüttet wird, könnte auf die Existenz einer negativen Rückkopplungsschleife hinweisen. In der Tat hemmen IL-10 und *activated protein C* (APC) die Ausschüttung von MIF (Jüttner, 1998) (Schmidt-Supprian, 2000).

4.2.4 MIF besitzt eine regulatorische Rolle für Glucocorticoide

Die Tatsache, dass bei sehr niedrigen Glucocorticoid-Konzentrationen (10^{-10} – 10^{-14} M) die MIF-Ausschüttung aus Monozyten/Makrophagen (Calandra, 1995), aus aktivierten T-Zellen (Bacher, 1996) sowie aus Hypophysenzellen (J. Bernhagen, T. Calandra, unpubliziert) stimuliert wird, MIF gleichzeitig über immunsuppressiv wirkende Hormone wie CRH (Nishino, 1995) und Cortison (Calandra, 1995) in der Hypophyse ausgeschüttet wird, exogenes MIF aber die immunsuppressive Aktivität der Glucocorticoide aufheben kann, scheint zunächst paradox. Bei näherer Betrachtung stellt sich jedoch heraus, dass diese Glucocorticoid-antagonistische Wirkung wahrscheinlich einen wichtigen Mechanismus darstellt, bei dem eine funktionierende Immunantwort der Wirts bei Stress, schwerem Trauma oder lebensbedrohlichen Infektionen aufrecht erhalten wird (Fingerle-Rowson und Bucala, 2001).

4.3 MIF als Hormon und neuroendokriner Faktor

Erste Hinweise, dass MIF nicht nur ein klassisches T-Zell- und Makrophagen-Zytokin ist, sondern neben der Enzymaktivität auch hormonelle und neuroendokrine Funktionen erfüllt, ergaben sich, als MIF in Hypophysenzellen entdeckt wurde (Bernhagen, 1993) (Bernhagen, 1994a). MIF wird konstitutiv in corticotropen und thyrotropen Zellen exprimiert und colokalisiert in sekretorischen Vesikeln mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und mit Thyrotropin (TSH) (Bernhagen, 1993) (Nishino, 1995). Die MIF-Ausschüttung aus diesen Zellen wird sowohl durch LPS als auch durch *corticotropin releasing hormone* (CRH) stimuliert. MIF verhält sich daher hier wie andere

Stresshormone aus dem Regulationsnetzwerk des Hypothalamus-Hypophysen-Systems (*hypothalamus-pituitary-adrenal axis*, HPA-Achse). Während systemischen Infektionen oder bei Stress scheint die Hypophyse die hauptsächliche Quelle von MIF im Serum von Mäusen zu sein (Bernhagen, 1993). Injiziert man Ratten LPS intraperitoneal, nimmt der MIF-Proteingehalt in der Hypophyse stark ab gefolgt vom Anstieg im Serum und einem langsameren, Zeit-abhängigen Anstieg der MIF-mRNA-Menge in der Hypophyse (Bacher, 1997b). Auch im gesunden Menschen werden MIF-Konzentrationen von 1-15 ng/ml im Serum gefunden. Dieser für ein proinflammatorisches Zytokin sehr hohe Wert, der eher im Bereich von endokrinen Hormonen liegt, wirft die Frage auf, ob MIF nicht generell als Hormon wirkt.

MIF wird in Glucose-abhängiger Weise von den β -Zellen des Pankreas sezerniert und stimuliert seinerseits die Insulinsekretion aus diesen Zellen (Waeber, 1997) (Sakaue, 1999) (Waeber, 1999). MIF ist damit das erste bekannte, von β -Zellen ausgeschiedene Protein, das die Insulin-Sekretion positiv reguliert.

MIF wurde außerdem in den reproduktiven Organen der Ratte gefunden, wo es im Testis in Leydig-Zellen lokalisiert ist (Meinhardt, 1996). Allerdings scheinen weder rekombinantes MIF noch neutralisierende MIF-Antikörper *in vitro* auf die Geschlechtshormon-Biosynthese zu wirken. MIF-Protein und MIF-mRNA werden auch in Epithelzellen des Epididymis exprimiert. Von diesen Zellen scheint MIF durch Exocytose entlassen zu werden; MIF kann in diesen Zellen in sekretorischen Vesikeln nachgewiesen werden (Eickhoff, 2001). In der weiblichen Maus findet man MIF in den Ovarien, dem Ovidukt und im Uterus. Das mRNA-Niveau ändert sich mit der Schwangerschaft, was vermuten lässt, dass die MIF-Expression durch endokrine Veränderungen reguliert wird (Suzuki, 1996a). Da sowohl weibliche als auch männliche Mäuse keine Beeinträchtigung ihrer Fortpflanzungsfähigkeit zeigen (Bozza, 1999), muss die Rolle von MIF im Reproduktionstrakt noch genauer untersucht werden.

4.4 Molekulare Mechanismen von MIF

4.4.1 Der MIF-Rezeptor

Üblicherweise werden Rezeptoren von Zytokinen kurz nach der Klonierung des entsprechenden Zytokins entdeckt (Thomson, 1998). MIF wurde im Jahr 1989 kloniert (Weiser, 1989), bis heute wurde jedoch noch kein Rezeptor identifiziert. Versuche, einen MIF-Rezeptor als möglicherweise lösliches, von der Zelloberfläche abgespaltenes Molekül aus dem Urin von Sepsis-Patienten zu isolieren, scheiterten (Lue, 2002). Auch der Versuch, ein Zelloberflächenprotein mit hoher Affinität zu MIF über ein *Two-Hybrid-Screening* zu identifizieren, scheiterte in unserem Labor. Ein intrazellulärer Interaktionspartner von MIF konnte jedoch entdeckt und die Bindung zwischen beiden Proteinen charakterisiert werden (Kleemann, 2000b). Kleemann und Kollegen konnten außerdem nachweisen, dass MIF via Endocytose von Zellen aufgenommen wird und so die Notwendigkeit eines Rezeptors umgangen werden kann. Trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass ein Rezeptor für MIF existiert. Berenson und Kollegen haben bereits 1996 einen Rezeptor für MIF erwähnt (Berenson, 1996). Da es sich dabei jedoch um ein Makrophagen-Gangliosid handelt, das für die Zellmigration notwendig ist und keine molekulare Relation zum Protein, das heute als MIF bekannt ist, besteht, muss diese Studie als beschreibend angesehen werden. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass *glycosylation-inhibiting factor* (GIF) hochaffin an T-Suppressorzellen bindet, was die Existenz eines Rezeptors – obwohl er weder molekular charakterisiert noch kloniert wurde – nahe legt (Sugie, 1997). GIF und MIF haben sehr große Ähnlichkeit in der Struktur, trotzdem wird die funktionelle Homologie kontrovers diskutiert (Mikayama, 1993) (Kato, 1996). Auch das von Bucala vorgeschlagene Modell basiert auf rezeptorvermittelten Signalprozessen und vereint viele der biochemischen und biologischen Aktivitäten von MIF (Bucala, 2000).

4.4.2 MIF-Signaling über den MAPK/ERK-Weg

Einer der ersten Mechanismen, der MIF mit einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade in Verbindung brachte, wurde von Mitchell und Kollegen entdeckt (Mitchell, 1999). Sie zeigten, dass sowohl exogenes rMIF als auch von Zellen sezerniertes MIF die Proliferation ruhender Fibroblasten stimuliert. Dies stand im Zusammenhang mit der Phosphorylierung und Aktivierung der p44/p42 *extracellular signal-related* (ERK1/2)-Subfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). ERK wiederum phosphoryliert und aktiviert die cytoplasmatische Phospholipase A2 (cPLA2), die wiederum die Ausschüttung von Arachidonsäure induziert. Da außerdem gezeigt wurde, dass MIF die suppressiven Effekte von Glucocorticoiden nach TNF-induzierter Arachidonsäure-Ausschüttung überschreiben konnte, war zum ersten Mal eine mechanistische Erklärung der Glucocorticoid-*Overriding*-Aktivität von MIF erbracht.

4.4.3 MIF inhibiert die p53-Tumorsuppressor-Aktivität

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist ein essenzieller Schritt beim Auslösen und Wachstum von Tumoren. Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren. Kürzlich wurde entdeckt, dass MIF p53-induzierten Wachstumsarrest, Seneszenz und Apoptose aufhebt, indem die p53-abhängige Transkriptionsaktivierung unterdrückt wird (Hudson, 1999). MIF-vermittelte Aktivierung von Makrophagen, andererseits, führt zur Ausschüttung von TNF und Stickstoffmonoxid (NO) (Bernhagen, 1994b), was wiederum Apoptose in Makrophagen induziert (Messmer, 1996). Die physiologische Funktion von MIF könnte also der Schutz von Makrophagen vor ihrer destruktiven Maschinerie sein. Unter inflammatorischen Bedingungen könnte MIF dann die p53-Aktivität aufheben und dadurch Gewebsschäden mindern und so lokale Zellproliferation zur Gewebereparatur zu ermöglichen. Die chronische Aufhebung der p53-Aktivität durch MIF könnte in der Folge zur Tumorentstehung beitragen (Hudson, 1999).

4.4.4 MIF interagiert direkt mit JAB1

Parallel zu den Anstrengungen in unserem Labor, über ein *Two-Hybrid-Screening* (THS) (Fields, 1989) einen Oberflächenrezeptor für MIF zu finden, wurde ein THS mit einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek auch auf intrazelluläre Bindungspartner durchgeführt. Ein Klon, der spezifisch mit MIF interagierte, enthielt fast die komplette codierende Sequenz (Aminosäuren 20-335) des humanen JAB1 (Kleemann, 2000b). Das cytosolische Protein *Jun activation domain binding protein 1* (JAB1) – ein Coaktivator des Transkriptionsfaktors AP-1 und ein indirekter Mediator des Zellzyklus – bindet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt an MIF. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass exogenes MIF mittels Endocytose von HeLa Zellen aufgenommen wird und direkt mit einem intrazellulären Bindungspartner interagiert. MIF reguliert die Funktion von JAB1 in negativer Weise. Durch Bindung von MIF an JAB1 wird erstens verhindert, dass JAB1 die AP-1-Transkriptionsaktivität verstärkt und die Expression proinflammatorischer Zytokine auslöst. Zweitens wird die Transkriptionsaktivität von AP-1 über einen alternativen Mechanismus reguliert, indem MIF die JAB1-stimulierte *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)-Aktivität aufhebt. Drittens verhindert MIF durch Stabilisierung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1}, die JAB1-vermittelte Degradation von p27^{Kip1} und damit die Aufhebung des Wachstumsarrests ruhender Zellen. Um diese neuen Erkenntnisse mit den bisherigen, sich teilweise widersprechenden biologischen Eigenschaften von MIF in Einklang zu bringen, wurde von Bucala ein Modell für die besonderen Aktivitäten dieses Zytokins vorgeschlagen (Bucala, 2000). Danach scheint MIF intrazellulär eher anti-inflammatorisch zu wirken und nur extrazellulär eine Rolle als typisches proinflammatorisches Zytokin zu spielen. Zum anderen scheint MIF bei niedrigen Konzentrationen proinflammatorische Effekte über einen noch zu identifizierenden Oberflächenrezeptor auszuüben; bei hohen Konzentrationen jedoch wird MIF endocytotisch aufgenommen, inhibiert JAB1 und somit inflammatorische Effekte und Zellwachstum.

4.4.5 COX-2 reguliert die MIF-Expression

Cyclooxygenase-2 (COX-2), ein proinflammatorisches Enzym, das bei der Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandinen beteiligt ist, scheint bei Prostatakrebs eine wichtige Rolle zu spielen (Gupta, 2000). In einer Studie von Meyer-Siegler (Meyer-Siegler, 2001) wurde gezeigt, dass Inhibition der COX-2-Expression die MIF-Expression unter Beteiligung von NFκB verstärkt. Umgekehrt wurde daraufhin angenommen, dass MIF die COX-2-Expression reguliert. Ein experimenteller Beweis dafür konnte jedoch nicht erbracht werden. Allerdings wurde bei Rheumatoider Arthritis (RA) beobachtet, dass MIF die Aktivität und mRNA-Expression von Phospholipase-2 (cPLA2) und COX-2 verstärkt und Anti-MIF-Antikörper die IL-1β-induzierte cPLA2/COX-2-Aktivität signifikant inhibierten (Sampey, 2001). Beide Studien könnten also auf einen weiteren intrazellulären Mechanismus von MIF hinweisen und eine Verbindung zur MIF-vermittelten p53-Regulation darstellen (Mitchell, 2002).

4.5 Die Rolle von MIF bei Krankheiten

4.5.1 Bakterielle Sepsis und septischer Schock

MIF wird sowohl zentral durch die Hypophyse als auch in der Peripherie von Immunzellen nach Stimulation mit bakteriellen Toxinen, z.B. Lipopolysaccharid, ausgeschüttet (Bernhagen, 1993) (Calandra, 1994) (Bacher, 1997b). Im Mausmodell der experimentellen Endotoxämie führt intraperitoneale LPS-Injektion zum septischen Schock mit nahezu 100%iger Lethalität. Gleichzeitige Gabe von rekombinantem MIF und LPS beschleunigt die Lethalität, während neutralisierende Anti-MIF-Antikörper vor septischem Schock schützen (Bernhagen, 1993). Neuere Untersuchungen mit MIF-*knockout*-Mäusen zeigen, dass diese MIF-defizienten Tiere besser vor septischem Schock geschützt sind (Bozza, 1999).

Zu einer ähnlichen pathophysiologischen Situation kommt es, wenn man in Mäusen durch *E. coli*-Injektion oder *cecal ligation and puncture* (CLP) eine bakterielle Peritonitis erzeugt (Calandra, 2000). Die MIF-Konzentration im Blut ist wieder stark erhöht und die Gabe von Anti-MIF-Antikörpern schützt die

Mäuse vor der tödlichen bakteriellen Peritonitis. Interessanterweise setzt der schützende Effekt der Anti-MIF-Behandlung auch dann noch ein, wenn die Antikörper erst 8 Stunden nach Beginn der Sepsis verabreicht werden.

Auch bei der Immunantwort auf Exotoxine gram-positiver Bakterien scheint MIF eine wichtige Rolle zu spielen (Calandra, 1998). Stimulation von Makrophagen mit *toxic shock syndrome toxin 1* (TSST-1) oder *streptococcal exotoxin A* (SPEA) führt zur Ausschüttung von MIF. In der Maus wiederum verhindern Anti-MIF Antikörper den Tod nach TSST-1-induziertem toxischen Schock.

4.5.2 Akute und chronische Entzündungskrankheiten

In der in Ratten immunologisch induzierten Nierenerkrankung Glomerulonephritis, zeigten Lan und Kollegen (Lan, 1996) (Lan, 1997), dass die MIF-Expression im Endothelium sowie in glomerulären und tubulären Epithelzellen deutlich ansteigt. Die erhöhte MIF-mRNA- und MIF-Protein-Expression geht mit verstärkter Makrophageninfiltration in Glomerulus und Tubulusinterstitium einher.

Auch bei einer akuten Lungenerkrankung des Menschen, dem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), wurden erhöhte MIF-Konzentrationen in Blut und Alveolen gemessen (Donnelly, 1997) (Martin, 1997). Eine wichtige Quelle für MIF sind vermutlich infiltrierende Makrophagen, andere Zelltypen tragen möglicherweise ebenfalls zum MIF-Niveau in der ARDS-Lavage-Flüssigkeit bei. Kultiviert man Immunzellen aus den Alveolen von ARDS-Patienten, führt eine Anti-MIF-Antikörperbehandlung zu reduzierter Sekretion von TNF und IL-8. Rekombinantes MIF wiederum ist in der Lage, die Dexamethason-reduzierte Sekretion von IL-8 zu überschreiben und unterstreicht so seine wichtige Rolle bei ARDS und als wichtiger Antagonist der anti-inflammatorischen Funktion von Glucocorticoiden. Auch die bronchoalveoläre *lavage*-Flüssigkeit aus Asthma-patienten enthält eine höhere MIF-Konzentration als die von Gesunden (Rossi, 1998), was zu der Annahme führt, dass MIF zur Immunantwort der Lunge bei Asthma und möglicherweise auch anderer allergischer Krankheiten beiträgt.

Dass MIF auch eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungskrankheiten spielt, ist am besten für Rheumatoide Arthritis (RA) belegt. In verschiedenen Tiermodellen in Maus und Ratte wurde gezeigt, dass MIF an typischen Entzündungsherden in erhöhter Menge vorliegt und auch in der Synovialflüssigkeit, in die MIF aus T-Zellen, Makrophagen und Synovialzellen sezerniert wurde, nachweisbar ist (Mikulowska, 1997) (Santos, 2001) (Leech, 1998) (Leech, 1999). Mit Hilfe von MIF-Antikörpern gelingt es auch hier, die Immunantwort deutlich zu reduzieren.

Die Entwicklung entzündlicher Darmerkrankungen, scheint ebenfalls von MIF abhängig zu sein (de Jong, 2001). Sowohl in Patienten mit Morbus Crohn als auch in akuten und chronischen Modellen dieser Krankheit in der Maus, wurden erhöhte MIF-Konzentrationen gemessen. Anti-MIF-Antikörper-Behandlung – nicht jedoch Anti-TNF-Behandlung – sowie MIF-*knockout*-Mäuse verhinderten die Entwicklung der Krankheit. Wie in Mäusen mit bakterieller Peritonitis (Calandra, 2000), war die Antikörper-Behandlung auch Stunden nach Beginn der Krankheit noch erfolgreich. Neutralisierende Anti-MIF-Antikörper könnten also sowohl präventiv, als auch therapeutisch eingesetzt werden.

Beim Krankheitsbild der Atherosklerose (Arteriosklerose, AS) konnten Lin und Kollegen in Kaninchen (Lin, 2000) und Burger-Kentischer und Kollegen (Burger-Kentischer, 2002) beobachten, dass in frühen und fortgeschrittenen Läsionen der Gefäßwand eine verstärkte MIF-Expression in vaskulären Endothelzellen, nicht jedoch in glatten Muskelzellen auftritt. Sie konnten außerdem nachweisen, dass MIF die mRNA- und Protein-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Endothelzellen in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise verstärkt. MIF konnte außerdem in AS-Läsionen der Intima und in T-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise findet man in allen AS-Stadien und -Zelltypen Immunreaktivität für MIF und den AP-1-Coaktivator JAB1. Die Daten legen nahe, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Atherogenese spielt und MIF-JAB1-Komplexen eine regulatorische Funktion zukommt.

MIF scheint auch eine Rolle in Patienten mit Multipler Sklerose (MS) zu spielen (Niino, 2000) (Nishihira, 2001) (Bernhagen, 1999). Erhöhte MIF-Konzentrationen wurden im Liquor von Patienten mit konventioneller und optisch-spinaler MS nachgewiesen. Matrixmetalloproteinasen (MMP) tragen bei MS zur Pathophysiologie bei, indem sie die Basalmembran der Blut-Gehirn-Schranke aufbrechen und dadurch die Migration von Immunzellen erleichtern, die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen, membranständige proinflammatorische Zytokine – z.B. TNF – abspalten, sowie die Myelinscheide direkt schädigen (Bar-Or, 1999 und Referenzen darin). In MS-Geweben wurde die erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-3 (Onodera, 2000) sowie von MMP-9 nachgewiesen (Cuzner, 1996). Da MIF in Ratten-Osteoblasten MMP-9/MMP-13 (Onodera, 2002) und in humanen Cholesteatomen MMP-3/MMP-9 (Choufani, 2001) hochreguliert, könnte MIF bei Multipler Sklerose ein wichtiger Mediator von Entzündungsprozessen sein.

4.5.3 Zellproliferation, Angiogenese und Tumorigenese

Eine Reihe von Arbeiten zeigt, dass MIF eine wachsende Bedeutung in Angiogenese und Tumorigenese zukommt. Wie bereits erwähnt, inhibiert MIF die Aktivität des Tumorsuppressorgens p53, wobei eine chronische Inaktivierung durch MIF möglicherweise zur Tumorentstehung beiträgt (Hudson, 1999). In Colonkarzinom-Zellen der Maus stimulieren verschiedene Wachstumsfaktoren die MIF-Expression und Depletion von endogenem MIF resultiert in reduziertem Tumorzellwachstum (Takahashi, 1998). Auch in Epithelzellen des Prostatakarzinoms wurde eine erhöhte MIF-mRNA-Expression im Vergleich zu normalen Prostata-Epithelzellen nachgewiesen (Meyer-Siegler, 1998). Chesney und Kollegen demonstrierten, dass neutralisierende Anti-MIF-Antikörper das ursprüngliche Wachstum von 38C13 B-Zell-Lymphoma-Zellen in Mäusen drastisch reduzierten (Chesney, 1999). Die Autoren zeigten außerdem, dass durch die Anti-MIF-Antikörperbehandlung das Wachstum von Endothelzellen – und nicht etwa der Tumorzellen selber – inhibiert und die Anzahl von Tumorkapillaren reduziert wird. Auch in Maus-Colonkarzinomzellen (Takahashi, 1998) und humanen Melanomzellen

(Shimizu, 1999) inhibiert die Anti-MIF-Antikörperbehandlung die Tumorangio-genese. Yang und Kollegen identifizierten MIF als Angiogenesefaktor in ectopischen humanen Endometriumzellen, die das Wachstum von humanen Herzkranzgefäß-Endothelzellen (*human coronary artery endothelial cells*, HCAEC) unterstützen (Yang, 2000).

4.6 Expression und Sekretion von MIF

MIF wird in Mäusen konstitutiv in Leber, Milz, Nieren und Gehirn exprimiert, kann aber auch in Zelllinien humanen und murinen Ursprungs nachgewiesen werden (Calandra, 1994). Bacher und Kollegen wiesen nach LPS-induziertem endotoxischem Schock in Nagern MIF durch *in situ*-Hybridisierung in Haut, Leber, Lunge, Milz, Nebenniere und Niere nach (Bacher, 1997a) und Nishino und Kollegen wiesen MIF in der Hypophyse sowie in der Hypophysenzelllinie AtT-20 nach (Nishino, 1995).

In den beschriebenen Zellen bzw. Geweben hat MIF eine nachgewiesene biologische Funktion. Man findet jedoch MIF auch in einer ganzen Reihe von Zellen, in denen seine Funktion noch weiterer Aufklärung bedarf, so zum Beispiel in der B-Zelllinie BuB1 (Wymann, 1999), in humanen vaskulären Endothelzellen (Nishihira, 1998) (Lin, 2000), in β -Pankreaszellen (Waeber, 1997), in der Prostata (Meyer-Siegler, 1998), in Leydigzellen des Testis (Meinhardt, 1996) sowie in dendritischen Zellen (Morelli, 2001).

Tab. 1: Expression von MIF in verschiedenen Zelllinien (aus Calandra, 1994; Waeber, 1997 und A. Braun, pers. Mitteilung)

Zelllinie	Spezies	Herkunft
THP-1	Homo sapiens	Akute monozytische Leukämie
HL-60	Homo sapiens	Akute promyeloide Leukämie
RAW 264.7	Mus musculus	<i>Abelson Leukaemia Virus</i> (A-MuLV)-induzierter Tumor (Makrophagen)
Jurkat	Homo sapiens	Akute T-Zell-Leukämie
K562	Homo sapiens	Chronische myeloide Leukämie
A301	Homo sapiens	T-Lymphoblastom
U937	Homo sapiens	Histiozytisches Lymphom
AtT-20	Mus musculus	Hypophysentumor
NIH/3T3	Mus musculus	Embryonale Fibroblasten
L929	Mus musculus	Bindegewebsfibroblasten
HeLa	Homo sapiens	Cervixkarzinom
N2A	Mus musculus	Neuroblastom
INS-1	Rattus norvegicus	Insulinom

Angaben zum MIF-Gehalt in Zellen variieren von 4 fg pro Zelle in primären T-Zellen und 170 fg pro Zelle in Jurkat-Zellen (Bacher, 1996) bis 0.1-1 pg (Calandra, 1994) bzw. 9.6-16 fg (Sakamoto, 1998) pro Zelle in Makrophagen. Nach Stimulation wird MIF aus der Zelle transportiert und kann in Zellkulturüberständen, im Blutplasma, Liquor oder in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (siehe Tab. 2). Die MIF-Sekretion aus RAW 264.7 Makrophagen ist bei Stimulation mit 1 ng/ml LPS am stärksten und erreicht ihr Maximum nach 12 h (Calandra, 1994). Doch nicht nur LPS verstärkt die MIF-Ausschüttung aus Zellen, auch Dexamethason (Calandra, 1995), proinflammatorische Zytokine wie TNF und IFN- γ (Calandra, 1994), *streptococcal pyrogenic exotoxin A* (SPEA) (Calandra, 1998), *toxic shock syndrom toxin 1* (TSST-1) (Calandra, 1998), PMA (Sakamoto, 1998) (Bacher, 1996) sowie Calciumionophor A23187 (Sakamoto, 1998).

Tab. 2: Stimulierte Sekretion von MIF in das extrazelluläre Milieu.

Milieu	Stimulus	MIF-Konzentration (ng/ml)
Blutplasma (Ratte)	unstimuliert	15.9±6.5
Blutplasma	Dexamethason	35.0-120.0
Blutplasma	Septischer Schock	6.6-154.4
Blutplasma	Alkohol. Hepatitis	20.7±6.0
Peritonealflüssigkeit	<i>E. coli</i> i.p.	8.2±2.0
Bronchoalveoläre <i>lavage</i> -Flüssigkeit	ARDS	0.3-3.0
Liquor (Ratte)	unstimuliert	15.5±2.5
ZK-ÜS von Peritoneal- Makrophagen	LPS	74.3±10.4
ZK-ÜS von primären T-Zellen	PMA/Ionomycin	10.0
ZK-ÜS von HL-60	unstimuliert	8.0±1.2
ZK-ÜS von Eosinophilen	PMA	0.17
ZK-ÜS von HUVEC	LPS (0.1 ng/ml)	15.2±3.3
ZK-ÜS von BuB1	unstimuliert	3.9-5.2
ZK-ÜS von Synovial- Makrophagen (Ratte)	Adjuvant Arthritis	0.6±0.2
ZK-ÜS von Augenhaut- Melanomzellen	unstimuliert	95.0-150.0

ZK-ÜS: Zellkultur-Überstand

Auf die Existenz verschiedener Sekretionswege könnte die Tatsache hindeuten, dass MIF unstimuliert sowohl im Blut als auch im Liquor in für ein Zytokin ungewöhnlich hohen Mengen nachgewiesen wurde. Möglicherweise verläuft die Basalsekretion über den klassischen Sekretionsweg, während die stimulierbare Sekretion über einen alternativen Sekretionsweg verläuft. Über die physiologische Bedeutung der hohen MIF-Konzentrationen in der gesunden Maus oder im gesunden Menschen kann nur spekuliert werden.

Über die intrazelluläre Lokalisation von MIF ist bisher nur sehr wenig bekannt. In den meisten Geweben und Zellen wurde MIF mittels Immunfluoreszenz als cytoplasmatisches Protein nachgewiesen (Bernhagen, 1993) (Nishihira, 1996), in Neuronen des Gehirns auch eine schwache Färbung im Zellkern detektiert (Ogata, 1998) (Vedder, 2000).

In corticotrophen Hypophysenzellen liegt vorgeformtes MIF in großen Mengen vor und colokalisiert mit ACTH und TSH in sekretorischen Vesikeln (Bernhagen, 1993) (Nishino, 1995). 8 bis 20 h nach LPS-Stimulation wird MIF sowohl aus den vorgeformten *Pools* vollständig aus der Zelle entlassen als auch nach *de novo*-Synthese ausgeschüttet.

In der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 und in den primären β -Zellen der Langerhansinseln colokalisiert MIF in sekretorischen Granulen mit Insulin und reguliert möglicherweise in einem autokrinen Mechanismus die Insulinsekretion (Waeber, 1997).

MIF wird außerdem in Ratten in Leydigzellen des Testis exprimiert und sezerniert (Meinhardt, 1996). Eickhoff und Kollegen konnten kürzlich nachweisen, dass MIF dort nicht nur in Epithelzellen des Epidydimus exprimiert wird, sondern auch in Vesikeln lokalisiert, die sie aus der Epidydimalflüssigkeit isolierten (Eickhoff, 2001). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Epidydimus wiesen zusätzlich darauf hin, dass MIF in diesen Zellen im Cytosol, nicht jedoch im ER oder Golgi-Apparat colokalisiert ist. Die Vesikel, in denen MIF nachgewiesen wurde, scheinen sich von der Apikalmembran abzuschnüüren und in der Lage zu sein, MIF zu den Spermatozoen zu transportieren, wo vesikuläres MIF ebenfalls nachgewiesen wurde.

Die Daten legen nahe, dass MIF in sekretorischen Zellen in Vesikel verpackt wird und nach Verschmelzung mit der Plasmamembran aus der Zelle transportiert wird. Es ist jedoch völlig unklar, ob diese Vesikel Teil des regulierten sekretorischen Weges sind oder zu einer anderen Vesikelpopulation gehören, da MIF – zumindest in Epidydimus-Epithelzellen – nicht über ER und Golgi in diesen Sekretionsweg eintritt. In Makrophagen, den Hauptproduzenten

von MIF in vielen Geweben und bei vielen Krankheiten, könnte möglicherweise ein anderer Mechanismus existieren, da bisher eine Lokalisation in Vesikeln nicht gezeigt werden konnte.

4.7 Sekretorische Proteine ohne Signalsequenz

Sekretorische Proteine besitzen gewöhnlich ein hydrophobes Signalpeptid von 15-25 Aminosäureresten, das am N-terminalen Ende des Vorläufer-Polypeptids lokalisiert und nach dem Transfer über die ER-Membran abgespalten wird (Blobel, 1980). Nach dem von Palade bereits 1975 vorgeschlagenen Modell (Palade, 1975), werden Proteine vom ER in Vesikeln über das *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) und Golgi-Stapel zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert. Von dort gelangen sie in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran (PM), wo sie verschmelzen und ihren Inhalt ins extrazelluläre Milieu entlassen. Auch für andere Zellorganellen – zum Beispiel Mitochondrien, Chloroplasten und Zellkern – besitzen Proteine Signalsequenzen, die sie in das richtige Kompartiment dirigieren. Es wurden jedoch eine Reihe von Proteinen entdeckt, die weder eine N-terminale noch eine interne Signalsequenz besitzen. Dazu gehören sowohl bakterielle Toxine und extrazelluläre Proteasen, der Paarungslockstoff α -Faktor in *S. cerevisiae*, als auch bestimmte Wachstumshormone und Interleukine aus Säugerzellen (Kuchler, 1997).

Proteine mit schwacher N-terminaler Signalsequenz oder vorherrschender intrazellulärer Funktion wurden auch extrazellulär nachgewiesen. Über bioinformatische Methoden wurden bei diesen Proteinen auch interne hydrophobe Signalsequenzen identifiziert (Chou, 2001) (Claros, 1997). Es wird jedoch darüber hinaus eine wachsende Anzahl von Proteinen gefunden, die trotz fehlender hydrophober N-terminaler oder interner Signalsequenz sezerniert bzw. exportiert werden. Von diesen also somit nicht-klassisch sezernierten Proteinen bzw. sekretorischen Proteinen ohne Signalsequenz (engl.: *leaderless secretory (LLS) proteins*), sind IL-1 β , bFGF und Galektin-3 am besten charakterisiert. Gemeinsam ist allen, dass es sich um relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 8-45 kDa handelt, trotz potenzieller N-

Glykosylierungsstellen keine glykosylierten Asparaginreste nachgewiesen wurden und freie Cysteinreste nicht in Disulfidbrücken involviert sind. Diese Eigenschaften legen nahe, dass LLS-Proteine nicht in das ER-Lumen eintreten.

Tab. 3: Sekretorische Proteine ohne Signalsequenz (adaptiert und ergänzt nach Kuchler, 1997).

Annexin 1	Interleukin-1-Rezeptor Antagonist
<i>β-Galactoside binding protein</i>	Koagulations-Faktor XIII
<i>Ciliary neurotrophic factor</i>	<i>Mammary-derived growth inhibitor</i>
<i>Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II</i>	MIF (Bernhagen, 1994a)
FGF-1 (aFGF)*	MRP8/14 (Rammes, 1997)
FGF-2 (bFGF)*	Parathymosin
FGF-9 (<i>glia activating factor</i>)	<i>Plasminogen activator inhibitor 2</i> (Ritchie, 1998)
FGF-16* (Miyake, 1998)	<i>Platelet-derived endothelial cell growth factor</i>
Galektin-1 (BHL, Galaptin, L-14)	Prothymosin
Galektin-3 (CBP-30, CBP-35, Mac-2, L-29)*	Rhodanese
HIV-1 Tat Protein	SK-1 (Ancellin, 2002)
HMG1	Thioredoxin (ADF)
Interleukin-1	Transglutaminase
Interleukin-1 <i>converting enzyme</i> (ICE)	VP22 (Elliott, 1997)

*Zur Nomenklatur für FGF siehe (Burgess, 1989) und für Galektin siehe (Barondes, 1994a)

4.8 Alternative Sekretionswege

4.8.1 Interleukin-1 β wird über einen Zwei-Schritt-Mechanismus exportiert

Interleukin-1 existiert in zwei Isoformen α und β mit unterschiedlichem pI, wobei Interleukin-1 β (pI=7; IL-1 α mit pI=5) die häufigste extrazelluläre Form ist. IL-1 β wird als biologisch inaktives, 33 kDa intrazelluläres Vorläuferprotein synthetisiert, das proteolytisch in eine 17 kDa aktive Form gespalten wird. Beide Isoformen besitzen keine Signalsequenz. Ein erster Versuch, den Export von IL-1 β zu charakterisieren, scheiterte, da Hamster-Fibroblasten (CHO) nach stabiler Transfektion mit IL-1 β -cDNA kein IL-1 β sezernierten (Young, 1988). Erst zwei Jahre später gelang Rubartelli und Kollegen die teilweise Charakterisierung des Interleukin-1 β -Sekretionsweg (Rubartelli, 1990). IL-1 β wurde nach LPS-Stimulation aus PBMC ausgeschüttet, wobei die Sekretion mit Inhibitoren des klassischen Sekretionswegs, z.B. Brefeldin A, Monensin oder Cycloheximid, nicht inhibiert werden konnte. Interessanterweise wurde auch beim 18°C-Temperaturblock die Sekretion reduziert. Es scheint sich also um einen ER-Golgi-unabhängigen und trotzdem vesikulären Sekretionsweg zu handeln. Einen ersten Hinweis auf einen Sekretionsweg, bei dem ABC-Transporterproteine eine Rolle zu spielen scheinen, erhielten Hamon und Kollegen (Hamon, 1997), als sie feststellten, dass der IL-1 β -Export durch die ABC1-Inhibitoren Bromosulfalein (Sulfobromophtalein, Bromosulfophtalein, BSP), 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat (DIDS) und Glyburid (*glibenclamide*) spezifisch und ABC1-selektiv reduziert wurde. ABC1 (bzw. ABCA1)-Transporter gehören zur Familie der ATP-*binding-cassette*-Proteine, die zusammen mit den *multidrug resistance*-Proteinen (MRP) eine Vielzahl von Substraten wie Oligosaccharide, Aminosäuren, Metallionen, Peptide und Proteine über intra- und extrazelluläre Membranen transportieren (für eine Zusammenfassung und zur Nomenklatur siehe (Borst, 1999) (Dean, 2001) (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). Daraufhin wurde ein Zwei-Schritt-Modell für die IL-1 β -Sekretion vorgeschlagen (Andrei, 1999), bei dem im ersten Schritt die Glyburid-inhibierbare Translokation von proIL-1 β in Endolysosomen-

ähnliche Vesikel stattfindet und im zweiten Schritt Exocytose – stimuliert durch hohe extrazelluläre ATP-Konzentration und hypotonische Bedingungen – für die Ausschüttung des biologisch aktiven IL-1 β verantwortlich ist (Abb. 2). Der Exocytoseprozess wurde als *microvesicle shedding* charakterisiert, bei dem bioaktives IL-1 β bereits zwei Minuten nach der Aktivierung aus Mikrovesikeln isoliert werden kann (MacKenzie, 2001).

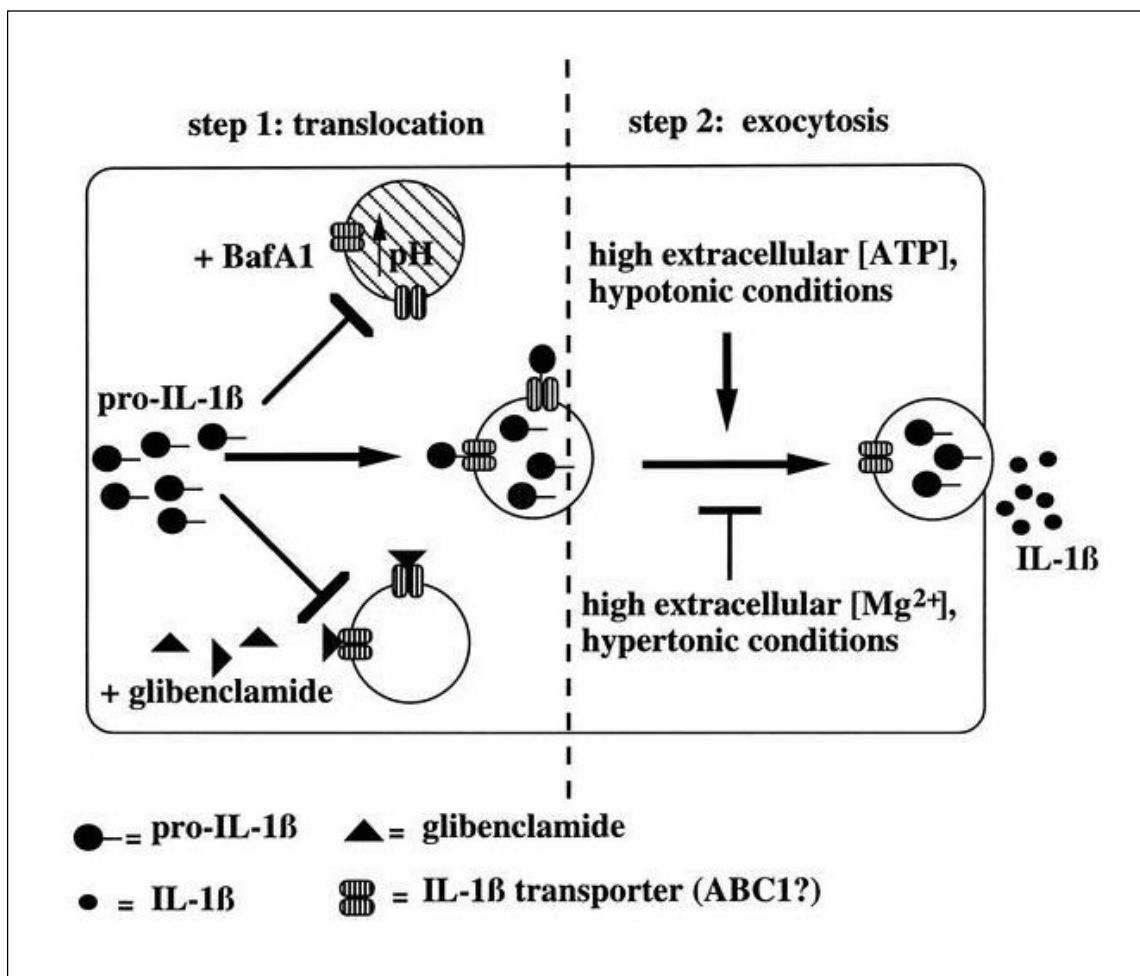


Abb. 2: Zwei-Schritt-Modell für die Sekretion von Interleukin-1 β . Im ersten Schritt erfolgt die Translokation von proIL-1 β in spezielle Vesikel. Die Translokation erfordert einen pH-Gradienten zwischen Cytosol und Vesikel und kann durch Glyburid (glibenclamide) blockiert werden. Im zweiten Schritt gelangen die Vesikel zur Plasmamembran, wo sie verschmelzen und IL-1 β entlassen. Diese Exocytose wird angetrieben von hoher extrazellulärer ATP-Konzentration und hypotonischen Bedingungen (Andrei, 1999).

Diese Erkenntnisse erklären zwar die schnelle Ausschüttung von IL-1 β und könnte möglicherweise als genereller Weg für den Export von LLS-Proteinen dienen. Der Mechanismus, mit dem IL-1 β ABCA1-Transporter-vermittelt in Vesikel des klassischen Sekretionswegs gelangt, bleibt jedoch weiter unklar.

4.8.2 Der Export von FGF wird von Cardenoliden inhibiert

Mitglieder der *fibroblast growth factor* (FGF)-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und normalen Funktion von Zellen sowie unter pathologischen Bedingungen unter anderem bei der Tumorigenese und der Metastasenbildung (Burgess und Maciag, 1989; Basilico, 1992). Vier Mitglieder der Familie haben keine N-terminale Signalsequenz: FGF-1 (aFGF), FGF-2 (bFGF), FGF-9 und FGF-16. Während für FGF-9, das N-glykosyliert und *in vitro* in Mikrosomen translokalisiert wird, eine interne hydrophobe Signalsequenz (Miyakawa, 1999) beziehungsweise eine nicht abgespaltene N-terminale Sequenz (Revest, 2000) diskutiert wird, scheint FGF-2 über einen ER-Golgi-unabhängigen Weg aus Zellen entlassen zu werden (Mignatti, 1992) (Florkiewicz, 1995). Im Gegensatz zu IL-1 β , wird der FGF-2-Export jedoch nicht durch Glyburid oder P-Glykoprotein (beziehungsweise ABCB1)-Inhibitoren beeinflusst zu werden, sondern nur durch Cardenolide, die spezifisch auf die α 1-Untereinheit der Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) wirken (Florkiewicz, 1998). Obwohl FGF-2 und NKA co-immunpräzipitieren, scheint eine direkte Beteiligung von NKA am FGF-2-Export wegen des Größenunterschiedes zwischen Ionen und FGF-2 praktisch ausgeschlossen. Aggarwal und Kollegen fanden im selben Jahr heraus, dass der FGF-2-Export durch Probenecid inhibiert wird und daher MRP (beziehungsweise Mitglieder der ABCC-Subfamilie) an der Sekretion von FGF-2 beteiligt sein könnte (Aggarwal, 1998).

4.8.3 Galektin-3 verlässt die Zelle mittels Ectocytose

Galektine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine, die eine konservierte Kohlenhydrat-bindende Domäne und eine ähnliche Affinität für β -Galaktoside besitzen (Barondes, 1984; Barondes, 1994b). Obwohl manche Galektine sezerniert werden, fehlt ihnen ein typisches Signalpeptid. Galektin-1 (Gal-1)

wurde aus dem Überstand kultivierter Muskelzellen immunpräzipitiert (Cooper, 1990). Da der Transport eher mit der Differenzierung der Muskelzellen als mit einem aktiven Mechanismus zusammenhängt, wurde für Gal-1 der Begriff Externalisation (*externalisation*) geprägt. Cooper und Kollegen postulierten daher ein Modell, bei dem sich Gal-1 zuerst nahe der Plasmamembran konzentriert, dann an bestimmten Stellen akkumuliert, in Ausstülpungen der Membran eingeschlossen wird und schließlich als extrazelluläres Vesikel abschnürt wird. Mehul und Hughes konnten diesen Mechanismus auch in COS-7-Zellen, die mit einem Gal-3-Fusionsprotein (Nt-p56^{lck}-Gal-3) transfiziert wurden, nachweisen (Mehul, 1997). Sie bezeichneten den Transport nach einem bereits früher beschriebenen Modell von Stein als Ectocytose (*ectocytosis*) (Stein, 1991; siehe auch Hughes, 1999). Für die Ausstülpungen, in denen die Proteine aggregieren und anschließend von der PM abgeknipst werden, wurde der Begriff Membranblasen (*membrane blebs*) verwendet. Neuere Arbeiten zeigten, dass die Gal-3-Ausschüttung aus Mammakarzinomzellen durch das Serum-Glykoprotein Fetuin stimuliert werden kann (Zhu, 2001). Da die Ausschüttung bereits eine Minute nach Stimulation einsetzt, moduliert Fetuin möglicherweise die letzten Stadien der Ectocytose. Ein genauer Mechanismus ist derzeit jedoch noch völlig unklar. Weiterhin wurde Synexin eine Rolle am Gal-3-Transport zugeschrieben (Yu, 2002). Synexin scheint direkt nur an der intrazellulären Translokation von Gal-3 beteiligt zu sein, denn eine Herunterregulation von Synexin verhindert die Translokation von Gal-3 zur Plasmamembran.

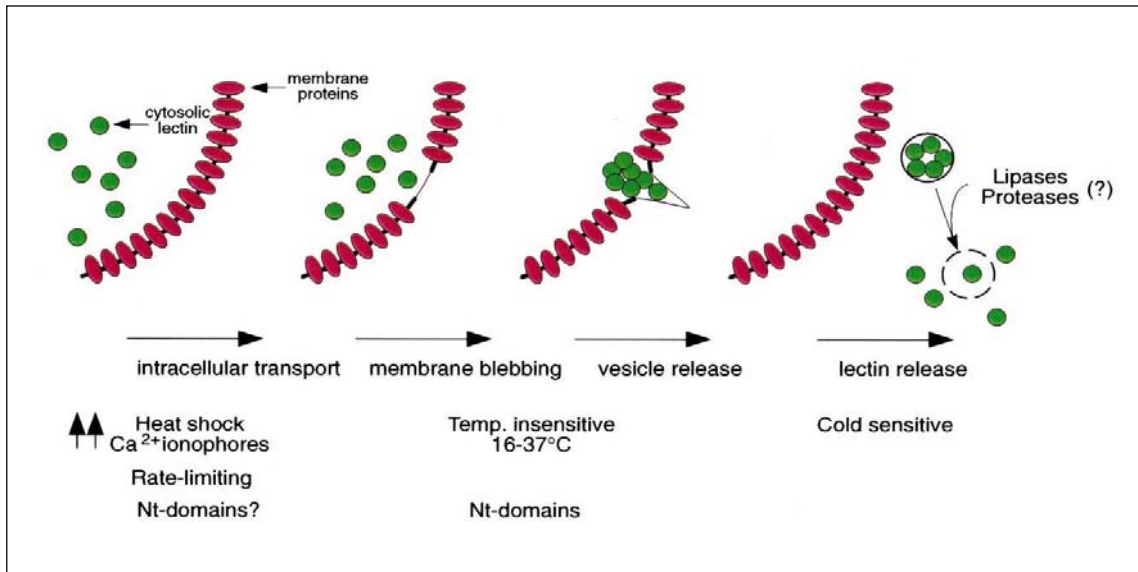


Abb.3: Modellvorstellung der Ectocytose von Galektin-3. Cytosolische Proteine (geschlossene, grüne Kreise) konzentrieren sich zuerst in Domänen, die der Plasmamembran (PM) unterliegen. Diese Aggregate werden dann in Ausstülpungen (*membrane blebs*) der PM eingeschlossen um anschließend als extrazelluläre Vesikel von der PM abgeknipst zu werden. Lösliches Galektin-3 wird dann aus diesen Vesikeln ins extrazelluläre Milieu entlassen (Hughes, 1999).

4.8.4 MRP8/14 werden entlang des Tubulin-Netzwerks transportiert

Myeloid-related proteins MRP8 und MRP14, zwei Ca²⁺-bindende Proteine der S-100 Proteinfamilie (Odink, 1987), werden möglicherweise über einen weiteren Mechanismus aus der Zelle transportiert. Stimuliert man Monozyten mit dem Calciumionophor A23187, findet intrazellulär eine Translokation vom Cytoplasma zum Cytoskelett und zur Plasmamembran statt – Orte also, an denen MRP8/14 ihre Hauptfunktion erfüllen (Roth, 1993). Dies führte zu der Annahme, dass das Cytoskelett eine wichtige Rolle beim Export spielt. Rammes und Kollegen konnten wiederum zeigen, dass Brefeldin A, Cycloheximid und Monensin keinen Einfluss auf den Export hatten, wohingegen Inhibitoren, die das Mikrotubuli-Netzwerk beeinflussen, die MRP8/14-Sekretion deutlich reduzierten (Rammes, 1997). PMA-induzierte Sekretion von MRP8/14 in peripheren Blutmonozyten (PMBC) wird unterdrückt, wenn das Zellkulturmedium zuvor mit Colchicin, Demecolcin oder Nocodazol konditioniert wurde. Nach PMA-Stimulation verändert sich die MRP8/14-Verteilung in der Zelle von einem diffusen cytoplasmatischen Muster zu einem filamentösen, Tubulinnetzwerk-ähnlichen Muster. Colchicin, Demecolcin und Nocodazol

revertieren die MRP8/14-Verteilung wieder zu cytoplasmatisch-diffuser Färbung. Die Autoren schließen daher auf einen neuen Sekretionsweg, der ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk erfordert.

4.8.5 Der Import von VP22 erfordert ein intaktes Aktin-Cytoskelett

Auch das Strukturprotein VP22 des Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) besitzt keine Signalsequenz und wird trotzdem aus den Zellen, in denen es synthetisiert wird, exportiert (Elliott, 1992). Der Export von VP22 wird, wie bei den meisten LLS-Proteinen, durch Brefeldin A nicht inhibiert (Elliott und O'Hare, 1997). Interessanterweise wird der Import – VP22 infiziert nach Transfektion einzelner weniger Zellen praktisch jede Nachbarzelle einer *monolayer*-Zellkultur – von VP22 durch Nocodazol nicht beeinflusst, eine Behandlung mit Cytochalasin D führte jedoch zu einer dramatisch geänderten Zelloberflächenbindung von VP22. Die Daten legen also nahe, dass der VP22-Import kein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk benötigt, wohl aber ein intaktes Aktin-Netzwerk. Da zwischen Import und Export nicht unterschieden werden kann, schließen die Autoren nicht aus, dass der Export einem Aktin-unabhängigen Mechanismus folgt.

4.9 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Sekretionsweg des Zytokins MIF in relevanten MIF-sezernierenden Zellen zu charakterisieren. Zuerst sollte detailliert untersucht werden, ob MIF in den klassischen ER-Golgi-Pfad eintritt und posttranslational modifiziert wird. Da MIF in großer Menge von Makrophagen exprimiert und sezerniert wird, sollte dann die subzelluläre Lokalisation und die Kinetik des Exports in Monozyten untersucht werden. Durch die Verwendung niedermolekularer Inhibitoren sollten Hinweise erhalten werden, auf welchem nichtklassischen Sekretionsweg MIF aus der Zelle gelangt.

5 Material und Methoden

5.1 Medien, Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7.2

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM in ddH ₂ O

Ablösemedium pH 7.2

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
EDTA	1 mM in ddH ₂ O

TBS (Tris-buffered saline) pH 7.3

NaCl	150 mM
Tris-Cl	20 mM in ddH ₂ O

100x Proteaseinhibitor-Cocktail 1 (PIC 1)

α_2 -Macroglobulin	100 μ g/ml
AEBSF	100 mM
Aprotinin	30 μ M
EDTA	100 mM
E-64	1 mM
Leupeptin	1 mM in ddH ₂ O

100x Proteaseinhibitor-Cocktail 2 (PIC 2)

Pepstatin

150 μ M in DMSO**5.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien****5.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien****Tab. 4: Geräte**

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubationsschrank	
Heraeus B5060EC-CO2	Kendro Laboratory Products, Hanau
Elektrophorese- und Western- Blotting-System Mini-PROTEAN II und III System	Bio-Rad Laboratories, München
ELISA- <i>reader</i> Microplate Reader 3550	Bio-Rad Laboratories, München
Inverses Mikroskop CK40	Olympus Optical, Hamburg
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop DM-IRB / TCS SP2 Software	Leica Microsystems, Wetzlar
<i>Luminescent image analyzer</i> LAS 1000pro	Raytest, Straubenhardt
Phosphor-Imaging-System Storm™ 860	Molecular Dynamics, Krefeld
Reinluftwerkbank Herasafe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Spektrophotometer Spekol 1200	Jenoptik, Jena
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Zentrifuge J2-21	Beckman, München

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Centricon 10 <i>concentrators</i>	Millipore, Eschborn
Deckgläser 12 mm	Merck Eurolab, Bruchsal
ELISA-96- <i>well</i> Platten	
Immunolon II Flat Bottom	Dynatech Corporation, Burlington MA, USA
Nitrocellulose-Membranen	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger Superfrost	Merck Eurolab, Bruchsal
Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner Labortechnik (Frickenhäusen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.	

5.2.2 Chemikalien

Tab. 6: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)	(2)
α_2 -Macroglobulin	(12)
Amplify™	(1)
<i>Canine pancreatic microsomal membranes</i>	(8)
<i>Core glycosylation control</i> mRNA	(8)
<i>DNA ladder</i> 100 bp und 1 kB	(7)
dNTP-Mix	(7)
Fettarmes Trockenmilchpulver	(5)
<i>Flexi rabbit reticulocyte lysate system</i>	(8)
Fötale Kälberserum (FCS) und dialysiertes FCS – Gibco	(4)
G418	(3)
JETsorb <i>gel extraction Kit</i>	(9)
Leupeptin	(12)
Lipopolysaccharid 0111:B4 (LPS)	(13)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	(13)

pCruz HA A-Vektor	(13)
PRO-MIX L-[³⁵ S] <i>in vitro cell labeling mix</i>	(1)
Proteaseinhibitor-Cocktail	(3)
Protein A-Sepharose	(1)
Protein-Molekulargewichtsmarker <i>low range</i> 3-43 kDa	(7)
Protein-Molekulargewichtsmarker MultiMark	(4)
QIAGEN <i>plasmid miniprep und maxiprep kit</i>	(10)
QIAquick PCR <i>purification kit</i>	(10)
Rainbow™ [¹⁴ C]-methylierter Protein-Molekulargewichtsmarker	(1)
Ribomax™ <i>large scale RNA production system - T7</i>	(8)
RNA <i>ladder</i>	(7)
RNasin	(8)
RPMI 1640 Medium modifiziert (ohne Cys, L-Glut und Met)	(13)
<i>Signal sequence control</i> mRNA	(8)
Streptavidin-Peroxidase	(12)
SuperFect Transfektionsreagez	(10)
TEMED	(2)
TMB-Lösung Pierce	(6)
Zellkulturmedien Gibco	(4)
Zellkultursupplemente Gibco	(4)

Bezugsquellen

- (1) Amersham Biosciences, Freiburg
- (2) Bio-Rad Laboratories, München
- (3) Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
- (4) Invitrogen, Karlsruhe
- (5) J. M. Gabler Saliter, Obergünzburg
- (6) KMF Laborchemie, Sankt Augustin
- (7) New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main
- (8) Promega, Mannheim
- (9) Qbiogene, Heidelberg
- (10) QIAGEN, Hilden

- (11) R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- (12) Roche Diagnostics, Mannheim
- (13) Sigma, Taufkirchen

Alle anderen Reagenzien und Feinchemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe), Merck Eurolab (Bruchsal) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

5.2.3 Enzyme

Tab. 7: Enzyme

Enzyme	Hersteller
RQ1 RNase-freie DNase	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	QIAGEN, Hilden
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen

Alle anderen Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) bezogen.

5.2.4 Antikörper

Tab. 8: Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Verwendung	Hersteller
3090	Maus Anti-CD45 IgG _{2a}	IF 1:250	(5)
CBL 432	Maus Anti-Bcl-2 IgG ₁	IF 1:100	(4)
HM-1	Maus Anti-MAP1 IgG ₁	WB 1:1000	(9)
Ka345	Kaninchen Anti-huMIF Serum	IP 1:1000	(3)
Ka565	Kaninchen Anti-huMIF Serum	WB 1:1000	
		IF 1:400	(3)
MA3-027	Maus Anti-Calnexin IgG ₁	IF 1:100	(1)
MA3-063	Maus Anti-TGN 38 IgG ₁	IF 1:250	(1)
MA3-067	Maus Anti-Rab 9 IgG ₁	IF 1:250	(1)
MAB289	Maus Anti-huMIF IgG	ELISA 2 µg/ml	
		WB 1:1000	(7)
MAB610	Maus Anti-huTNF IgG	ELISA 4 µg/ml	(7)

sc-8030	Maus Anti-Histon H1 IgG _{2a}	IF 1:250	(8)
sc-805	Kaninchen Anti-HA IgG	WB 1:1000	(8)
sc-8099	Ziege Anti-LAMP-1 IgG	IF 1:100	(8)
SPA-891	Maus Anti-PDI IgG ₁	IF 1:200	(10)
VAM-SV013	Maus Anti-Syntaxin IgG ₁	IF 1:500	(10)

IF: Immunfluoreszenz; IP: Immunpräzipitation; WB: Western Blot;

Tab. 9: Konjugierte Sekundärantikörper

Name	Beschreibung	Verwendung	Hersteller
115-035-068	Ziege Anti-Maus-IgG Peroxidase-konjugiert	WB 1:10000	(4)
Alexa 488-M	Ziege Anti-Maus-IgG F(ab) ₂ -Fragment Alexa488-konjugiert	IF 1:500	(6)
Alexa 488-R	Ziege Anti-Kaninchen-IgG F(ab) ₂ -Fragment Alexa488-konjugiert	IF 1:500	(6)
Alexa 555-M	Ziege Anti-Maus-IgG F(ab) ₂ -Fragment Alexa555-konjugiert	IF 1:500	(6)
Alexa 555-R	Ziege Anti-Kaninchen-IgG F(ab) ₂ -Fragment Alexa555-konjugiert	IF 1:500	(6)
BAF210	Ziege Anti-Maus-IgG Biotin-konjugiert	ELISA 0.2 µg/ml	(7)
BAF289	Ziege Anti-Kaninchen-IgG Biotin-konjugiert	ELISA 0.2 µg/ml	(7)
NA934	Esel Anti-Kaninchen-IgG Peroxidase-konjugiert	WB 1:10000	(2)

Hersteller

- (1) Affinity Bioreagents, Golden CO, USA
- (2) Amersham Biosciences, Freiburg
- (3) Charles River, Sulzfeld
- (4) Dianova, Hamburg
- (5) Diatec, Oslo, Norwegen
- (6) Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- (7) R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- (8) Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
- (9) Sigma, Taufkirchen
- (10) StressGen Biotechnologies, Victoria BC, Kanada

5.2.5 Modulatoren der Proteinsekretion**Tab. 10: Modulatoren**

Name	Abkürzung	Lösungsmittel	Bezugsquelle
1,10-Phenanthrolin	Phen	Ethanol	Fluka
4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonat	DIDS	Wasser	Sigma
Benzamidin-HCl	Benz	Wasser	Fluka
Brefeldin A	BFA	Methanol	Sigma
Calciumionophor A23187	A23187	DMSO	Sigma
Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon	CCCH	PBS pH 2	Sigma
Colchicin	Col	Ethanol	Sigma
Cycloheximid	CHX	Ethanol	Sigma
Demecolcin	Deme	HBSS	Sigma
Glyburid	Gly	DMSO	Sigma
Methylamin	MeAm	Wasser	Sigma
Monensin	Mon	Ethanol	Sigma
Nocodazol	Noco	DMSO	Sigma

Paclitaxel	Pacli	DMSO	Sigma
Podophyllotoxin	Podo	Ethanol	Alexis
Probenecid	Prob	DMSO	Sigma
Sulfobromophtalein	BSP	DMSO	Sigma
Tubulozol	Tubu	DMSO	Sigma
Verapamil	Vera	Wasser	Sigma

5.3 Zelllinien und stabile Transfektion

5.3.1 Zelllinien und Kulturmedien

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tab. 11: Zelllinien

Name	THP-1
Herkunft	humane Monozyten
Komplettmedium	RPMI 1640, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Name	RAW 264.7
Herkunft	murine Makrophagen
Komplettmedium	DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Name	HeLa
Herkunft	humane epithelartige Gebärmutter-Zellen
Komplettmedium	DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, MEM Vitaminen, nichtessentiellen Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Name	P19
Herkunft	C3H/He-Maus-Embryonalkarzinom
Komplettmedium	MEM alpha mit Ribonucleosiden und Desoxyribonucleosiden, supplementiert mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Name	C6-BU-1
Herkunft	Ratten-Gehirntumor
Komplettmedium	DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, MEM Vitaminen, Nichtessentiellen Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

5.3.2 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Die für die stabile Transfektion verwendete Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt und in endotoxinfreiem TE-Puffer (Qiagen) aufgenommen. HeLa-Zellen wurden nach Herstellerangaben mit SuperFect transfiziert und nach 24 h mit Selektionsmedium (HeLa-Komplettmedium, supplementiert, mit 600 µg/ml G418) inkubiert. Die geeignete G418-Konzentration, bei der gerade alle HeLa-Zellen absterben, wurde in einem Vorversuch über eine *killing curve* ermittelt (Daten nicht gezeigt). Nachdem die Mehrzahl aller Zellen abgestorben war und G418-resistente Klone aus Einzelzellen hochgewachsen waren, wurden diese in 50 µl Ablösemedium von der trockenen Platte abgelöst, auf 24-*well*-Platten übertragen, bis auf 6-*well*-Platten expandiert und dann die HA-MIF-Expression mittels Western Blot-Analyse untersucht. G418-resistente Klone, die HA-MIF in ausreichender Menge exprimierten, wurden mittels *limiting dilution* einer zweiten Selektionsrunde unterzogen. Dafür wurden 100 µl einer Zellsuspension, die 50 Zellen pro 10 ml Selektionsmedium enthielt, in *wells* einer 96-*well*-Platte pipettiert, sodass sich statistisch in jedem zweiten *well* eine Zelle befand. Nachdem wiederum G418-resistente Klone aus Einzelzellen hochgewachsen waren, wurden sie, wie oben beschrieben, abgelöst, expandiert und auf HA-MIF-Expression überprüft. In Langzeitkulturen wurde die G418-Konzentration auf 250 µg/ml reduziert.

5.4 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

5.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Mikroskopierdeckgläser wurden 10 min in einer 0.01%igen Poly-L-Lysin-Lösung inkubiert, die Lösung vollständig abpipettiert und 5 min in der Sterilbank getrocknet. Die Deckgläser wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, nochmals 10-15 min in der Sterilbank getrocknet und sofort für die Adhäsion der Zellen verwendet.

10 µl THP-1 Zell-Suspension wurde auf beschichtete Deckgläser getropft, 15-20 min zur Adhäsion überlassen und ohne weiteren Waschschrift 5 min bei 37°C mit Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-BSA wurden die Zellen 15 min bei RT mit PBS-Triton X-100 permeabilisiert, gewaschen, 30 min mit Blockierungslösung inkubiert und nochmals gewaschen. Die Inkubation mit Primärantikörper-Lösung in PBS-BSA (Konzentrationen siehe Tab. 8) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen 30 min bei 4°C im Dunkeln mit Sekundärantikörper-Lösung, bestehend aus Alexa488- bzw. Alexa555-konjugierten F(ab)₂-Fragmenten in PBS-BSA, inkubiert (Konzentrationen siehe Tab. 9). Die Deckgläser wurden nochmals gewaschen, in Fluoromount G auf Objektträger platziert und über Nacht ausgehärtet.

Blockierungslösung

Normales Ziegen Serum	5 %
BSA	1 % in PBS

Paraformaldehyd-Lösung

Formaldehyd	4 % in PBS
-------------	------------

PBS-BSA

BSA	1 % in PBS
-----	------------

PBS-Triton X-100

Triton X-100	5 % in PBS
--------------	------------

Poly-L-Lysin-Lösung

Poly-L-Lysin	0.01 % in ddH ₂ O
--------------	------------------------------

5.4.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Mikroskopische Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (DM-IRB, Leica, Wetzlar), ausgestattet mit einem 100x/1.4 HCX PlanApo Ölimmersionsobjektiv und TCS SP2-Software, aufgenommen. Alexa488-konjugierte F(ab)₂-Fragmente (Anregung $\lambda = 495$ nm, Emission $\lambda = 519$ nm) wurden mit einem Argon-Laser (488 nm-Linie), Alexa555-konjugierte F(ab)₂-Fragmente (Anregung $\lambda = 555$ nm, Emission $\lambda = 565$ nm) wurden mit einem Helium-Neon-Laser (546 nm-Linie) angeregt. Jedes Bild entspricht einer Ebene mit einer Schichtdicke von 0.5 μ m in z-Richtung. Alexa488-Signale wurden grün und Alexa555-Signale rot dargestellt. Die Überlagerung beider Signale erfolgte computerunterstützt mittels Leica TCS SP2-Software.

5.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**5.5.1 Sandwich-ELISA**Waschpuffer

Tween20	0.05 % in PBS
---------	---------------

Blockierungslösung

BSA	1 %
Saccharose	5 % in PBS

Probenpuffer

BSA	0.1 %
Tween20	0.2 % in PBS

Sandwich-ELISA für murines MIF

Die ELISA-Platte wurde zunächst mit 100 µl pro well Primärantikörper-Lösung befüllt, mit Folie versiegelt und über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte entleert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und kräftig auf Papiertüchern ausgeklopft, um letzte Reste des Waschpuffers zu entfernen. Dieser Waschschrift wurde nach jedem der nachfolgenden Schritte insgesamt dreimal wiederholt. Dann wurden 300 µl pro well Blockierungslösung zugegeben, mit Folie versiegelt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, 100 µl pro well mouMIF-Standards (Endkonzentration 0 – 200 ng/ml) und Proben zugegeben, mit Folie versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, 100 µl pro well Sekundärantikörper-Lösung zugegeben, mit Folie versiegelt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde wiederum gewaschen, 100 µl pro well Tertiärantikörper-Lösung zugegeben, mit Folie versiegelt und 35 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden zur Entwicklung 100 µl pro well pNPP-Entwicklungslösung pH 9.5 zugegeben und im Dunkeln inkubiert, bis Standards und Proben eine Gelbfärbung zeigten. Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Aus den MIF-Standards wurde eine Standardgerade erstellt, die eine Abschätzung der MIF-Konzentration in den Proben erlaubte. Proben und Standards wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen und die Mittelwerte berechnet. Zellfreie Überstände wurden unverdünnt und Zelllysate wurden 1:2 bis 1:10 in Probenpuffer verdünnt, aufgetragen.

Primärantikörper-Lösung

XIV.14.3 Maus Anti-mouMIF-IgG 15 µg/ml in PBS

Sekundärantikörper-Lösung

Ka565 Kaninchen Anti-MIF-Serum 1:250
Normales Ziegenserum 2 %
Tween20 0.2 % in PBS

Tertiärantikörper-Lösung

NA934 Ziege Anti-Kaninchen IgG AP-konjugiert 1:3000
Normales Ziegenserum 2 %
Tween20 0.2 % in PBS

pNPP-Entwicklungslösung pH 9.5

Diethanolamin 10 mM
MgCl₂ 0.5 mM
Sigma 104-Tabletten 10 mg in ddH₂O

Sandwich-ELISA für humanes MIF

Die ELISA-Platte wurde zunächst mit 100 µl pro *well* Primärantikörperlösung befüllt, mit Folie versiegelt und über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte – wie im ELISA für murines MIF beschrieben – gewaschen, 300 µl pro *well* Blockierungslösung zugegeben, mit Folie versiegelt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, 100 µl pro *well* huMIF-Standards (Endkonzentration 0-100 ng/ml) und Proben zugegeben, mit Folie versiegelt und 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, 100 µl pro *well* Sekundärantikörperlösung zugegeben, mit Folie versiegelt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde wiederum gewaschen, 100 µl pro *well* Streptavidin-POD-Lösung zugegeben, mit Folie versiegelt und 35 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden zur Entwicklung 100 µl pro *well* Substratlösung zugegeben und im Dunkeln inkubiert, bis Standards und Proben

eine Gelbfärbung zeigten. Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Aus den MIF-Standards wurde eine Standardgerade erstellt, die eine Abschätzung der MIF-Konzentration in den Proben erlaubte. Proben und Standards wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen und die Mittelwerte berechnet. Zellfreie Überstände wurden unverdünnt und Zelllysate wurden 1:2 bis 1:10 in Probenpuffer verdünnt aufgetragen.

Primärantikörper-Lösung

MAB289 Maus Anti-huMIF-IgG	2 µg/ml in PBS
----------------------------	----------------

Sekundärantikörper-Lösung

BAF289 Ziege Anti-Maus-IgG Biotin-konjugiert	200 ng/ml in Probenpuffer
--	------------------------------

Streptavidin-POD-Lösung

Streptavidin-POD (Roche Diagnostics)	1:10000 in TBS
--------------------------------------	----------------

Substrat-Lösung (H₂O₂ : Tetramethylbenzidin (TMB) 1:1)

H ₂ O ₂ -Lösung (Pierce)	1 vol.
--	--------

TMB-Lösung (Pierce)	1 vol.
---------------------	--------

Stop-Lösung

H ₂ SO ₄	0.5 M in ddH ₂ O
--------------------------------	-----------------------------

Sandwich-ELISA für humanes TNF

Alle Inkubationszeiten und Waschschrte beim TNF-ELISA sind identisch mit denen des ELISA für humanes MIF und wurden mit den entsprechenden Lösungen durchgeführt. Kurz, 100 µl pro well Primärantikörperlösung wurden über Nacht, 300 µl pro well Blockierungslösung für 1 h, 100 µl pro well Proben und Standards für 2 h, 100 µl pro well Sekundärantikörperlösung für 2 h, 100 µl

pro well Streptavidin-POD-Lösung für 20 min und 100 µl pro well Substratlösung bis zur Blaufärbung der Proben und Standards zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stop-Lösung abgestoppt und die Absorption im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Aus den TNF-Standards (0-2000 pg/ml) wurde eine Standardgerade erstellt, die eine Abschätzung der TNF-Konzentration in den Proben erlaubte. Proben und Standards wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen und die Mittelwerte berechnet. Zellfreie Überstände wurden unverdünnt und Zelllysate wurden 1:2 bis 1:10 in Probenpuffer verdünnt aufgetragen.

Primärantikörper-Lösung

MAB610 Maus Anti-huTNF-IgG	4 µg/ml in Probenpuffer
----------------------------	----------------------------

Sekundärantikörper-Lösung

BAF210 Ziege Anti-Maus-IgG Biotin-konjugiert	200 ng/ml in Probenpuffer
--	------------------------------

Streptavidin-POD-Lösung

Streptavidin-POD (Roche Diagnostics)	1:10000 in TBS
--------------------------------------	----------------

Substrat-Lösung (H_2O_2 : Tetramethylbenzidin (TMB) 1:1)

H_2O_2 Lösung (Pierce)	1 vol
TMB Lösung (Pierce)	1 vol

Stop-Lösung

H_2SO_4	1 M in dd H_2O
-----------	------------------

5.5.2 SDS-PAGE

Herstellung von Zelllysaten

Zellen wurden zuerst zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann 500 μ l Lysierungspuffer zugegeben und 20 min auf Eis lysiert. Zur Analyse von MIF wurde RIPA-Lysierungspuffer pH 7.5 (Sambrook, 1989), zur Analyse von MAP1A wurde außerdem HNT-Lysierungspuffer pH 7.7 oder Drubin-Lysierungspuffer pH 7.2 (Drubin, 1985) verwendet. Die Lysate wurden bei 13000 Upm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand (*cleared lysates*) in ein neues Eppi überführt und eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. 10-20 μ g Gesamtprotein wurden mit 2x SLB gemischt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

RIPA-Lysierungspuffer pH 7.5

Tris-Cl	50 mM
NaCl	150 mM
Igepal CA-630	1 %
Desoxycholat	0.5 %
SDS	0.1 %
EDTA	2 mM in ddH ₂ O

Drubin-Lysierungspuffer pH 7.2

Na ₂ HPO ₄	25 mM
NaCl	0.4 M
SDS	0.5 M in ddH ₂ O

HNT-Lysierungspuffer pH 7.7

HEPES	25 mM
NaCl	0.4 M
MgCl ₂	1.5 mM
EDTA	2 mM
DTT	3 mM
Triton X-100	0.5 % in ddH ₂ O

2x sample loading buffer (SLB)

Tris-Cl	135 mM
SDS	4 %
Glycerol	20 %
β-Mercaptoethanol	10 %
Bromphenolblau	0.002 %

TCA-Präzipitation

Zur Aufkonzentrierung und zur Entfernung von Puffern aus Proben für die Gelelektrophorese wurden die Proben zur Endkonzentration von 10 % mit Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 15 min auf Eis präzipitiert. Die Proben wurden bei 13000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit Aceton p.a. gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Acetons wurde das Pellet in 2x SLB resuspendiert, 3 min bei 95°C denaturiert und bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

SDS-PAGE nach Laemmli

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden Trenn- und Sammelgel nach Laemmli (Laemmli, 1970) hergestellt. Die Proteine wurden mittels 4%igen Sammelgelen und 5%igen (zur Analyse von MAP1A), 10%igen (zur Analyse von IgG) bzw. 18%igen Trenngelen (zur Analyse von MIF) in einer MiniProtean II- bzw. III-Kammer (BioRad) in 1x Laemmli-Laufpuffer pH 8.3 bei 50 V für 30 min, gefolgt von

100 V – bis die Farbstoff-Lauffront den Gelboden erreichte – elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurden vorgefärbte Standards von Invitrogen verwendet. Zur radioaktiven Detektion wurde ein ^{14}C -markierter, vorgefärbter Standard von Amersham Biosciences verwendet. Die Molekulargewichte der Standards sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Trenngelpuffer pH 8.8

Tris-Cl	1.5 M in ddH ₂ O
---------	-----------------------------

Sammelgelpuffer pH 6.8

Tris	0.5 M in ddH ₂ O
------	-----------------------------

10 % SDS

SDS	10 % in ddH ₂ O
-----	----------------------------

10 % Ammoniumpersulfat (APS)

APS	10 % in ddH ₂ O
-----	----------------------------

5x Laemmli-Laufpuffer pH 8.3

Tris-Cl	125 mM
Glycin	0.96 M
SDS	0.5 % in ddH ₂ O

SDS-PAGE nach Schägger

Niedermolekulare Proteine und Peptide werden oft in Gelen mit Tricin statt Glycin besser aufgetrennt. Dafür wurden Trenn- und Sammelgele nach Schägger (Schägger, 1987) hergestellt, direkt nacheinander in die MiniProtean II- bzw. III-Kammer (BioRad, München) gegossen, der Probenkamm eingesetzt und zusammen 3 h zur Polymerisation überlassen. Die Proben wurden wie oben beschrieben aufgetrennt, wobei als Laufpuffer 1x Kathodenpuffer (oben)

und 1x Anodenpuffer pH 8.9 (unten) verwendet wurde. Als Molekulargewichtsmarker wurden vorgefärbte Standards von Invitrogen verwendet. Die Molekulargewichte der Standards sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Gelpuffer pH 8.45

Tris-Cl	3 M
SDS	0.3 % in ddH ₂ O

10x Anodenpuffer pH 8.9

Tris-Cl	2 M in ddH ₂ O
---------	---------------------------

10x Kathodenpuffer

Tris-Cl	1 M
Tricine	1 M
SDS	1 % in ddH ₂ O

5.5.3 Western Blotting

Zur Detektion nichtradioaktiv markierter Proteine wurden die Gele nach beendeter Elektrophorese zuerst nach Herstellerangaben in das MiniProtean II TransBlot-Modul (BioRad) gelegt, das Gelsandwich zusammen mit einem Kühlelement in CAPS-Transferpuffer pH 11 in die Kammer gesetzt und die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 30 V konstanter Spannung und unter kräftigem Rühren des Puffers über Nacht bei 4°C.

CAPS-Transferpuffer pH 11

CAPS	10 mM
Methanol	20 % in ddH ₂ O

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer kurz in Waschpuffer pH 7.4 gewaschen und anschließend 2 h bei RT in Blockierungslösung und konstanter Agitation inkubiert. Nach zweimaligem kurzen Waschen in Waschpuffer pH 7.4 wurde die Membran 1 h bei RT in Primärantikörper-Lösung und konstanter Agitation inkubiert, 3x 5 min in Waschpuffer pH 7.4 gewaschen und dann 1 h in Sekundärantikörper-Lösung bei RT und konstanter Agitation inkubiert. Die Membran wurde dann 5x 5 min in Waschpuffer pH 7.4 gewaschen, in *SuperSignal West Dura* (Pierce) gegeben und die Chemilumineszenz in einem *luminescent image analyzer* LAS 1000-pro (Raytest) detektiert.

Waschpuffer pH 7.4

Tween20	0.1 % in TBS
---------	--------------

Blockierungslösung

Magermilchpulver	5 %
Tween20	0.1 % in TBS

Primärantikörper-Lösung

Antikörper (siehe Tab. 8)	1:1000 in Blockierungslösung
---------------------------	---------------------------------

Sekundärantikörper-Lösung

Antikörper (siehe Tab. 9)	1:10000 in Blockierungslösung
---------------------------	----------------------------------

5.5.4 Pulse-Chase-Markierung mit ³⁵S

THP-1 Zellen wurden am Tag vor dem Experiment 1:2 geteilt und ca. 24 h inkubiert. 5 Millionen Zellen wurden in 60 mm Ø Schalen in RPMI 1640 minus-Medium (ohne Cystein und Methionin) ausgesät und zur Aminosäure-depletion 30 min inkubiert. Die nun adhätierenden Zellen wurden vorsichtig mit PBS

gewaschen und 2 ml *Labeling*-Medium (RPMI 1640 minus-Medium, supplementiert mit 1 % dialysiertem FCS) zugegeben.

Für Experimente zur zeitlichen Abhängigkeit der MIF-Sekretion wurden die Zellen 1 h mit 10 µg/ml LPS (stimuliert) bzw. mit 20 µl PBS (unstimuliert) inkubiert und anschließend mit 250 µCi/ml PRO-MIX L-^[35S] *in vitro cell labeling mix* für 1 h markiert (*pulse*). Für die anschließende *Chase*-Phase wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 1 % FCS, gewaschen und im selben Medium für 0, 2, 4.5 und 7.5 h inkubiert.

Für Experimente zur Inhibition der MIF-Sekretion wurden die Zellen, wie oben beschrieben, Aminosäure-depletiert, mit PBS gewaschen und RPMI 1640 minus-Medium supplementiert mit 1% dialysiertem FCS zugegeben. Aus einer 100x Stammlösung wurden die entsprechenden Inhibitoren zugegeben und die Zellen 45 min inkubiert. Dann wurden 10 µg/ml LPS (stimuliert) bzw. 20 µl PBS (unstimuliert) zugegeben und die Zellen für 1 h inkubiert. 250 µCi/ml PRO-MIX L-^[35S] *in vitro cell labeling mix* wurden dazupipettiert und die Zellen nochmals 1 h inkubiert.

Am Ende der Inkubationsphase wurden die Überstände 5 min bei 1400 Upm zur Entfernung von Zelltrümmern abzentrifugiert, mit PIC 1/2 supplementiert und bei -20°C bis zur Immunpräzipitation gelagert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in RIPA-Lysierungspuffer lysiert, mit PIC 1/2 supplementiert und ebenfalls bei -20°C bis zur Immunpräzipitation gelagert.

5.5.5 Immunpräzipitation

Zelllysate wurden in 1 ml RIPA-Lysierungspuffer pH 7.5 und 1-5 ml Zellkulturüberstände unverdünnt, bei 4°C im Kühlraum immunpräzipitiert. Zur Entfernung unspezifischer Proteine, wurden die Proben zunächst mit 5 µl Präimmenserum (PräIS) 30 min auf einem Überkoprotator inkubiert, dann 50 µl eines 1:1-Gemisches von Protein A-Sepharose-Kugeln (PAS) in PBS zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Die PAS-Antikörper-Komplexe wurden 2 min bei 4000 Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. 5 µl Ka345 Anti-MIF-Serum wurden zugegeben und über Nacht auf dem Überkoprotator inkubiert. Wiederum 50 µl eines 1:1-Gemisches von PAS in

PBS wurde zugegeben und 2 h inkubiert. Die PAS-Antikörper-Komplexe wurden abzentrifugiert, zweimal mit RIPA und einmal mit PBS gewaschen, bevor der Überstand komplett abgenommen wurde und die Komplexe in 2x SLB für 3 min bei 95°C denaturiert wurden. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

5.5.6 Autoradiographie

Zur Detektion radioaktiv markierter Proteine, wurden die Gele nach beendeter Elektrophorese 30 min in Fixierungslösung und 30 min in Amplify (Amersham Biosciences) unter konstanter Agitation inkubiert. Die Gele wurden dann in einem Gelrockner 2 h bei 80°C getrocknet, zusammen mit einem *phosphor storage screen* in eine Kassette gelegt und 24-48 h exponiert. Die Detektion erfolgte im Phosphor-Imaging-System Storm 860 (Molecular Dynamics).

Fixierungslösung

95 % Essigsäure	10 %
Methanol	50 % in ddH ₂ O

5.5.7 Deglykosylierung mit Peptid: N-Glycosidase F

Zellysate, Zellkulturüberstände und Immunglobulin G wurden in 50 µl-Ansätzen zuerst in Denaturierungspuffer, bestehend aus 0.5 % SDS und 1 % β-Mercaptoethanol, 10 min bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden dann in G7 Puffer (1 % NP-40 in 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.5) mit oder ohne 2.5 U/ml Peptid: N-Glycosidase F (PNGase F) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2x SLB und 3 min Denaturierung bei 95°C. Ein Aliquot der Probe wurde auf einem 18%igen (zur Analyse von MIF) bzw. 10%igen (zur Analyse von IgG) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

5.6 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden nach Protokollen von Sambrook (Sambrook, 1989) durchgeführt.

5.6.1 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden das QIAGEN *plasmid miniprep kit* und das *plasmid maxiprep kit* nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

5.6.2 Klonierung des HA-MIF-Fusionsproteins

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im Thermocycler T3 der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. In einem 50 µl-Ansatz wurden ca. 10 ng cDNA aus pET11b-MIF (Bernhagen, 1994b) als Templat eingesetzt und mit 1 U Taq-Polymerase, 250 µM dNTP-Mix und 0.4 µM je Primer supplementiert. Als *Forward*-Primer mit einer KpnI-Schnittstelle wurde die Sequenz 5'-CGG GGTACC CAT GCC GAT GTT CAT C-3' verwendet und als *Reverse*-Primer mit einer BglII-Schnittstelle die Sequenz 5'-GGA AGA TCT TTA GGC GAA GGT GGA G-3' verwendet. Folgendes Programm wurde zur PCR-Amplifikation verwendet:

10 min bei 95°C
30 Wiederholungen der 3 Schritte:
 1 min bei 95°C
 1 min bei 50°C
 30 sec bei 72°C
5 min bei 72°C

Die Isolierung des DNA-Fragments erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelelution mittels JETSorb *gel extraction kit* nach Angaben des Herstellers.

Der pCruz-HA A-Vektor (Santa Cruz Biotechnology) und das amplifizierte DNA-Fragment wurden zur Restriktionsanalyse jeweils mit 1 U/ μ g DNA KpnI und BglII im Enzymspezifischen Puffer des Herstellers bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden Vektor und DNA-Fragment in äquimolaren Mengen mit T4-Ligase im Enzymspezifischen Puffer des Herstellers bei 16°C über Nacht ligiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde in kompetente *E. coli* DH5 α (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert und Kanamycin-resistente Klone auf LB-Agarplatten selektioniert. In ausgewählten Klonen wurde die Richtigkeit der Sequenz anschließend durch bidirektionale Sequenzierung bestätigt.

5.6.3 *In vitro* Translation

Humanes MIF im Vektor pET11b (pET11b-MIF) (Bernhagen, 1994b) wurde mit EcoRI (1 U/ μ g DNA) im Enzymspezifischen Puffer des Herstellers bei 37°C über Nacht linearisiert. Der Ansatz wurden dann mit 100 μ g/ml Proteinase K in einem Puffer aus 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 % SDS, 5 mM CaCl₂ für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und das gereinigte Pellet in DEPC-H₂O aufgenommen.

Die Transkription von cDNA in mRNA erfolgte im *Ribomax large scale RNA production system T7* (Promega). Als Kontrolle wurde linearisierte Luciferase-cDNA (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Folgende Reaktionskomponenten wurden auf Eis gemischt und für 4 h bei 37°C inkubiert:

Tab. 12: Transkriptionskomponenten

T7 Reaktionskomponenten	MIF-Mix	Luciferase-Mix
T7 Transkriptionspuffer 5x	10 µl	4 µl
rNTP (je 25 mM ATP, CTP, GTP, UTP)	15 µl	6 µl
linearisierte huMIF-DNA (5 µg)	15 µl	–
linearisierte Kontroll-DNA (1 µg)	–	1 µl
DEPC-H ₂ O	5 µl	7 µl
Enzym-Mix T7	5 µl	2 µl
Endvolumen	50 µl	20 µl

Zur Entfernung der DNA wurden am Ende der Inkubationszeit für 15 min 1 µl RQ1 RNase-freie DNase (Promega) zugegeben, der Ansatz mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und die mRNA in DEPC-H₂O aufgenommen.

5 µg der gereinigten huMIF-mRNA wurden dann im *Flexi rabbit reticulocyte lysate system* (Promega) in Protein translatiert. Zur Überprüfung der Glykosylierung bzw. der Translokation in Mikrosomen, wurden alle Ansätze mit oder ohne 1 µl *Canine pancreatic microsomal membranes* (Promega) angesetzt und 60 min bei 30°C in Gegenwart radioaktiv markierter Aminosäuren (PRO-MIX L-[³⁵S]-*in vitro cell labelling mix*, spezif. Aktivität >1000 Ci/mM, Amersham Biosciences) inkubiert. Die Translationsreaktion wurde durch Zugabe von 2x SLB gestoppt, die Proben 3 min bei 95°C denaturiert und ein Aliquot auf einem 18%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 0.1 µg Luciferase-mRNA (hergestellt im *Ribomax System*) und 0.1 µg α-Faktor-mRNA aus *S. cerevisiae* (Promega) verwendet.

Tab. 13: Translationskomponenten

Translationskomponenten	MIF	α -Faktor	Luciferase
<i>Flexi rabbit reticulocyte lysate</i>	33 μ l	33 μ l	33 μ l
Aminosäuremix ohne Methionin	1 μ l	1 μ l	1 μ l
PRO-MIX 40 μ Ci	3 μ l	3 μ l	3 μ l
RNasin (Promega)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
RNA-Substrat	5 μ l	1 μ l	1 μ l
DEPC-H ₂ O	7 μ l	11 μ l	11 μ l
Endvolumen	50 μ l	50 μ l	50 μ l

6 Ergebnisse

6.1 N-Glykosylierung von MIF

Wird ein Protein über den klassischen Sekretionsweg aus der Zelle transportiert, finden in ER und Golgi-Apparat posttranslationale Modifikationen statt. An Asparaginreste werden Oligosaccharide verschiedener Länge und verschiedener Zusammensetzung gebunden, man spricht von N-Glykosylierung oder Asparagin-Glykosylierung. *In vitro* kann man N-Glykosylierung nachweisen, indem man diese Zuckerreste enzymatisch abspaltet und die Proteine anschließend mittels SDS-PAGE auftrennt. Enzymatisch behandelte glykosylierte Proteine migrieren im Gel weiter als nicht-enzymatisch behandelte Proteine. Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) spaltet nahezu alle Zuckerreste zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest des Proteins. Da ein solches Oligosaccharid einem Molekulargewicht von ca. 1 kDa entspricht, kann die Glykosylierung eines Proteins bei entsprechender Auflösung des Gels nachgewiesen werden.

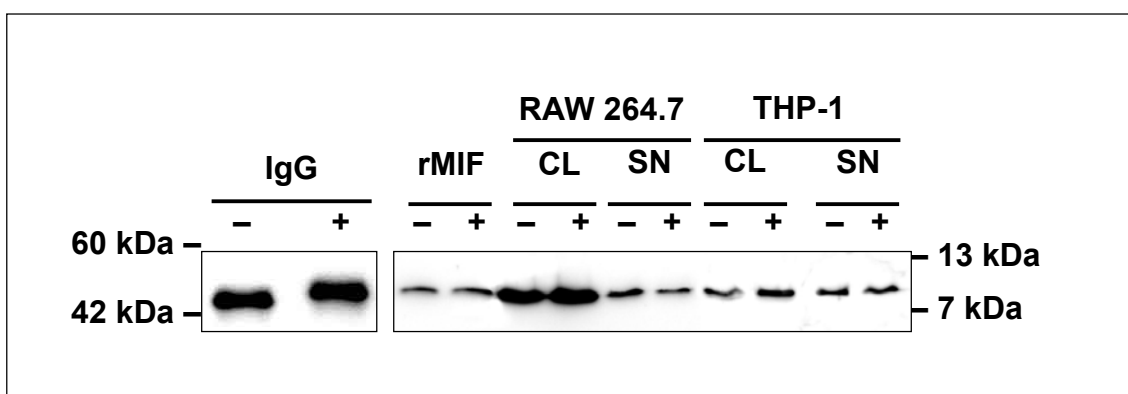


Abb. 4: PNGase F-Verdau von MIF aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen. RAW 264.7 Zellen wurden 12 h mit 100 ng/ml LPS, THP-1 Zellen 4 h mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Jeweils 10 µg Lysate (CL), 100 µg Überstände (SN), 10 ng rhuMIF und 5 ng Anti-MIF-Serum (IgG) wurden in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 100 mU PNGase F über Nacht inkubiert und anschließend mittels 10% Laemmli-SDS-PAGE (linkes Bild) bzw. 16.5% Tricine-SDS-PAGE (rechtes Bild) aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der Western Blot wurde mit Anti-IgG- bzw. Ka565 Anti-MIF-Antikörper analysiert.

Wie in Abb. 4 gezeigt, konnte für MIF keine N-Glykosylierung nachgewiesen werden. Humanes und murines MIF aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen LPS-stimulierter THP-1 und RAW 264.7 Makrophagen sowie rekombinantes MIF zeigten kein verändertes Migrationsverhalten, wenn sie mit PNGase F behandelt wurden. IgG hingegen, das an zwei Stellen N-glykosyliert wird, migriert nach PNGase F-Verdau im Gel weiter als nicht-enzymatisch behandeltes IgG. Diese Daten stehen im Einklang mit den Experimenten, die mit MIF, welches aus Leberzellextrakten aufgereinigt wurde, durchgeführt wurden (Bernhagen, 1994b). Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass MIF aus Immunzellen sowohl intrazellulär als auch nach stimulierter Sekretion in das Medium nicht glykosyliert wird.

6.2 *In vitro* Translation in Mikrosomen

Eine weitere Möglichkeit, um zu überprüfen, ob Proteine in den klassischen ER-Golgi-Transportweg eintreten, besteht darin, mRNA in Gegenwart von Retikulozytenlysat *in vitro* in Protein zu translatieren. Gibt man zu den Reaktionsansätzen zusätzlich Mikrosomen, werden Proteine, die eine hydrophobe Signalsequenz besitzen, cotranslational prozessiert und in den Mikrosomen glykosyliert. Elektrophoretisch aufgetrennt, kann ein relativer Unterschied im Molekulargewicht in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Mikrosomen beobachtet werden.

Dazu wurde zunächst cDNA des Plasmids pET11b-MIF mit *EcoRI* linearisiert und im *Ribomax large scale RNA production system* transkribiert. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µg MIF mRNA in RNA-Ladepuffer aufgenommen und zusammen mit einer RNA-Leiter der Firma NEB in einem 1%igen Agarosegel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. In Abb. 5 A war eine scharfe MIF-mRNA-Bande mit einer Größe von ca. 370 bp, zu sehen. Größe, Ausbeute und Reinheit des Konstrukts entsprachen den erwarteten Werten. Anschließend wurden die MIF-mRNA und *S. cerevisiae alpha mating factor* (α -Faktor)-mRNA in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Mikrosomen im *Flexi Rabbit reticulocyte lysate* transkribiert. Die neusynthetisierten, ³⁵S-markierten

Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Wie aus Abb. 5 B ersichtlich, wurde mit α -Faktor-mRNA in Gegenwart von Mikrosomen ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 32.0 kDa produziert und – zu einem geringeren Anteil – ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 18.6 kDa (Walter, 1983). MIF-mRNA hingegen erzeugte nur ein Protein mit ca. 12.5 kDa, was darauf schließen lässt, das MIF nicht in Mikrosomen transportiert und folglich nicht glykosyliert wurde. Somit konnte in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen – Deglykosylierung von sezerniertem MIF aus Immunzellen und *in vitro*-Translation in Mikrosomen – gezeigt werden, dass MIF nicht glykosyliert wird und nicht in das ER eintritt.

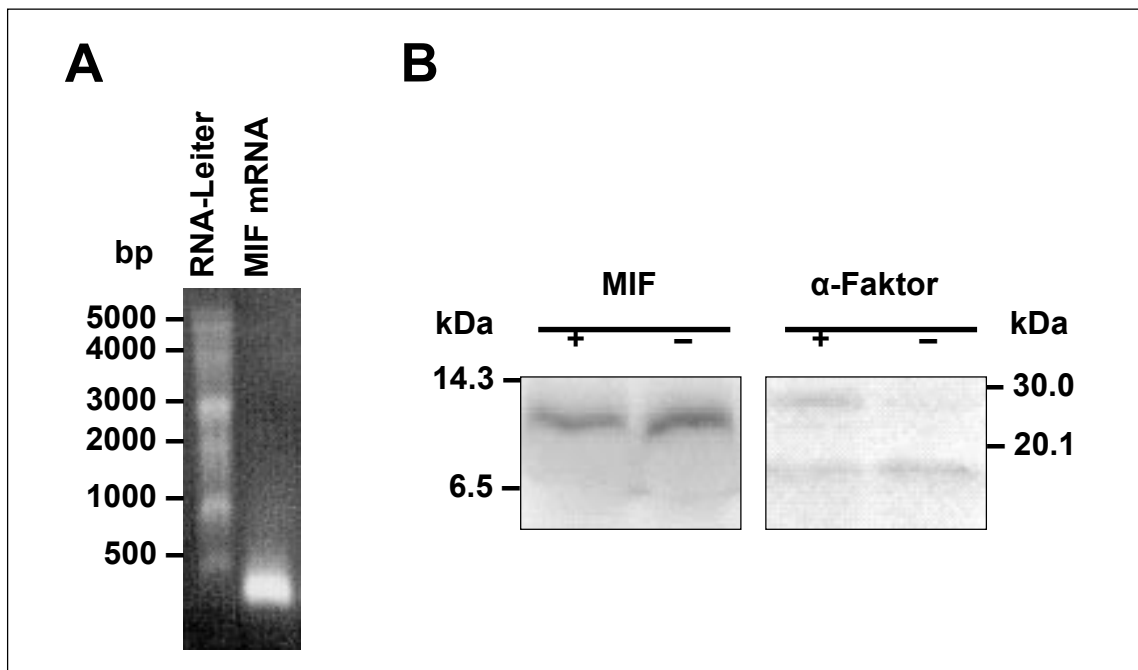


Abb. 5: *In vitro*-Translation von MIF- und α -Faktor-mRNA in Mikrosomen. **A**, 50 μ g *EcoR1*-linearisierte cDNA des Plasmids pET11b-MIF wurde mit dem *Ribomax large scale RNA production system* transkribiert. 1 μ g der mRNA wurde in RNA-Ladepuffer aufgenommen, 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf einem 1%igen Agarosegel unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine RNA-Leiter der Firma NEB. **B**, 5 μ g MIF-mRNA und 1 μ g α -Faktor-mRNA wurden in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von *Canine pancreatic microsomal membranes* mit dem *Flexi rabbit reticulocyte lysate system* und PRO-MIX [35 S] *in vitro cell labeling mix* nach Herstellerangaben 30 min bei 30°C translatiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2x SLB gestoppt. Ca. 25% der Ansätze wurden mittels 18% Laemmli-SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiografie detektiert.

6.3 Sekretion von HA-getaggttem MIF in HeLa

MIF wird neben verschiedenen Organen wie Immunsystem, Leber, Niere und Gehirn (Calandra, 1994) auch in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft exprimiert. So wurde MIF in den Monozyten/Makrophagen-Linien RAW 264.7, THP-1 und HL-60, in den Fibroblasten-Linien Swiss3T3, NIH 3T3 und L929, in Insulinomazellen RIN als auch in den Cervixkarzinom-Zellen HeLa nachgewiesen (A. Braun, persönliche Mitteilung). Auch verschiedene polyklonale und monoklonale Antikörper mit großer Sensitivität gegen humanes und murines MIF sind kommerziell erhältlich. Dennoch gibt es Gründe, ein epitop-getaggttes MIF als molekulares *tool* zu etablieren und für verschiedene experimentelle Strategien zu verwenden.

Gegen Epitop-*tags* gerichtete Antikörper besitzen eine noch größere Sensitivität und eine geringe Kreuzreaktivität als Antiseren und selbst aufgereinigte polyklonale Antikörper. Immunpräzipitationsstudien haben gezeigt, dass vor allem neusynthetisiertes MIF in THP-1 Monozyten in sehr geringen Mengen vorliegt, dass ein Nachweis mit vorhandenen Antikörpern sehr schwierig war (Flieger, 1999).

Zum anderen beeinflussen kleine Epitop-*tags* in der Regel die biochemischen und biologischen Eigenschaften von Proteinen nicht. HA-MIF mit einem berechneten Molekulargewicht von 14909 Da ist nur geringfügig größer als humanes MIF, das ein Molekulargewicht von 12476 Da besitzt.

Die Expression in HeLa Zellen bietet den Vorteil, dass die Untersuchung der subzellulären Lokalisation in diesen großen, adhären wachsenden Zellen einfacher ist als in kleinen, runden Monozyten, wie zum Beispiel THP-1.

Außerdem wurde für HeLa Zellen beschrieben, dass nach Hitzeschockstimulation eine Reihe von niedermolekularen Substanzen und Proteinen ausgeschüttet werden (Calderwood, 1989; Jackson, 1992). Da MIF ebenfalls nach Hitzeschock aus RAW 264.7 Zellen ausgeschüttet wird (R. Mischke, persönliche Mitteilung), könnte HA-MIF in HeLa als geeignetes Modellsystem analog zur stimulierbaren Proteinsekretion in Immunzellen dienen.

6.3.1 Stabile Transfektion in HeLa

Von 48 Klonen, die nach Transfektion von HeLa-Zellen mit pCruz-HA-MIF hochgewachsen sind, konnten 6 Klone expandiert werden. Sechs dieser Klone exprimierten HA-MIF in ausreichender Menge und wurden mittels *limiting dilution* einer zweiten Selektionsrunde unterzogen. Von allen Klonen konnten erfolgreich jeweils 12 Subklone generiert werden. Für alle weiteren Experimente wurde Klon HeLa_{HA-MIF}42.1 ausgewählt, der in Morphologie und Wachstumsrate normalen HeLa-Zellen entspricht, mehrere Wochen ohne sichtbare Veränderung in Kultur gehalten werden konnte und HA-MIF in ausreichender Menge exprimierte.

6.3.2 Sekretion von endogenem MIF in HeLa-Zellen

Vorversuche haben gezeigt, dass bereits eine Hitzeschockbehandlung von 10 bis 30 min eine Veränderung der intrazellulären Konzentration endogenen MIFs in untransfizierten HeLa Zellen als auch von HA-MIF in transient und stabil transfizierten HeLa Zellen bewirkt. Es blieb jedoch unklar, ob die HA-MIF-Ausschüttung eher der schnellen THP-1-Kinetik folgt, bei der bereits nach 2 h große Mengen MIF ausgeschüttet werden (Flieger, 1999) oder eher der RAW264.7-Kinetik, bei der MIF erst nach 6-12 h im Medium nachweisbar ist (Calandra, 1994). Um die MIF-Ausschüttung auf ein möglicherweise sehr enges Zeitfenster einzugrenzen, wurden HeLa Zellen für 30 min bei 42°C (stimuliert) oder 37°C (unstimuliert) inkubiert und nach Medienwechsel für 0 bis 12 h bei 37°C weiterinkubiert. Zelllysate und -kulturüberstände wurden mittels 16.5% Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von endogenem MIF erfolgte durch Inkubation des Western Blots mit Ka565 Anti-MIF Antikörper.

Wie Abb. 6 A zeigt, änderte sich bei unstimulierten Zellen zwar intrazellulär die MIF-Konzentration mit der Zeit, korrelierte aber nicht mit der Menge an MIF, die im Überstand wiedergefunden wurde. Möglicherweise bedeutet die geringere MIF-Konzentration im Lysat 30 min nach Stimulation eine Abnahme der Expression und nicht eine Ausschüttung. Es fällt außerdem auf, dass über den

gesamten Zeitraum nur eine sehr geringe Menge MIF ausgeschüttet wurde. Stimuliert man HeLa Zellen 30 min bei 42°C, steigt die Expressionsrate von MIF sofort an und bleibt bis 12 h unverändert. Im Überstand findet sich nun kein MIF mehr. Auch bei Stimulation von 0-30 min ändert sich die MIF-Menge im Medium nicht (Daten nicht gezeigt). Hitzeschockstimulation von HeLa Zellen scheint also zwar die MIF-Expression zu verstärken, MIF akkumuliert aber in den Zellen und scheint nicht ausgeschüttet zu werden.

6.3.3 Sekretion von HA-MIF in HeLa_{HA-MIF42.1}

Kann MIF im Überstand nicht detektiert werden, weil die Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze der MIF-Antiseren liegt oder folgt die MIF-Sekretion in HeLa-Zellen einem anderen Mechanismus bzw. wird nicht aus der Zelle transportiert? Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde die Sekretion von HA-MIF aus HeLa_{HA-MIF42.1} analog zur Sekretion von endogenem MIF untersucht. Die Detektion von HA-MIF erfolgte durch Inkubation des Western Blots mit sc-805 Anti-HA Antikörper.

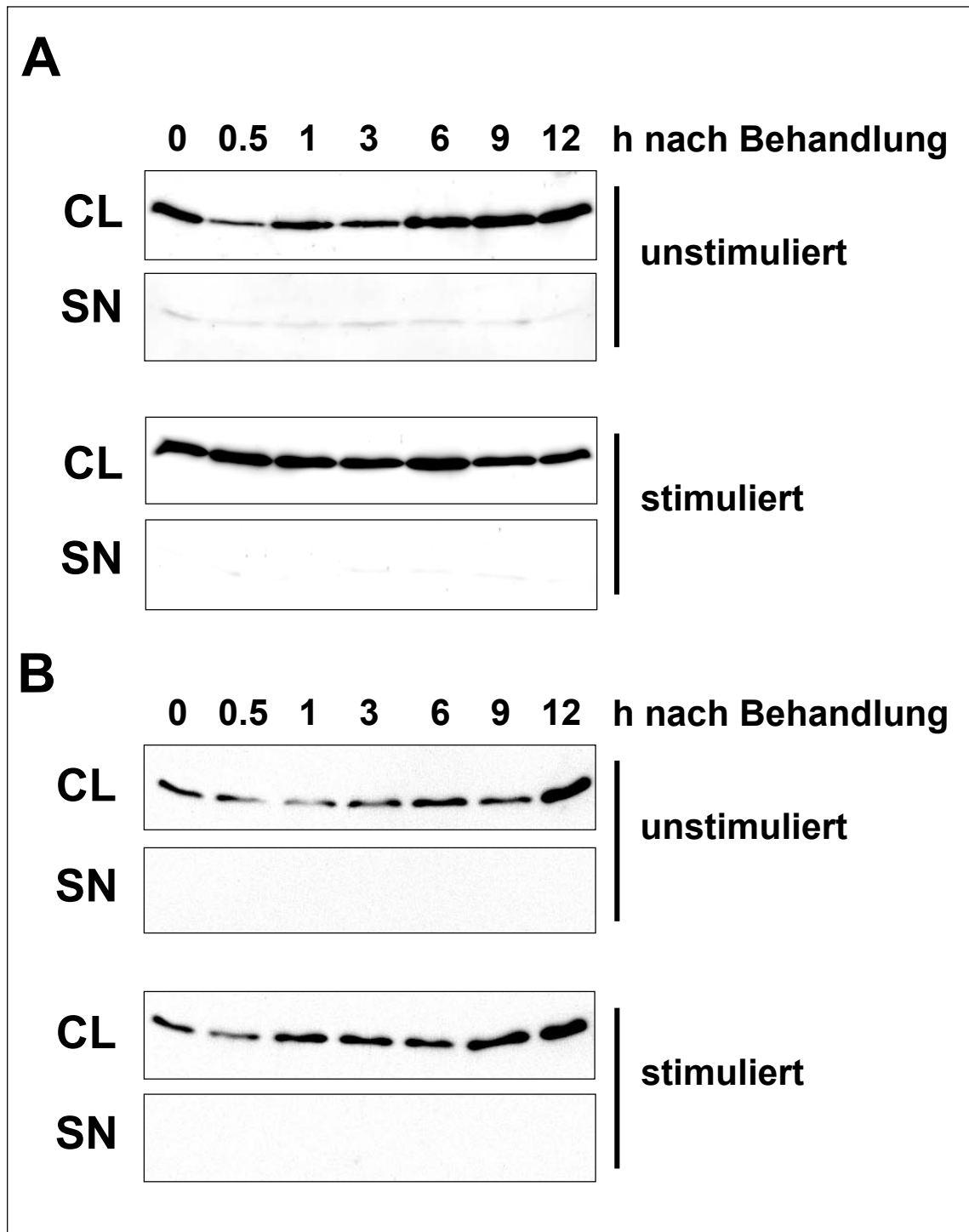


Abb. 6: Ausschüttung von endogenem MIF und HA-MIF nach Hitzeschock-Stimulation. 1 Mio HeLa Zellen (**A**) bzw. HA-MIF42.1 Zellen (**B**) wurden in 35 mm Ø Schalen ausgesät, 30 min bei 37°C (unstimuliert) bzw. 42°C (stimuliert) inkubiert und nach Medienwechsel weiter bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen in RIPA-Lysispuffer lysiert. 10 µg TCA-präzipitierte Zelllysate (CL) und 100 µg TCA-präzipitierte Überstände (SN) wurden mittels 16.5% Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. **A**, Die Detektion von endogenem MIF in HeLa Zellen erfolgte durch Inkubation des Western Blots mit Ka565 Anti-MIF Antiserum. **B**, Die Detektion von HA-MIF in HA-MIF42.1 Zellen erfolgte durch Inkubation des Western Blots mit sc-805 Anti-HA-IgG.

Abb. 6 B zeigt, dass auch HA-MIF weder von unstimulierten noch von stimulierten Zellen ausgeschüttet wurde. Obwohl die Expression von MIF in Hitzeschock-stimulierten Zellen mit der Zeit ansteigt, wird auch HA-MIF offenbar nicht aus HeLa-Zellen transportiert. Die Vermutung liegt daher nahe, dass HeLa-Zellen einen anderen MIF-Sekretionsweg besitzen oder gar MIF überhaupt nicht sezernieren, unabhängig davon, ob es sich um endogenes oder Epitop-*getaggt*es MIF handelt. Dass MIF nur aus unstimulierten HeLa Zellen ins Medium gelangt, könnte darauf hinweisen, dass noch ein weiterer konstitutiver Sekretionsweg existiert. Dieser Weg ist wahrscheinlich Zelltyp-unabhängig, da diese Beobachtungen auch in THP-1 und anderen Immunzellen gemacht wurden.

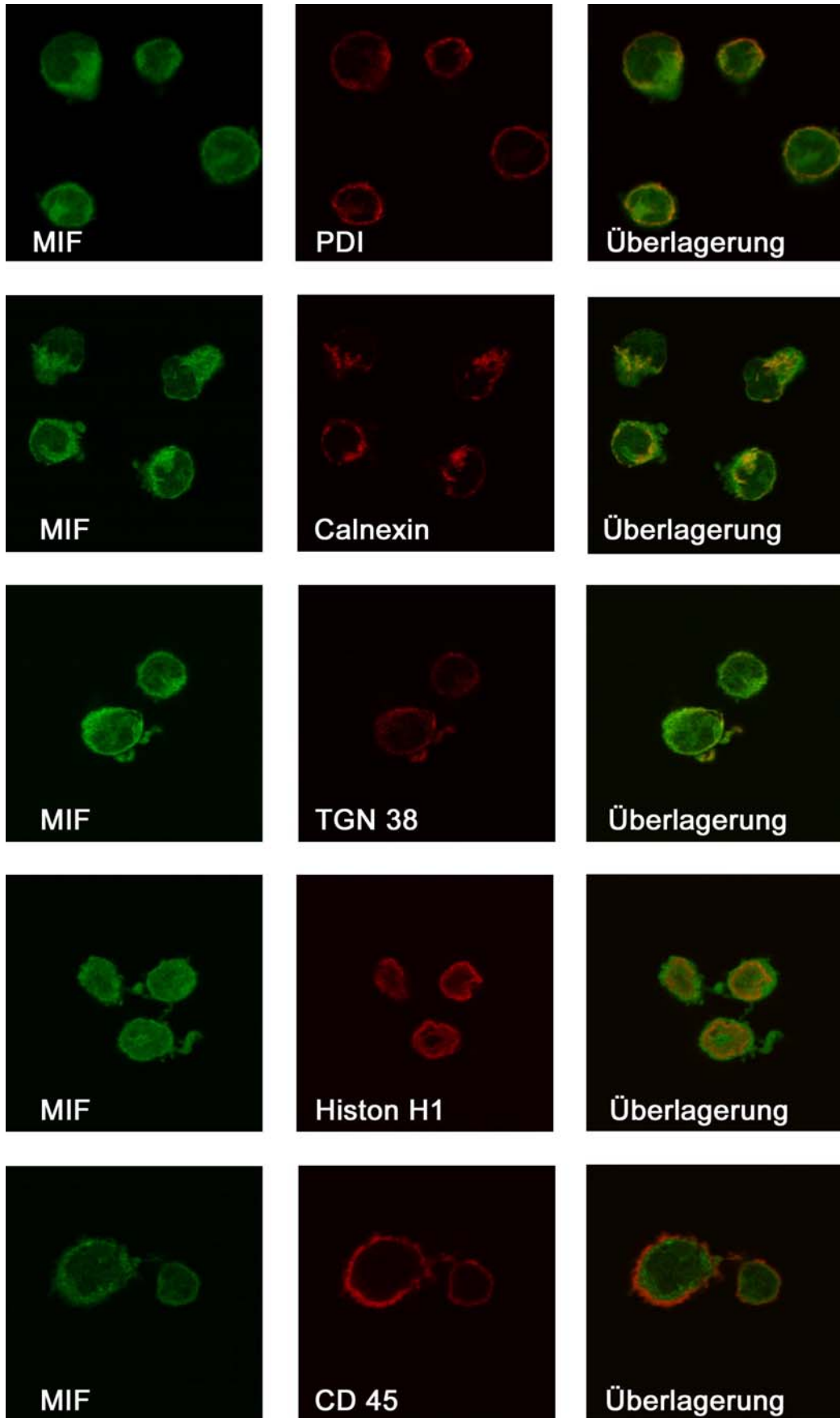
6.4 Intrazelluläre Lokalisation von MIF

Nachdem MIF aufgrund fehlender N-Glykosylierung nicht in den ER-Golgi-Transportweg eintritt und aus HeLa Zellen überhaupt nicht sezerniert wird, stellt sich nun die Frage, in welchen subzellulären Kompartimenten der Zelle das LLS-Protein MIF nachgewiesen werden kann.

Arbeiten von Nishino und Kollegen haben gezeigt, dass MIF im Hypophysenvorderlappen ausschließlich in ACTH- oder TSH-sezernierenden Zellen vorliegt. Dort colokalisiert MIF in Granulen, die entweder ACTH oder TSH enthalten (Nishino, 1995). MIF wurde außerdem in β -Zellen des Pankreas nachgewiesen, wo es zusammen mit Insulin in sekretorischen Vesikeln vorliegt (Waeber, 1997). Desweiteren wurde MIF in Epithelzellen des Nebenhodens nachgewiesen, wo es hauptsächlich cytosolisch, nicht jedoch im ER oder im Golgi-Apparat vorliegt (Eickhoff, 2001). Bemerkenswerterweise wurden jedoch in der Epididymalflüssigkeit MIF-positive Vesikel entdeckt, die von der apikalen Plasmamembran entlassen wurden. In neuronalen und nicht-neuronalen Zellen von Hippocampus und Neocortex wurde eine diffuse Verteilung in Cytoplasma und Kern beschrieben (Vedder, 2000). Für die meisten Zellen wurde die genaue subzelluläre Lokalisation von MIF jedoch noch nicht untersucht. Insbesondere zur subzellulären Lokalisation in Immunzellen liegen keine Daten vor.

Um herauszufinden, ob MIF in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 in Organellen gefunden werden kann, wurden Paraformaldehyd-fixierte Zellen mit Anti-MIF-Antikörper und Antikörpern gegen typische Markerproteine verschiedener Zellorganellen inkubiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) analysiert. Abb. 7 zeigt, dass MIF nicht mit den bekannten Markerproteinen Calnexin (ER-Membran), TGN 38 (*trans*-Golgi), Histon H1 (Kern) oder CD 45 (Plasmamembran) colokalisierte. Einzig bei PDI (ER-Lumen) waren bei der Überlagerung der beiden Signale in Nähe zur Plasmamembran schwache gelbe Signale sichtbar, die auf eine partielle Colokalisation hinweisen könnten. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass PDI, das keine hydrophobe Signalsequenz besitzt, neben seiner vorherrschenden Lokalisation im ER auch nach Sekretion an der Oberfläche der Plasmamembran nachgewiesen wurde (Terada, 1995).

Neben den Daten zur N-Glykosylierung von MIF weisen auch die Immunfluoreszenzfärbungen in THP-1 Zellen auf einen Sekretionsweg hin, der nicht über ER und Golgi-Apparat verläuft. Die mögliche partielle Colokalisation von PDI und MIF könnte damit zusammenhängen, dass beide Proteine gemeinsam einen Teil eines unkonventionellen Sekretionsweges benutzen. Da THP-1 Zellen morphologisch nur unbefriedigend zu untersuchen sind, konnte eine vesikuläre Lokalisation von MIF nicht etabliert werden.



6.5 Kinetik des Exports von humanem MIF

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MIF nicht nur auf Makrophagen wirkt, sondern von diesen auch nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise aus vorgeformten *pools* ausgeschüttet wird (Calandra, 1994). Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades reagieren sehr verschieden auf Stimulation mit LPS oder PMA.

Im etablierten Sekretionsassay (Flieger, 1999) erreichte die MIF-Konzentration im Überstand von mit 10 µg/ml LPS stimulierten THP-1 Monozyten bereits nach 2 h den höchsten Wert mit ca. 6fach erhöhter Ausschüttung, blieb bis 6 h etwa konstant und nahm dann rasch bis 11 h nach Stimulationsbeginn ab (Abb. 8 A). Die MIF-Ausschüttung unstimulierter Zellen stieg konstant auf einem niedrigen Niveau bis 11 h auf das 1.3fache an. Verfolgt man die Ausschüttung von *de novo*-synthetisiertem MIF, beobachtet man, dass der Gehalt an MIF intrazellulär während der *chase*-Periode bis 4.5 h nach Markierung mit [³⁵S] praktisch konstant bleibt (Abb. 8 B). Stimulation mit LPS bewirkt erst nach 7.5 h eine verstärkte Ausschüttung von MIF ins Medium, verglichen mit unstimulierten Zellen. Die MIF-Menge im Medium schien bei stimulierten Zellen während der gesamten *chase*-Periode anzusteigen. THP-1 Zellen scheinen das Zytokin MIF also nach Stimulation mit LPS sowohl aus vorgeformten intrazellulären Pools, als auch nach Neusynthese mit einer ähnlichen Kinetik auszuschütten. In beiden experimentellen Systemen konnte MIF über einen Zeitraum von 4-7 h im Medium nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten wurde daher die Ausschüttung von vorgeformtem MIF aus THP-1 Zellen mittels ELISA analysiert.

Abb. 7: Subzelluläre Lokalisation von MIF in THP-1 nach Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. THP-1 Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser getropft, nach Adhäsion fixiert und zur Färbung vorbereitet. Die Zellen wurden mit Anti-MIF-Antikörper und Antikörpern gegen die Zellorganellmarker PDI (ER-Lumen), Calnexin (ER-Membran), TGN 38 (*trans*-Golgi) Histon H1 (Kern) und CD 45 (Plasmamembran) inkubiert. MIF wurde indirekt über Alexa488-markierte F(ab)₂-Fragmente (grün dargestellt), die Zellorganellmarker über Alexa555-markierte F(ab)₂-Fragmente (rot dargestellt) markiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Die Bildebenen entsprechen einer Schichtdicke von 0.5 µm. Bereiche, in denen das grüne und rote Signal colokalisieren, sind durch computerunterstützte Überlagerung der beiden Farben in Gelb dargestellt.

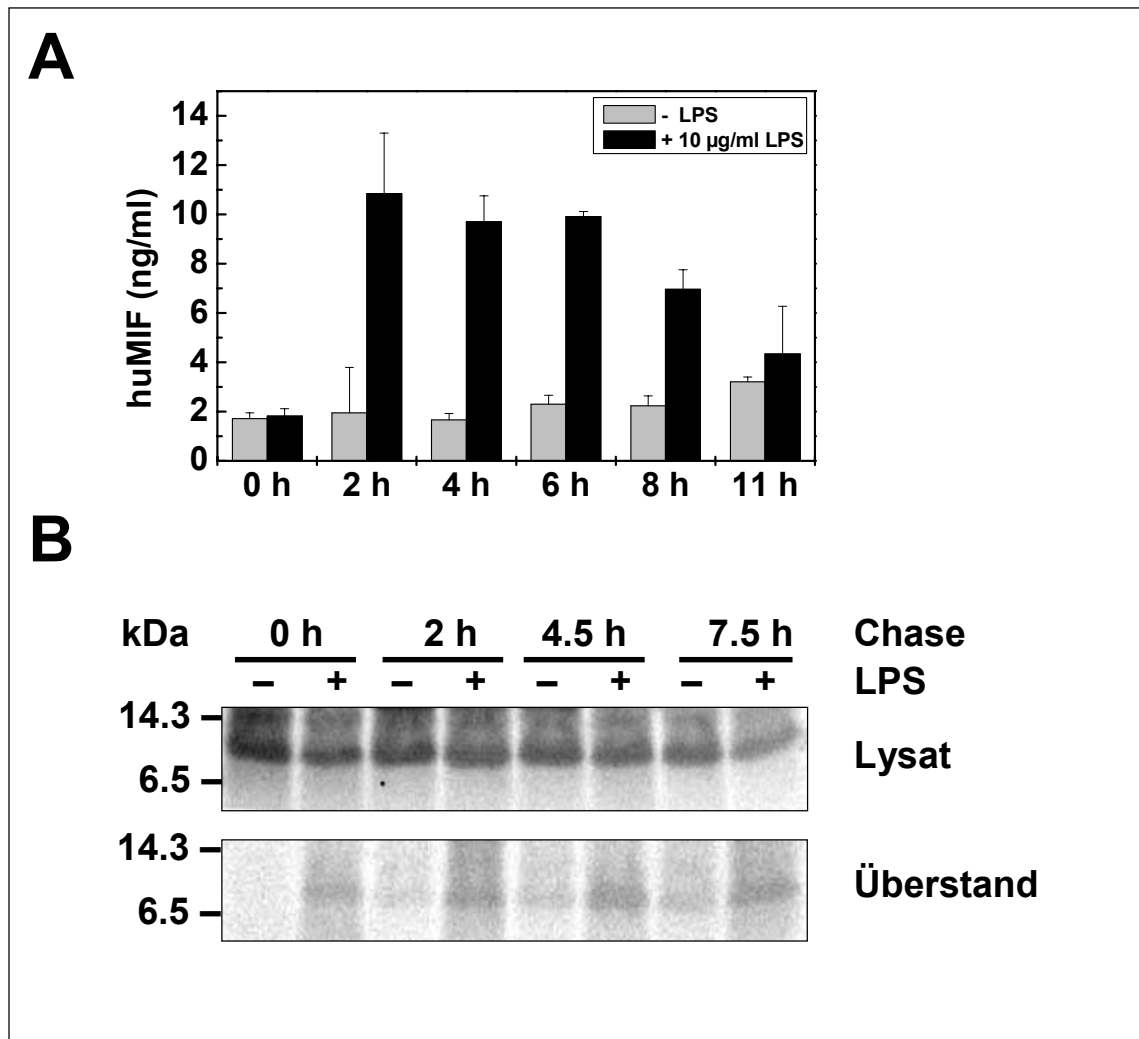


Abb. 8: Kinetik des Exports von vorgeformtem und neusynthetisiertem MIF. **A**, THP-1-Zellen wurden ohne (-) oder mit (+) 10 µg/ml LPS für die angegebenen Zeiten inkubiert und zellfreie Überstände mittels huMIF-ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments (n=4). **B**, THP-1 Zellen wurden für die *pulse*-Periode 2 h mit [³⁵S]-PROMIX inkubiert und anschließend für 0, 2, 4.5 und 7 h ohne (-) oder mit (+) 10 µg/ml LPS *gechased*. RIPA-Zelllysate (Lysat) und zellfreie Überstände (Überstand) wurden mit Ka565 Anti-MIF-Antikörper immunpräzipitiert, mittels 18% Laemmli-SDS-PAGE aufgetrennt und im Phosphor-Imaging-System analysiert. Die relevanten Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite dargestellt.

6.6 Einfluß von Inhibitoren des klassischen Sekretionswegs

Wie bereits beschrieben, weisen verschiedene Eigenschaften von MIF darauf hin, dass MIF nicht über den klassischen Sekretionsweg von ER über Golgi zur Plasmamembran aus der Zelle transportiert wird:

- MIF besitzt weder eine N-terminale noch eine interne hydrophobe Signalsequenz, die das neusynthetisierte Protein durch ER und Golgi dirigieren könnte.
- Endogenes und sezerniertes MIF weisen keine N-Glykosylierung auf, die mit PNGase F abgespalten werden kann.
- *In vitro*-translatiertes MIF wird nicht posttranslational prozessiert und in Mikrosomen glykosyliert.

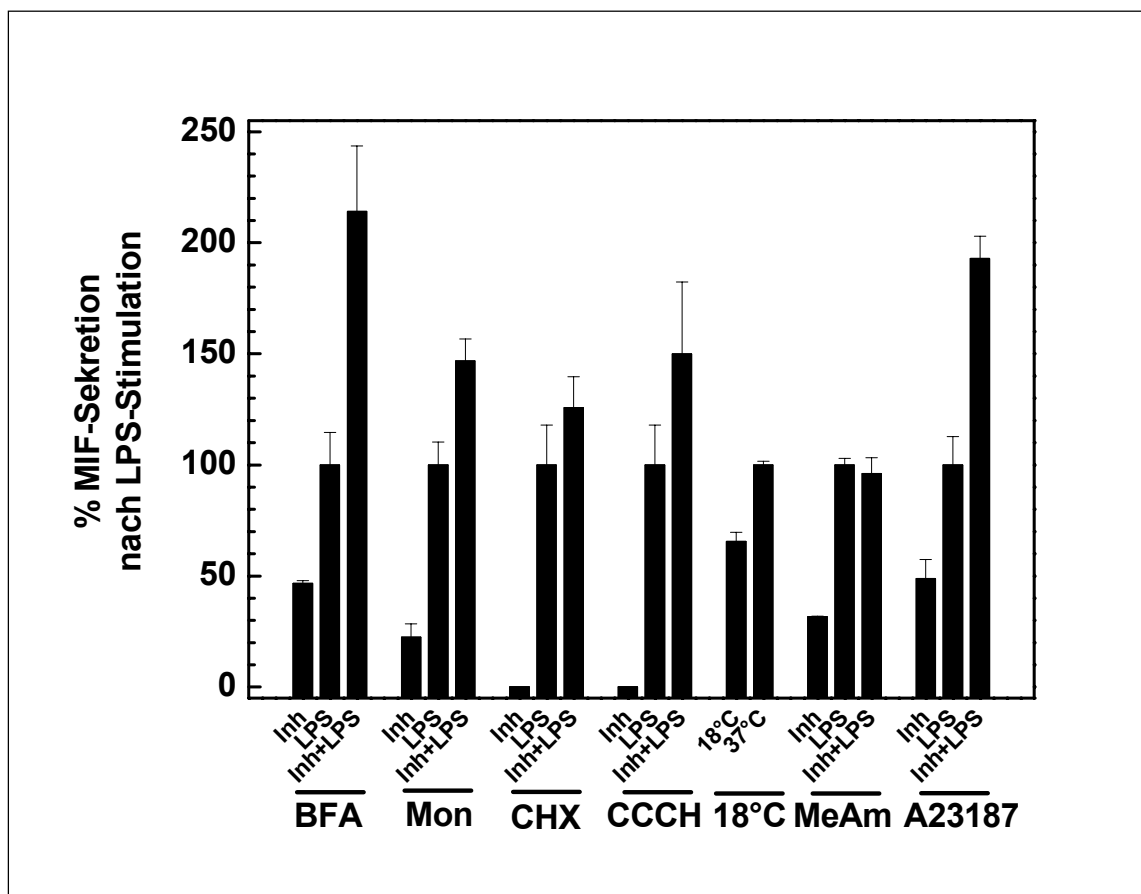


Abb. 9: Effekt klassischer Inhibitoren auf die MIF-Sekretion in THP-1 Zellen. THP-1-Zellen wurden in 12-Well-Platten ausgesät und das Medium mit Inhibitor oder Kontrollpuffer konditioniert. Nach 45 min wurden die Zellen mit 10 µg/ml LPS stimuliert oder mit PBS behandelt, nach weiteren 4 h wurde das Medium abgenommen und mittels huMIF-ELISA analysiert. Inhibitoren wurden zu folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Brefeldin A (BFA, 0.5 µg/ml), Monensin (Mon, 5 µg/ml), Cycloheximid (CHX, 2 µg/ml), CCCH (10 µM), Methylamin (MeAm, 10 mM), Calciumionophor A23187 (A23187, 1 µg/ml). Beim 18°C-Temperaturblock (18°C) wurden die Zellen 4 h entweder bei 18°C oder bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten oder Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=5). Die Daten wurden dargestellt als relative MIF-Sekretion LPS-stimulierter Zellen, wobei die LPS-Kontrolle gleich 100% gesetzt wurden. Inh, Inhibitor alleine (Negativkontrolle); LPS, LPS alleine (Positivkontrolle); Inh+LPS, LPS-Stimulation 45 min nach Zugabe des Inhibitors.

Durch die Verwendung von Inhibitoren, die spezifisch auf einzelne Kompartimente des klassischen Sekretionswegs wirken, sollte weiter bewiesen werden, dass MIF nach Stimulation mit LPS die Zelle nicht über den klassischen Sekretionsweg, sondern über eine alternative Route verlässt.

In Abb. 9 ist zu erkennen, dass keiner der Inhibitoren in der Lage ist, die MIF-Sekretion nach LPS-Stimulation zu unterdrücken. Im Gegenteil, Brefeldin A (blockiert den Transport zwischen ER und *cis*-Golgi), Monensin (blockiert zwischen *cis*- und *trans*-Golgi), Cycloheximid (inhibiert die Proteinsynthese), CCCH (ein Entkoppler des Elektronentransports) und A23187 (ein Calciumionophor) verstärken sogar noch die LPS-stimulierte Ausschüttung von MIF. Nur Methylamin (ein Endocytose-Inhibitor) scheint die Sekretion weder zu stimulieren noch zu inhibieren. Brefeldin A, Methylamin und A23187 alleine scheinen die MIF-Sekretion zu verstärken. Cytotoxische Effekte aller Inhibitoren oder ihrer Lösungsmittel (Endkonzentration von Methanol und DMSO im Medium $\leq 0.1\%$) konnten jedoch ausgeschlossen werden, da die Vitalität der Zellen (gemessen mittels Trypanblau-Färbung der Zellen und LDH-Assay des Überstands) generell über 90 % lag (Daten nicht gezeigt).

Brefeldin A und Monensin haben eine ungewöhnlich stark stimulierende Wirkung, was die Vermutung nahe legt, dass MIF nicht über den ER-Golgi-Weg aus der Zelle gelangt.

Cycloheximid wirkte ebenfalls stimulierend, folglich scheint die Neusynthese für die LPS-stimulierbare MIF-Ausschüttung nicht signifikant zu sein. Außerdem spielte möglicherweise ein energieunabhängiger Mechanismus eine Rolle, da der Entkoppler CCCH die MIF-Sekretion nicht zu unterdrücken vermochte.

Methylamin schien die Sekretion weder stimulierend noch inhibierend zu beeinflussen.

A23187, das stimulierend auf die Ca^{2+} -abhängige Exocytose wirkt, verstärkte auch die MIF-Ausschüttung – ein Effekt, der auch bei der Sekretion von MIF aus Peritoneal-Makrophagen (Sakamoto, 1998), von IL-1 β aus PBMC (Rubartelli, 1990) und von Galektin-3 aus BHK und MDCK Zellen (Sato, 1993) (Lindstedt, 1993) beobachtet wurde. Ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel scheint auch bei Transportprozessen von MRP8/MRP14 eine Rolle zu spielen (Rammes, 1997).

Zwar kommt es nach Zugabe von A23187 zur Translokation an Intermediatfilamente und Plasmamembran, ein direkter Zusammenhang zur Sekretion konnte jedoch nicht hergestellt werden.

Beim 18°C-Temperaturblock, bei dem der Proteintransport im TGN angehalten wird, wurde MIF vermindert aus der Zelle ins Medium transportiert.

Die Daten der klassischen Inhibitoren scheinen also insgesamt darauf hinzuweisen, dass MIF zwar nicht über ER und Golgi – belegt durch den fehlenden inhibitorischen Effekt von Brefeldin A und Monensin – aber möglicherweise trotzdem über einen vesikulären Schritt aus der Zelle transportiert wird, da A23187 stimulierend und der 18°C-Temperaturblock blockierend wirkte.

6.7 Tubulin-abhängige Sekretion von MIF

6.7.1 Einfluß von Inhibitoren des Tubulin-Systems

Wie bereits beschrieben, wurde als alternativer Sekretionsweg für MRP8/MRP14 ein Tubulin-abhängiger Mechanismus vorgeschlagen (Rammes, 1997). Rammes und Kollegen fanden heraus, dass die PMA-stimulierte MRP8/MRP14-Sekretion aus humanen Monozyten nicht mit Monensin und Brefeldin A, jedoch mit Inhibitoren, die auf die Tubulinpolymerisation wirken, unterdrückt werden konnte. Auch für Galektin-3 wurde diese Möglichkeit des Exports in Erwägung gezogen (Sato, 1993) (Lindstedt, 1993). Cytochalasin und Colchicin hatten keinen Einfluß auf die Galektin-3-Sekretion, Nocodazol jedoch vermochte den Export des Lektins zu vermindern.

Um zu testen, ob MIF ebenfalls über diesen Weg aus der Zelle transportiert wird, wurden im MIF-Sekretionsassay die Inhibitoren Colchicin, Demecolcin, Paclitaxel, Taxol, Tubulozol und Nocodazol verwendet. Im Gegensatz zu MRP8/MRP14 und analog zu Galektin-3 wurde, wie in Abb. 10 dargestellt, die MIF-Sekretion nur durch Nocodazol, nicht jedoch durch Colchicin oder Demecolcin bzw. deren Homologe, inhibiert. Es fällt dabei auf, dass Nocodazol

einen inhibitorischen Effekt über einen sehr weiten Konzentrationsbereich von 0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ ausübt.

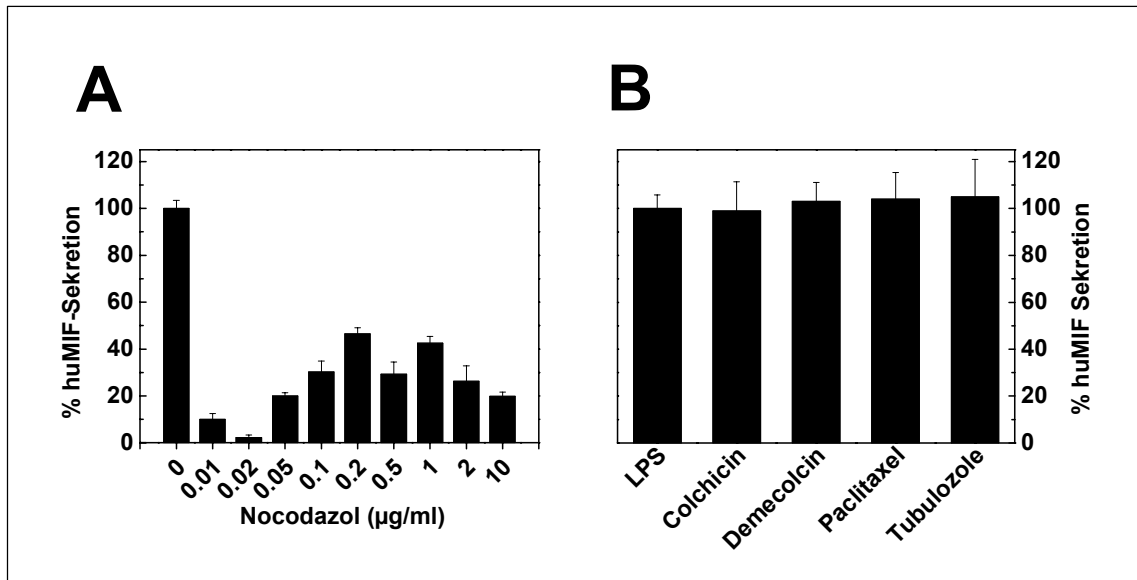


Abb. 10: Der Inhibitor der Tubulin-Polymerisation Nocodazol reduziert die MIF-Sekretion in THP-1-Zellen. THP-1-Zellen wurden in 12-*well*-Platten ausgesät und das Medium mit Inhibitor oder Kontrollpuffer konditioniert. Nach 45 min wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert oder mit PBS behandelt, nach weiteren 4 h wurde das Medium abgenommen und mittels huMIF-ELISA analysiert. **A**, Nocodazol wurde zur Endkonzentration von 0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. **B**, Keinen Einfluß auf die MIF-Sekretion hatten Colchicin (0.1 $\mu\text{g/ml}$), Demecolcin (0.5 $\mu\text{g/ml}$), Paclitaxel (1 $\mu\text{g/ml}$), und Tubulozole (0.1 $\mu\text{g/ml}$). Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten oder Triplikaten eines repräsentativen Experiments ($n=3$). Die Daten wurden dargestellt als relative MIF-Sekretion LPS-stimulierter Zellen, wobei die LPS-Kontrolle gleich 100% gesetzt und Werte für Inhibitor alleine bzw. Kontrollpuffer abgezogen wurden.

6.7.2 MAP 1A als möglicher Interaktionspartner von MIF

Parallel zu den Ergebnissen, dass MIF möglicherweise über einen Tubulin-Netzwerk-abhängigen Sekretionsweg exportiert wird, wurde in unserem Labor in einem *Two-Hybrid-Screen* auf MIF-Bindungsproteine das *microtubule-associated protein 1A* (MAP1A) als Bindungspartner von MIF identifiziert. Um zu überprüfen, ob zwischen beiden Proteinen eine direkte Interaktion besteht, wurde MAP1A zunächst in Gesamt-Zelllysaten nachgewiesen. Versuche, MAP1A in P19, einer Zelllinie aus einem Maus-Embryonalkarzinom, nachzuweisen, scheiterten (Daten nicht gezeigt). In diesen Zellen wird die Expression von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen während der Differenzierung in Nervenzellen reguliert (Drubin, 1985). Möglicherweise wird MAP1A in bereits ausdifferenzierten Nervenzellen stärker exprimiert und konnte deshalb in

Embryonalzellen nicht nachgewiesen werden. Daher wurde die Zelllinie C6-BU-1 aus einem Ratten-Gehirntumor verwendet, um MAP1A nachzuweisen. Doch auch in diesen Zellen wurde MAP1A nur nachgewiesen, wenn die Zellen direkt in 2x SLB aufgenommen wurden (Abb. 11 A). Andere Lysisbedingungen, die für Co-Immunopräzipitations (CoIP)-Studien geeignet gewesen wären, erlaubten nur die Detektion sehr geringer Mengen MAP1A. Dennoch wurden CoIP-Studien mit MIF und MAP1A unter unterschiedlichsten Pufferbedingungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Keine der Bedingungen erlaubte jedoch die Detektion einer direkten Protein-Protein-Interaktion von MIF und MAP1A.

Um eine Interaktion auf zellulärer Ebene nachzuweisen, wurden MIF und MAP1A in C6-BU-1 Zellen mittels Immunfluoreszenz detektiert und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert (Abb. 11 B). Zwar werden sowohl MIF als auch MAP1A in ausreichender Menge in diesen Zellen exprimiert, aber eine Colokalisation konnte nicht nachgewiesen werden. MAP1A schien sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert zu sein, wohingegen MIF nur sehr schwach unter der Plasmamembran und an wenigen Stellen im Cytosol akkumuliert nachgewiesen werden konnte.

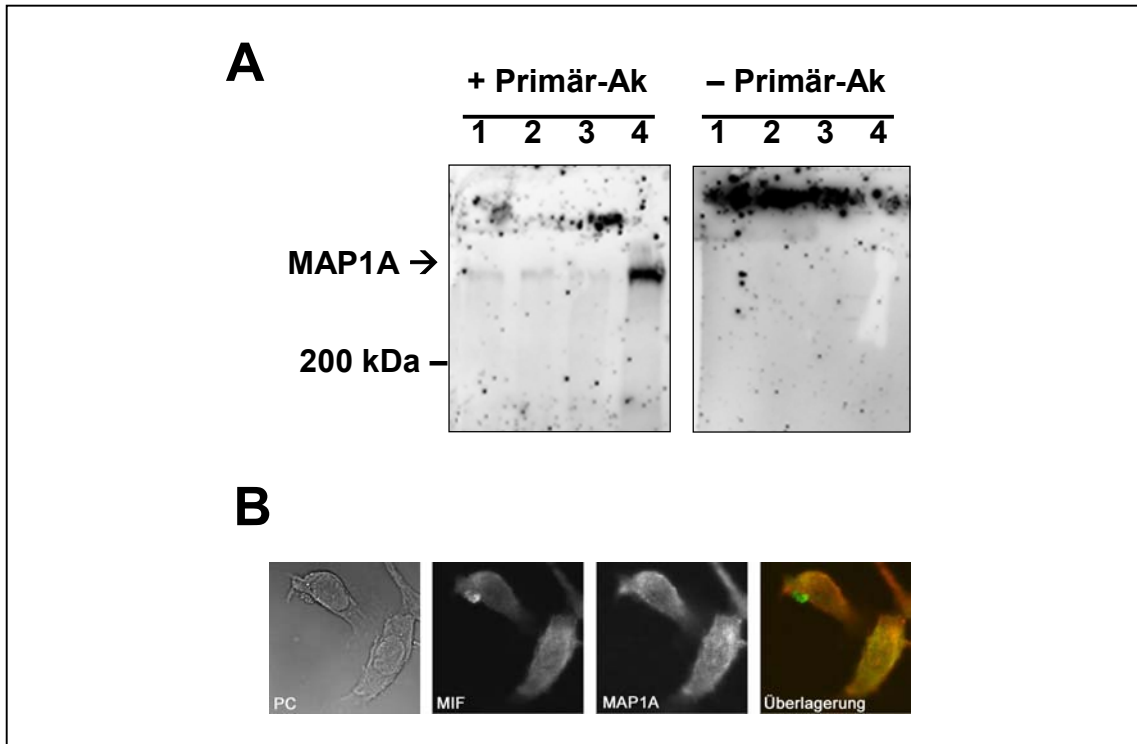


Abb. 11: Nachweis von MAP1A in C6-BU-1 Zellen. **A**, C6-BU-1 Zellen wurden in HNT-Lysispuffer (1), RIPA-Lysispuffer (2), Drubin-Lysispuffer (3), oder 2x SLB (4) lysiert, 50 µg Zellysate mittels 5% Laemmli-SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Inkubation des Western Blots mittels HM-1 Anti-MAP1A-Antikörper (linkes Bild) bzw. ohne Antikörper (rechtes Bild). Relevante Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand dargestellt. Die Position der MAP1A-Bande wurde durch einen Pfeil markiert. **B**, C6-BU-1 wurden auf Deckgläsern ausgesät, fixiert und mit Ka565 Anti-MIF- und HM-1 Anti-MAP1A-Antikörper inkubiert. MIF wurde indirekt über FITC-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG und MAP1A über Cy3-konjugierte Anti-Maus-IgG markiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Bei der computerunterstützten Überlagerung der beiden Signale wurden MIF grün, MAP1A rot und die Colokalisation gelb dargestellt. PC, Phasenkontrast-Aufnahme.

Der Export von MIF scheint also von einem intakten Tubulin-Netzwerk der Zelle abhängig zu sein. Nocodazol, nicht jedoch andere Tubulin-Polymerisations-Inhibitoren, inhibieren signifikant die MIF-Ausschüttung aus Immunzellen. Eine direkte Interaktion mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP1A konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass MIF nicht direkt, sondern über Vesikel mit dem Tubulin-Netzwerk assoziiert und exportiert wird.

6.8 Einfluß von Inhibitoren von ABC-Transporterproteinen

Für verschiedene LLS-Proteine, wurden Transportprozesse vorgeschlagen, die im Zusammenhang mit dem Phänomen der *multidrug resistance* stehen bzw. bei deren Export aus der Zelle ABC-Transporterproteine eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Die Interleukin-1 β Sekretion wird inhibiert, wenn ABC-Transporter u.a. durch Glyburid, DIDS oder Bromosulfophtalein inhibiert werden (Hamon, 1997; Andrei, 1999). Für den *basic fibroblast growth factor* (bFGF bzw. FGF-2) wurde dieser inhibitorische Effekt zwar mit Probenecid in der Osteosarkom-Zelllinie MG-63 beobachtet (Aggarwal and Gupta, 1998), in FGF-2 transfizierten COS-1 Zellen jedoch zeigten verschiedene ABC1-Transporter- und P-Glycoprotein-Inhibitoren keine Wirkung (Florkiewicz, 1998). Da die Studien zum MIF-Export in Gegenwart von Inhibitoren der Tubulinpolymerisation sowie zur MIF/MAP1A/Tubulin-Colokalisation keinen eindeutigen Hinweis auf einen Sekretionsweg geliefert hatten, wurde im Folgenden untersucht, ob der MIF-Export in ABC-Transporter-vermittelter Weise erfolgen könnte. Im MIF-Sekretionsassay wurden deshalb Glyburid (Glybenclamid) und Probenecid getestet. Glyburid inhibiert die MIF-Sekretion über einen weiten Konzentrationsbereich (Abb. 12 A). Um zu testen, ob der inhibitorische Effekt allgemein auf LLS-Proteine wirkt, wurden die Überstände außerdem im TNF-ELISA gemessen. In Abb. 12 B ist zu erkennen, dass die ins Medium sezernierte Menge an TNF bei niedriger Glyburid-Konzentration um ca. 30% abnahm, bei hohen Konzentrationen – bei der auch die MIF-Sekretion am stärksten reduziert wurde – jedoch keine nennenswerte Reduktion der TNF-Sekretion beobachtet wurde. Dass ABC1-Blocker marginal auch die TNF-Sekretion beeinflussen, wurde schon bei der Sekretion von IL-1 β beobachtet (Hamon, 1997). Dort reduzierte der Inhibitor DIDS die IL-1 β -Sekretion in konzentrationsabhängiger Weise, verminderte aber auch den Export von TNF ins Medium um ca. 25%.

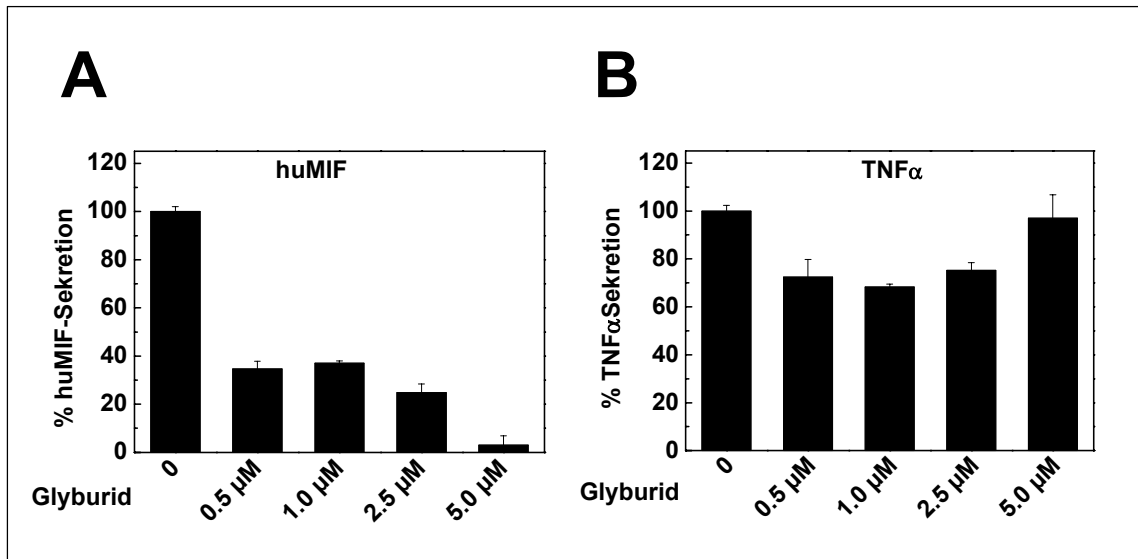


Abb. 12: Der ABC1-Transporter-Inhibitor Glyburid reduziert die MIF-Sekretion in THP-1-Zellen. THP-1-Zellen wurden in 12-well-Platten ausgesät und das Medium mit Glyburid (0.5-5 μ M Endkonzentration) oder Kontrollpuffer konditioniert. Nach 45 min wurden die Zellen mit 10 μ g/ml LPS stimuliert oder mit PBS behandelt, nach weiteren 4 h wurde das Medium abgenommen und mittels huMIF-ELISA (**A**) und huTNF-ELISA (**B**) analysiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=4). Die Daten sind dargestellt als relative Sekretion von MIF bzw. TNF LPS-stimulierter Zellen, wobei die LPS-Kontrolle gleich 100% gesetzt und Werte für Inhibitor alleine abgezogen wurden.

Abb. 13 zeigt den Effekt, den Probenecid auf die Sekretion von MIF und TNF bewirkte. Wie bereits bei Glyburid, war auch Probenecid in der Lage, die MIF-Sekretion um nahezu 100% zu reduzieren, während die TNF-Sekretion nicht beeinflusst wurde. Probenecid hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen, die entweder durch Messung der LDH-Konzentration im Medium oder durch Trypanblau-Färbung der Zellen verfolgt wurde (Daten nicht gezeigt). Um herauszufinden, ob der Export von MIF nur von einer bestimmten Subklasse der ABC-Transporter vermittelt wird bzw. ob die Inhibitoren sehr spezifisch auf den MIF-Export wirken, wurden neben Glyburid und Probenecid weitere ABC-Transporter Inhibitoren getestet. In Abb. 14 ist zu erkennen, dass die Inhibitoren BSP und DIDS, zu deren Zielstrukturen ABC1-Transporter gehören, die MIF-Sekretion nicht unterdrücken. Es fällt außerdem auf, dass bereits unstimulierte Zellen stark erhöhte MIF-Ausschüttung zeigten, was auf einen unspezifischen Mechanismus der MIF-Ausschüttung durch die beiden Substanzen hinweist oder durch cytotoxische Effekte verursacht wurde. Verapamil, ein Inhibitor von P-Glykoproteinen, reduziert die MIF-Sekretion dagegen signifikant um ca. 25%.

Ein weiterer Inhibitor – der Komplexbildner 1,10-Phenanthrolin – reduziert die MIF-Sekretion drastisch, wohingegen der Metalloproteinase-Inhibitor Benzamidin-HCl wiederum keinen Einfluß auf den MIF-Export hat.

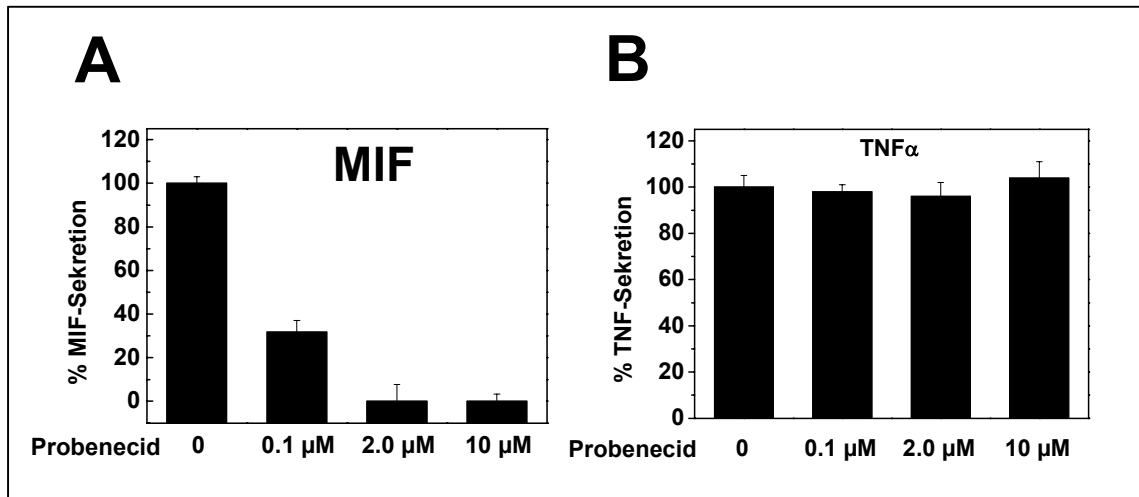


Abb.13: Der ABC1-Transporter-Inhibitor Probenecid reduziert die MIF-Sekretion in THP-1-Zellen. THP-1-Zellen wurden in 12-*well*-Platten ausgesät und das Medium mit Probenecid (0.1-10 µM Endkonzentration) oder Kontrollpuffer konditioniert. Nach 45 min wurden die Zellen mit 10 µg/ml LPS stimuliert oder mit PBS behandelt, nach weiteren 4 h wurde das Medium abgenommen und mittels huMIF-ELISA (**A**) und huTNF-ELISA (**B**) analysiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=3). Die Daten sind dargestellt als relative Sekretion von MIF bzw. TNF LPS-stimulierter Zellen, wobei die LPS-Kontrolle gleich 100% gesetzt und Werte für Inhibitor alleine abgezogen wurden.

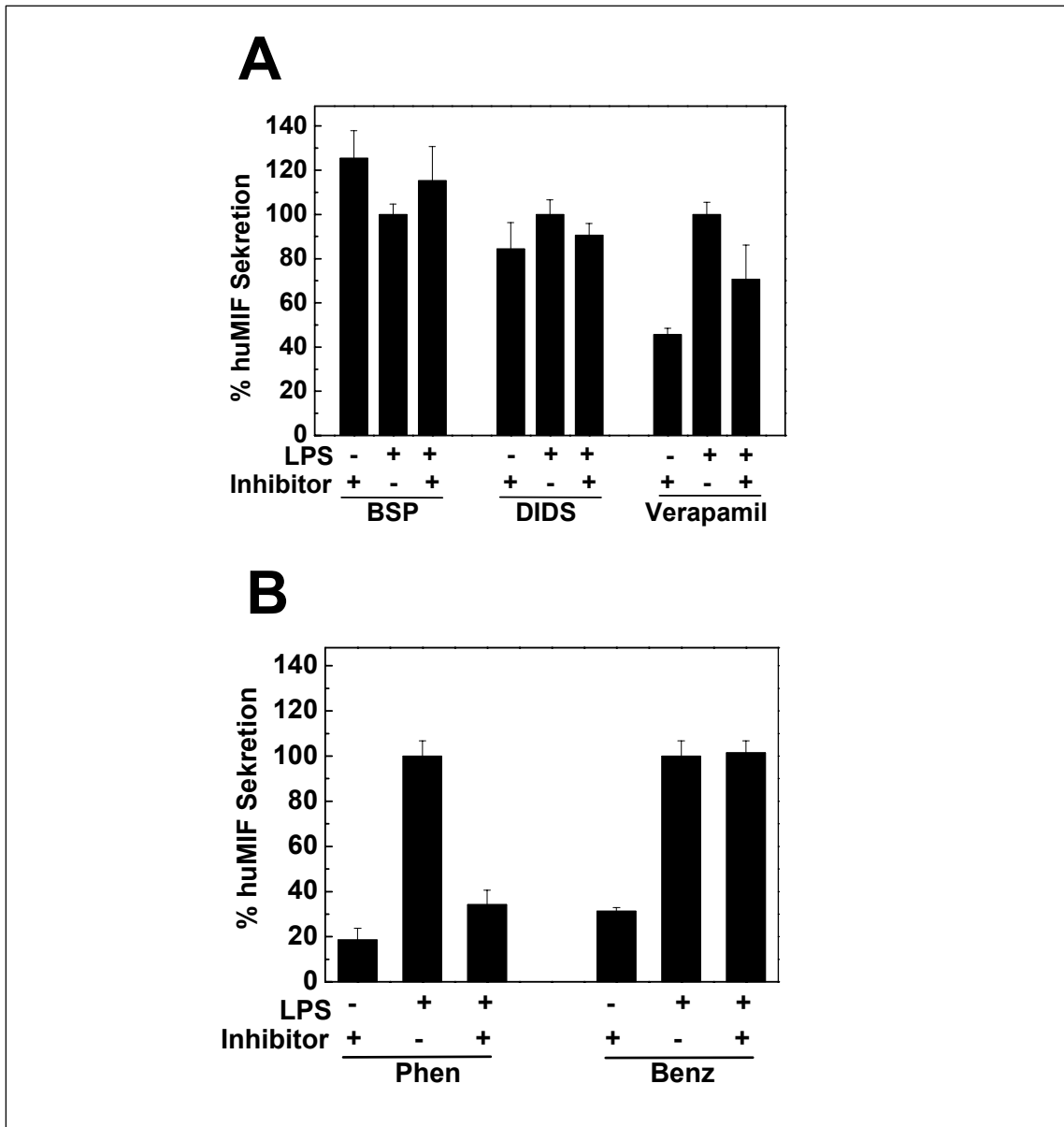


Abb. 14: Effekt verschiedener ABC-Blocker auf die MIF-Sekretion in THP-1-Zellen. THP-1-Zellen wurden in 12-well-Platten ausgesät und das Medium mit Inhibitor oder Kontrollpuffer konditioniert. Nach 45 min wurden die Zellen mit 10 µg/ml LPS stimuliert oder mit PBS behandelt, nach weiteren 4 h wurde das Medium abgenommen und mittels huMIF-ELISA analysiert. **A**, Inhibitoren der ABC-Transporter oder von P-Glykoprotein wurden zu folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Bromosulphthalein (BSP) 4 µM, DIDS 500 µM und Verapamil (Vera) 15 µM. **B**, Der Komplexbildner 1,10-Phenanthrolin (Phen) wurde 50 µM und der Metalloproteinase-Inhibitor Benzamidin-HCl (Benz) 20 µM verwendet. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten oder Triplikaten eines repräsentativen Experiments (n=2). Die Daten sind dargestellt als relative MIF-Sekretion LPS-stimulierter Zellen, wobei die LPS-Kontrolle gleich 100% gesetzt wurde.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Glyburid und Probenecid den MIF-Export aus vorgeformten Pools signifikant inhibieren, ohne dass die Sekretion des klassisch sezernierten TNF beeinflusst wird. Das enge Spektrum an ABC-Transporter-Inhibitoren, die die alternative Ausschüttung von MIF inhibieren, betont die Spezifität der Inhibition von Glyburid und Probenecid und weist auf die Beteiligung nur weniger Mitglieder der ABC-Transporter-Familie am MIF-Export hin. Versuche mit *pulse-chase*-markiertem MIF haben gezeigt, dass Glyburid den Export von neusynthetisiertem MIF möglicherweise nicht inhibiert (Daten nicht gezeigt). Über einen genauen Mechanismus der Glyburid- und Probenecid-vermittelten Inhibition kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

7 Diskussion

Der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor (MIF) wird in vielen Organen konstitutiv exprimiert. In Nagern wurde MIF in Haut, Hypophyse, Leber, Milz und Niere sowie sehr schwach exprimiert auch in Lunge und Nebenniere nachgewiesen (Calandra, 1994) (Bacher, 1997b). Sezerniert wird MIF vor allem aus T-Zellen, Monozyten und Makrophagen nach Stimulation mit LPS, PMA, Dexamethason oder proinflammatorischen Zytokinen wie TNF oder IL-6 (Calandra, 1994) (Calandra, 1995). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann MIF im Blutserum nach Injektion mit LPS, SPEA, und TSST-1, nach Infektion mit *E. coli* oder nach *cecal ligation and puncture* (CLP) nachgewiesen werden (Calandra, 1994) (Bacher, 1997b) (Calandra, 2000). Über die subzelluläre Lokalisation von MIF ist bis jetzt noch sehr wenig bekannt. In vielen Zellen liegt es vorgeformt im Cytosol vor, wurde aber auch schon im Zellkern lokalisiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde bisher nur in nicht-hämatopoietischen Zellen untersucht. In Hypophysenzellen z.B. liegt MIF in sekretorischen Vesikeln vor und colokalisiert dort mit ACTH und TSH (Nishino, 1995). Die Coexistenz proinflammatorischer (MIF) und anti-inflammatorischer (ACTH) Substanzen lässt vermuten, dass unterschiedliche Stimuli für die unabhängige Ausschüttung des Granulainhalts verantwortlich sind oder dass der Körper bei einer Immunantwort unmittelbar einen gegenregulatorischen Effekt vorsieht. In β -Zellen des Pankreas wurde MIF zusammen mit Insulin in sekretorischen Granula nachgewiesen (Waeber, 1997). Ferner zeigten Eickhoff und Kollegen, dass MIF in Epithelzellen des Testis intrazellulär nicht in ER und Golgi, extrazellulär jedoch in Vesikeln vorliegt (Eickhoff, 2001). Es stellt sich also die Frage, ob es verschiedene MIF-Sekretionswege für typische sekretorische Zellen und für Immunzellen gibt oder ob es sich bei den bisher gefundenen Erkenntnissen um Variationen eines Themas, dessen Motiv noch unvollständig aufgeklärt ist, handelt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von MIF als *leaderless secretory*-Protein gefestigt, die subzelluläre Lokalisation

untersucht und ein möglicher alternativer Sekretionsweg insbesondere in typischen Immunzellen genauer charakterisiert werden.

7.1 MIF tritt nicht in den ER-Golgi-Weg ein

Humanes und murines MIF werden nicht N-glykosyliert

Proteine, die über den klassischen Sekretionsweg aus der Zelle transportiert werden, werden in der Regel posttranslational modifiziert. Bei N-glykosylierten Proteinen werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) Oligosaccharidketten an Asparaginreste geknüpft, die anschließend im Golgi-Apparat modifiziert werden und als ca. 1 kDa schwere Modifikationen nachgewiesen werden können. Bernhagen und Kollegen konnten in ersten Studien zeigen, dass zur Homogenität gereinigtes MIF aus der Maus-Leber nicht glykosyliert wird, obwohl die MIF-Sequenz zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen aufweist (Bernhagen, 1994b). Um dies auch in einem stimulierbaren Modellsystem nachzuweisen, wurden murine Makrophagen und humane Monozyten LPS-stimuliert, Lysate und Überstände PNGase F-verdaut und im Gel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde IgG, das an zwei Stellen N-glykosyliert ist, und als Negativkontrolle bakteriell exprimiertes rMIF verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres MIF keine Asparagin-verknüpften Oligosaccharidketten enthält, die mit PNGase F abgespalten werden können. Auch bei PNGase F-behandelten HeLa-Zellen wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen kein unterschiedliches Migrationsverhalten im Gel beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der Glykosylierungszustand von MIF scheint also weder vom Zelltyp abzuhängen noch erst im Anschluß an die LPS-stimulierte Sekretion zu erfolgen.

MIF wird *in vitro* nicht in Mikrosomen translokalisiert

Obwohl MIF nicht N-glykosyliert wird, gibt es bisher keinen direkten Beweis, dass MIF in den ER-Golgi-Weg eintritt. Beispielsweise ist bekannt, dass das LLS-Protein *plasminogen activator inhibitor 2* (PAI-2) als unglykosyliertes intrazelluläres und glykosyliertes sezerniertes Protein vorliegt (Ritchie und

Booth, 1998). PAI-2 besitzt keine Signalsequenz und sein Export wird nicht von Brefeldin A inhibiert. Ob MIF trotz fehlender N-Glykosylierung in das ER gelangt, wurde mittels *in-vitro*-Translation getestet. Scheinbar wird die wachsende MIF-Polypeptidkette jedoch während der Translation im Retikulozytenlysat bei Anwesenheit von Mikrosomen nicht in diese translokalisiert, da nach Auftrennung im Gel nur eine MIF-Spezies mit einem Molekulargewicht von ca. 12.5 kDa detektiert wurde. Das klassisch sezernierte Protein α -Faktor hingegen wurde in Gegenwart von Mikrosomen in diese translokalisiert und glykosyliert, was im Gel durch einen anscheinenden Größenunterschied von ca. 12 kDa sichtbar wurde.

Obwohl Proteine keine typische N-terminale Signalsequenz besitzen, können sie über ER und Golgi aus der Zelle transportiert werden. Beispielsweise wurde für FGF-9 eine interne Signalsequenz identifiziert, die essentiell für die Sekretion des Wachstumsfaktors ist (Revest, 2000). Bekannte N-terminale oder interne Signalsequenzen wurden für MIF nicht identifiziert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bislang unbekannte Sequenzmotive den Transport aus der Zelle signalisieren. Die fehlende N-Glykosylierung und die Tatsache, dass MIF nicht in Mikrosomen translokalisiert wird, legen jedoch nahe, dass MIF nicht in den Sekretionsweg über ER und Golgi eintritt.

7.2 MIF wird nicht aus HeLa-Zellen sezerniert

Nicht nur Immunzellen schütten nach Stimulation verschiedene Substanzen aus. Auch HeLa-Zellen sezernieren nach Hitzeschockstimulation Proteine und niedermolekulare Substanzen (Calderwood, 1989) (Jackson, 1992). MIF scheint ebenfalls nach Hitzeschock (HS) aus Makrophagen ausgeschüttet zu werden (R. Mischke, persönliche Mitteilung). Daher schien die Etablierung einer transfizierten HeLa-Zelllinie mit einem HA-MIF-Fusionsprotein ein geeignetes Werkzeug für Studien zur Sekretion und subzellulären Lokalisation zu sein. Um sicherzustellen, dass endogenes MIF in HeLa exprimiert und exportiert wird, wurden HeLa-Zellen 30 min bei 42°C (stimuliert) beziehungsweise 37°C (unstimuliert) und anschließend für 0-12 h bei 37°C inkubiert. Bei unstimulierten

Zellen scheint die MIF-Konzentration im Zellinneren 30 min nach der Stimulation abzunehmen und bis 12 h wieder auf den 0 h-Wert anzusteigen. Allerdings korrelieren diese Veränderungen nicht mit der im Überstand gefundenen MIF-Menge, die zum einen sehr gering war und sich zum anderen über den gesamten Zeitraum nicht änderte. Bei Hitzeschock-stimulierten HeLa bleibt die MIF-Konzentration bis 6 h nahezu konstant, um dann bis 12 h um ca. 15% abzunehmen. Erstaunlicherweise konnte MIF im Medium überhaupt nicht nachgewiesen werden, obwohl die Dauer der HS-Stimulation (0-70 min) und die Gesamtdauer der Ausschüttung (0-24 h) optimiert wurden sowie alternative Detektionsmethoden für MIF aus dem Medium (Immunpräzipitation) angewendet wurden (Daten nicht im Detail gezeigt).

Analog zu den Versuchen mit endogenem MIF, wurde die Sekretion auch mit einem HA-MIF-Fusionsprotein untersucht, das stabil in HeLa transfiziert wurde. Bei unstimulierten und stimulierten Zellen wurden intrazellulär nur marginale Veränderungen beobachtet, die wiederum nicht mit HA-MIF im Medium korrelierten. Mit oder ohne Hitzeschock scheint die Zelllinie HeLa_{HA-MIF42.1} kein HA-MIF ins Medium zu sezernieren.

Auch andere LLS-Proteine scheinen zelltypabhängig nicht sezerniert zu werden. So wurde beobachtet, dass in COS-1-Zellen überexprimiertes FGF-2 nicht ins Medium entlassen wird, jedoch durch die Plasmamembran gelangt und an der Oberfläche der Zelle assoziiert bleibt (Trudel, 2000). Bei Interleukin-1 β scheint ein ähnlicher Mechanismus zugrunde zu liegen, denn Young und Kollegen konnten keine Sekretion von IL-1 β aus transfizierten CHO-Zellen beobachten und beschreiben, dass dies auch für weitere Zelllinien nicht gelang (Young, 1988). Somit scheint es sich bei der ausbleibenden MIF-Sekretion in HeLa weder um ein Problem des Transfektionsvektors – der bei HA-MIF, FGF-2 und IL-1 β völlig verschieden war – noch um eine Eigenschaft des Fusionsteils zu handeln. Bemerkenswerterweise scheint HA-MIF in HeLa_{HA-MIF42.1} vorherrschend im Zellkern lokalisiert zu sein und nicht im Cytosol (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass MIF tatsächlich nur von Immunzellen oder spezialisierten sekretorischen Zellen exportiert wird.

7.3 Intrazelluläre Lokalisation von MIF

In spezialisierten sekretorischen Zellen scheint MIF sowohl cytosolisch als auch in Vesikeln vorzuliegen. In der Hypophyse colokalisiert MIF in Vesikeln zusammen mit ACTH und TSH (Nishino, 1995) und in β -Zellen des Pankreas mit Insulin (Waeber, 1997). In Epididymus-Epithelzellen scheint MIF nicht in ER und Golgi nachweisbar zu sein, sehr wohl jedoch in Vesikeln, die auch extrazellulär nachgewiesen wurden (Eickhoff, 2001). In Immunzellen wurde bisher nur eine diffuse cytoplasmatische Verteilung von MIF beschrieben; ob MIF in subzellulären Kompartimenten vorliegt, konnte noch nicht gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde MIF und typische Organell-Markerproteine in THP-1-Zellen, dem etablierten Modell zur LPS-stimulierten MIF-Freisetzung, mittels spezifischer Antikörper fluoreszenzmarkiert und durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. MIF colokalisiert nicht mit dem Plasmamembranmarker CD 45, dem Zellkernmarker Histon H1, oder dem Golgi-Marker TGN 38. Überlagert man jedoch die Signale von MIF und dem ER-Membran-Marker Calnexin oder dem ER-Lumen-Marker PDI, scheint eine schwache partielle Colokalisation zu existieren. Bei Calnexin und MIF lokalisiert das gelbe Signal sowohl unter der Plasmamembran als auch in granulären oder vesikulären Strukturen im Zellinneren. PDI und MIF scheinen nur in Nähe zur Plasmamembran zu colokalisieren. Berücksichtigt man, dass die monozytischen, in Suspension wachsenden THP-1-Zellen nur einen Durchmesser von ca. 5-15 μm haben, der Zellkern ein überwiegendes Volumen der Zelle einnimmt und sich das Cytosol bei der Anhaftung und Fixierung nicht ausspreitet, könnte die scheinbare gemeinsame Lokalisation auch durch die Lokalisation von MIF und ER-Markern in verschiedenen Vesikeln in unmittelbarer Nähe zueinander entstehen. Damit würde es keine Colokalisation von MIF und ER-Markern geben.

Für die Colokalisation von MIF am ER würde sprechen, dass kürzlich ein möglicher Interaktionspartner von MIF entdeckt wurde, der an Transportprozessen zwischen ER und Golgi beteiligt ist (Baugh, 2001 356). Das *vesicle tethering protein* p115 scheint sowohl im ER als auch in ER-Golgi-Intermediaten lokalisiert zu sein (Waters, 1992) (Barroso, 1995) (Sönnichsen,

1998). Seine genaue Rolle beim Transport von MIF wurde jedoch noch nicht näher untersucht. Da MIF jedoch weder N-glykosyliert noch *in vitro* in Mikrosomen translokalisiert wird, scheint es andererseits sehr unwahrscheinlich, dass MIF mit Markern des ER colokalisiert. Ungeklärt bleibt dabei auch, ob MIF in die ER-Membran integriert wird, im Lumen vorliegt oder nur lose an der Oberfläche assoziiert ist. Die vorliegenden Daten lassen daher keine eindeutige Aussage über die Lokalisation von MIF am ER zu.

7.4 Kinetik des MIF-Exports

Für Interleukin-1 β wurde ein Zweischnitt-Sekretionsmechanismus postuliert, bei dem zunächst proIL-1 β in Vesikel verpackt wird, dann diese Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie mit der Membran verschmelzen und prozessiertes bioaktives IL-1 β ins extrazelluläre Milieu entlassen (Andrei, 1999). MacKenzie und Kollegen zeigten weiterhin, dass der limitierende Schritt die Verpackung in Vesikel ist, da IL-1 β -enthaltende Mikrovesikel bereits zwei Minuten nach Stimulation aus dem Medium isoliert werden können (MacKenzie, 2001).

Um die Kinetik des MIF-Exports zu charakterisieren, wurden nicht-markierte und *pulse-chase*-markierte THP-1-Zellen LPS-stimuliert und Zellkulturüberstände auf ihren MIF-Gehalt analysiert. Aus nicht-markierten Zellen gipfelte die MIF-Ausschüttung bereits 2 h nach Stimulation, blieb bis 6 h nahezu konstant und nahm dann langsam ab. ^{35}S -markiertes MIF konnte ebenfalls bereits 2 h nach Stimulation nachgewiesen werden und stieg sogar noch leicht bis 7.5 h an. Da die Ausschüttung von neusynthetisiertem, im Vergleich zu vorgeformtem MIF mit einer etwas langsameren Rate abzulaufen scheint, kann nicht ausgeschlossen werden, dass MIF doch posttranslational modifiziert wird. Mehul *et al.* zeigten, dass das Anfügen einer myristoylierten und palmitoylierten N-terminalen Sequenz an Galektin-3 ein starkes Signal für dessen Transport zur Plasmamembran und Ausschüttung ist (Mehul and Hughes, 1997). Da sich intrazellulär die MIF-Konzentration mit der Zeit, durch LPS-Stimulation oder durch Serumdepletion (Daten nicht gezeigt) nicht änderte, scheint der intrazelluläre MIF-Pool durch kontinuierlichen *turnover* von MIF-Protein oder

MIF-mRNA nahezu konstant zu bleiben. LPS wirkt dabei möglicherweise an zwei Stellen: auf Transkriptionsebene bewirkt LPS die langsame Ausschüttung geringer MIF-Mengen; auf Translationsebene bewirkt es eine erhöhte MIF-Syntheserate oder stabilisiert die mRNA, mit der Folge, dass sehr schnell große Mengen an MIF produziert und exportiert werden. MIF-Synthese und MIF-Ausschüttung scheinen dabei mit der gleichen Geschwindigkeit zu verlaufen.

7.5 Klassische Inhibitoren stimulieren die alternative Sekretion

Der klassische Sekretionsweg wurde ursprünglich von Palade (Palade, 1975) beschrieben. Entlang dieses Weges werden Proteine vom ER über Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert, von wo sie wiederum in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran gelangen. Dort fusionieren sie mit der Membran und entlassen ihren Inhalt ins extrazelluläre Milieu. Viele der vesikulären Transportschritte können mit chemischen Substanzen beeinflusst werden. So blockiert Brefeldin A (BFA) unter anderem die Vesikelformation zwischen ER und Golgi, Monensin den Transport zwischen *cis*- und *trans*-Golgi durch Anschwellung der Golgi-*cisternae* und Methylamin die Endocytose durch Neutralisation des pH-Werts in Endolysosomen. Cycloheximid (CHX) inhibiert die Proteinsynthese durch Inhibition der Ribosomen-Translokation und CCCH ist ein Entkoppler des Elektronentransports.

Wie bereits für IL-1 β (Rubartelli, 1990), FGF-2 (Mignatti, 1992), Thioredoxin (Rubartelli, 1992) und Galektin-3 (Sato, 1993) beschrieben, wird auch die MIF-Sekretion von BFA und Monensin nicht unterdrückt. Da beide Inhibitoren die MIF-, IL-1 β - und Gal-3-Sekretion sogar noch verstärken, vermutet man, dass Inhibitoren des klassischen Sekretionsweges stimulierend auf einen alternativen Sekretionsweg wirken. Über die Bedeutung und den Mechanismus ist man sich jedoch noch im unklaren.

Dass CHX und CCCH ebenfalls die MIF-Sekretion stimulieren, anstatt diese zu inhibieren, könnte darauf hindeuten, dass LPS posttranslational die MIF-Ausschüttung stimuliert. Die LPS-stimulierte MIF-Sekretion scheint weiterhin unabhängig von einer konstanten Energieproduktion der Zelle zu sein, da trotz

unterbrochener Elektronentransportkette MIF aktiv sezerniert wird. Möglicherweise spielen daher beim MIF-Export ABC-Transporter eine Rolle, wie auch die Modellvorstellung der IL-1 β -Sekretion suggeriert (Andrei, 1999).

Ein weiterer alternativer Transportweg, über den Proteine aus dem Cytosol in lysosomale/endosomale Vesikel gelangen und über *recycling endosomes* zur Plasmamembran transportiert werden, wurde von Rubartelli und Kollegen erwähnt (Rubartelli, 1990). Da aber Methylamin die MIF-Sekretion nicht beeinflusst, scheint MIF nicht über *recycling endosomes* sezerniert zu werden. Interessanterweise wird die Sekretion von FGF-2, Thioredoxin und IL-1 β durch Methylamin inhibiert, was trotz vieler Gemeinsamkeiten der LLS-Proteine auf jeweils individuelle Sekretionswege bzw. Unterschiede zum Sekretionsweg von MIF deutet.

Ungeklärt bleibt, warum der Calciumionophor A23187 nicht nur die MIF-Sekretion, sondern auch den Export von IL-1 β (Rubartelli, 1990), FGF-2 (Mignatti, 1992) und Galektin-3 verstärkt, obwohl A23187 ein typischer Stimulator der Exocytose ist. Entweder werden LLS-Proteine in Vesikel verpackt, die den sekretorischen Vesikeln der konstitutiven oder regulierten Sekretion sehr ähnlich sind und Ca²⁺-Influx in die Zelle ebenfalls die Fusion der Vesikel mit der PM auslöst; oder LLS-Proteine werden zwischen Golgi-Apparat und PM aus dem Cytosol in sekretorische Vesikel rekrutiert und mit diesen exportiert. Experimentelle Beweise dafür gibt es jedoch noch nicht. Da Ca²⁺ auch ein bedeutender *second messenger* ist, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass der Export von LLS-Proteinen über Signaltransduktionswege, die bislang mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren nicht in Verbindung gebracht wurden, stimuliert wird.

Inkubiert man Zellen bei 15°C, 18°C oder 20°C, kommt es zu einer reversiblen Blockierung des Transports zwischen ER und Golgi (Matlin, 1983) (Kaether, 1995). Auch die MIF-Sekretion wird bei 18°C um ca. 35% reduziert. Da die Sekretion von IL-1 β bei 18°C um nahezu 100% reduziert wird, scheint der Temperaturblock nicht nur in ER und Golgi-Apparat transportierte Proteine

festzuhalten, sondern auch den alternativen Sekretionsweg über einen unbekanntem Mechanismus zu beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MIF nicht über den klassischen Sekretionsweg exportiert wird und klassische Inhibitoren eher stimulierend als inhibierend auf die MIF-Sekretion wirken. Ferner scheint es sich um einen energieunabhängigen Transport zu handeln, der wahrscheinlich auf posttranslationaler Ebene durch LPS stimuliert wird. Als alternativer Sekretionsweg können *recycling endosomes* mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ob jedoch die Ca^{2+} -stimulierte MIF-Ausschüttung auf eine Beteiligung sekretorischer Vesikel der Exocytose hinweist, bleibt unklar.

7.6 MIF-Sekretion erfordert ein intaktes Tubulin-Netzwerk

Arbeiten an Proteindisulfidisomerase (PDI) und an den LLS-Proteinen MRP8/14 zeigten, dass die Sekretion von PDI und MRP8/14 durch Substanzen, die das Tubulin-Netzwerk beeinflussen, reduziert wird (Terada, 1995) (Rammes, 1997). Ob ein Zusammenhang zur unkonventionellen Sekretion von MIF besteht, wurde mit β -Tubulin-bindenden Agenzien aus der Taxol- und der Colchicin-Gruppe untersucht. LPS-stimulierte Zellen zeigten keine reduzierte MIF-Sekretion, wenn sie in Gegenwart von Colchicin, Demecolchin, Paclitaxel, Taxol oder Tubulozol inkubiert wurden. Nocodazol reduzierte jedoch den MIF-Export in konzentrationsabhängiger Weise. Damit unterscheidet sich der MIF-Export vom Export von MRP8/14, der sowohl von Nocodazol, als auch von Colchicin und Demecolchin inhibiert wird (Rammes, 1997). Taxol, Paclitaxel und Tubulozol gehören in die Klasse der Substanzen, die Mikrotubuli (MT) stabilisieren (Correia, 2001), wohingegen Colchicin, Demecolchin und Nocodazol MT-depolymerisierende Substanzen sind (Lin, 1981).

An welchem Ende der polaren Mikrotubuli die Vesikel, die LLS-Proteine wie MIF und MRP8/14 enthalten, assoziieren, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden, da die Depolymerisation sowohl am Plus-Ende durch verminderte Addition von Tubulin-Dimeren, als auch am Minus-Ende durch verstärkte Dissoziation einsetzen kann.

Bemerkenswert ist, dass auch IL-1 β mit dem Mikrotubuli-Netzwerk zu assoziieren scheint (Stevenson, 1992). In Mesangiumzellen findet man proIL-1 α und proIL-1 β entlang des Mikrotubuli-Netzwerks in Cytoskelett-assoziierten Ribosomen. Ein Zusammenhang zum Export scheint jedoch nicht zu bestehen.

Der Mechanismus, mit dem PDI die Zelle verlässt, scheint sich von den Mechanismen von MRP8/14 und MIF zu unterscheiden. PDI, das keine hydrophobe Signalsequenz, wohl aber eine ER-Retentionssequenz besitzt und ein typischer ER-Marker ist, wurde zwar in sehr geringer Menge im extrazellulären Milieu von Blutplättchen und Hepatozyten nachgewiesen (Essex, 1995) (Terada, 1995); seine vorherrschende intrazelluläre Funktion, seine Lokalisation an der Zelloberfläche und die Inhibition der PDI-Sekretion durch Colchicin und Tunicamycin, weisen eher auf eine unspezifische Ausschüttung von PDI hin. Hinzu kommt, dass die Quelle von Zelloberflächen-PDI nicht nachgewiesen wurde und daher Zellyse als Quelle für PDI nicht ausgeschlossen werden kann.

Nicht nur Vesikel bewegen sich entlang von Mikrotubuli, auch ER und Golgi-Apparat sind um das Mikrotubuli-Cytoskelett angeordnet. Da es bei der Verwendung von Nocodazol häufig zu einem Zusammenbruch der typischen Golgi-Struktur kommt (Cole, 1996), lag die Vermutung nahe, dass der inhibitorische Effekt von Nocodazol eher auf einem allgemeinen Mechanismus der Transportinhibition beruht als spezifisch den MIF-Export zu hemmen. Tatsächlich wurde in Kontrollexperimenten die Sekretion von TNF teilweise inhibiert (Daten nicht gezeigt), was auch in PMA-stimulierten Monozyten (Rammes, 1997) und LPS-stimulierten Makrophagen (Li, 1996) beobachtet wurde. Die Inhibition der TNF-Sekretion durch Nocodazol wurde jedoch nur in einem engen Konzentrationsbereich beobachtet und der inhibitorische Effekt lag bei maximal 30 %. Nocodazol könnte daher über zwei Mechanismen auf den MIF-Export wirken. Einerseits wird zu einem geringen Teil der klassische Sekretionsweg beeinflusst und damit auch die Ausschüttung anderer proinflammatorischer Zytokine wie TNF gehemmt. Andererseits wirkt Nocodazol

spezifisch auf den nicht-klassischen Export von MIF, der weder von anderen Inhibitoren der Colchicin-Familie noch von Taxol und dessen verwandten Stoffen beeinflusst wird und sich außerdem vom MT-abhängigen Export der LLS-Proteine MRP8/14 bezüglich der Inhibitor-Selektivität unterscheidet.

Im *Two-Hybrid-Screen* auf MIF-Bindungspartner wurde neben JAB1/CSN5 (Kleemann, 2000b) auch MAP1A als möglicher Interaktionspartner von MIF identifiziert (R. Mischke, J. Bernhagen, unpubliziert). Das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1A (MAP1A) (Bloom, 1984) gehört zur Klasse der „strukturellen“ Mikrotubuli-assoziierten Proteine, da es direkt an Tubulin bindet, Mikrotubuli stabilisiert und deren Zusammenbau unterstützt (Mandelkow, 1995). MAPs können beim *in vitro*-Zusammenbau von Mikrotubuli zusammen mit Tubulin aufgereinigt werden und spielen eine wichtige Rolle bei der Mikrotubuli-Dynamik und Zell-Morphogenese (Hirokawa, 1994). Somit schien also ein direkter Zusammenhang zwischen dem MIF-Export und dem MT-Netzwerk zu bestehen. Obwohl MIF und MAP1A in der Ratten-Gehirntumor-Zelllinie C6-BU-1 coexprimiert werden, konnte eine Lokalisation entlang des Tubulin-Netzwerks, wie z.B. für MRP8/14 und Tubulin in Monozyten gezeigt (Rammes, 1997), nicht beobachtet werden. Auch scheiterten Versuche, die MIF/MAP1A-Interaktion biochemisch mittels Immunpräzipitation aus den Zelllinien THP-1, C6-BU-1 und P19 nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass vor allem technische Probleme für die nicht gezeigte Interaktion verantwortlich sind. Da nur ein kommerziell erhältlicher Anti-MAP1A-Antikörper zur Verfügung stand, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Antikörper MAP1A weder im Gel mit der richtigen Größe detektierte, noch für die Immunfluoreszenz geeignet war. MAP1A ist mit 2774 Aminosäuren und einem vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 300 kDa ein sehr großes Protein. Sowohl für die direkte Detektion von MAP1A in Zelllysaten als auch für die Co-Immunpräzipitation (CoIP) von MAP1A und MIF scheint daher eine weitere Optimierung der Puffer-, Aufschluß- und CoIP-Bedingungen notwendig zu sein. Die Interaktion von MIF mit MAP1A im *Two-Hybrid-Screen* schien am C-terminalen Ende von MAP1A zu erfolgen, dessen mRNA-Transkript sowohl eine

schwere MAP1A-Kette mit ca. 270 kDa als auch eine leichte LC2-Kette mit ca. 28 kDa produziert (Langkopf, 1992). Noch ist völlig unklar, wie die LC2-Kette vom Polyprotein-Vorläufer abgespalten wird und wie sie mit der schweren Kette assoziiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass MIF nicht an die schwere MAP1A-Kette bindet, sondern mit der leichten LC2-Kette, die am C-Terminus des MAP1A-Polyproteins lokalisiert, interagiert. Mit der Verfügbarkeit monospezifischer, CoIP-fähiger Antikörper gegen MAP1A und LC2 sollte es daher möglich sein, die Interaktion von MIF und MAP1A detaillierter zu untersuchen und eine mögliche Verbindung zum MIF-Export herzustellen.

7.7 ABC-Transporter-vermittelter Export von MIF

Im Gegensatz zum Export von MRP8/14 und PAI-2, scheinen IL-1 β , FGF-2 und Galektin-3 über einen alternativen Sekretionsweg, bei dem ABC-Transporter beteiligt sind, aus der Zelle transportiert zu werden. Mitglieder der ABC-Transporterfamilie transportieren aktiv niedermolekulare Substanzen, Aminosäuren, Peptide und Proteine aus der Zelle (Gottesman, 1993) (Dean, 2001). Bislang ist noch völlig unklar, wie ABC-Transporter gleichsam Ionen und Proteine trotz des enormen Größenunterschieds über Membranen transportieren können. Der Zusammenhang zum Transport von LLS-Proteinen konnte daher nur indirekt hergestellt werden, indem bei der Verwendung von Inhibitoren der ABC-Transporter auch die Sekretion von Proteinen ohne Signalsequenz inhibiert wurde.

Der MIF-Export wird von Glyburid und Probenecid in konzentrationsabhängiger Weise drastisch inhibiert. Die TNF-Sekretion wird dagegen nur von Glyburid im unteren Konzentrationsbereich um ca. 30 % reduziert. Probenecid hingegen beeinflusst den Transport von TNF überhaupt nicht. Eine Reihe weiterer getesteter Inhibitoren hatte keine Wirkung auf den MIF-Export. Bromosulfophtalein (BSP) und DIDS bewirkten schon in unstimulierten Zellen eine MIF-Ausschüttung, was vermutlich auf cytotoxische Effekte zurückzuführen ist. Verapamil zeigte zwar einen inhibitorischen Effekt, bewirkte aber auch in unstimulierten Zellen eine MIF-Ausschüttung. Außerdem variierten die

Messwerte zwischen den verschiedenen Experimenten stark, sodass ein spezifischer Einfluss von Verapamil auf den MIF-Export vermutlich nicht zu erwarten ist. 1,10-Phenanthrolin reduzierte zwar die MIF-Ausschüttung ins Medium signifikant. Da die Substanz aber bei der im ELISA gemessenen Wellenlänge stark absorbiert, ist auch hier zu hinterfragen, ob ein unspezifischer Effekt beobachtet wurde.

Interessanterweise wurde bei MIF und bei IL-1 β beobachtet, dass die Inhibitoren die intrazelluläre Menge an MIF bzw. IL-1 β nicht verändern (Hamon, 1997 und Daten nicht gezeigt). Die Sekretion beider Proteine scheint daher nicht durch eine verminderte Syntheserate oder erhöhte intrazelluläre Instabilität reduziert zu werden.

Glyburid und Probenecid inhibieren den Transportprozess verschiedener Mitglieder der ABC-Transporterfamilie. Glyburid wurde zuerst als Inhibitor der Transporter ABCA1 (bzw. ABC1 nach alter Nomenklatur) und ABCC7 (bzw. CFTR) (Becq, 1997) erwähnt, später jedoch als allgemeiner ABC-Transporter-Inhibitor beschrieben (Golstein, 1999). Probenecid scheint eher verschiedene Proteine der ABCC- (bzw. MDR-) Unterfamilie (Ayrton, 2001) zu inhibieren. In weiteren Untersuchungen muss daher geklärt werden, welcher ABC-Transporter den MIF-Transport aus der Zelle vermittelt und welcher molekulare Mechanismus dem Transport von Proteinen mittels Ionenpumpen ermöglicht.

Vergleicht man die inhibitorischen Effekte beim MIF-Export mit den Effekten der Inhibitoren bei anderen LLS-Proteinen, fällt auf, dass keines der LLS-Proteine mit dem gleichen Set von Inhibitoren gehemmt wird. Der IL-1 β -Export wird von Glyburid, BSP und DIDS gehemmt (Hamon, 1997). Der Export von FGF-2 hingegen wird von Probenecid (Aggarwal und Gupta, 1998), nicht jedoch von Cyclosporin A, Reserpin oder Verapamil (Mignatti, 1992) inhibiert. Hinsichtlich des Inhibitorspektrums ähnelt also der MIF-Export eher dem von FGF-2 als von IL-1 β . Berücksichtigt man zusätzlich die mögliche Rolle des Mikrotubuli-Netzwerks beim MIF-Export und die Tatsache, dass IL-1 β als Vorläuferprotein gebildet wird, muss man vermuten, dass jedes der LLS-Proteine über einen

charakteristischen alternativen Sekretionsweg aus der Zelle transportiert wird. Da sämtliche Untersuchungen in verschiedenen zellulären Systemen erfolgten, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass zelltypspezifische Variationen die allgemeingültige Charakterisierung eines alternativen Sekretionsweges noch erschwert.

Mit den aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen könnte man sich vorstellen, dass MIF im Cytosol der Zelle translatiert wird und entweder als lösliches Protein im Cytosol akkumuliert oder in Vesikel verpackt wird. Nach Stimulation mit LPS wird lösliches MIF in Vesikel verpackt. Diese Vesikel wandern entlang des Tubulin-Netzwerks zur Plasmamembran, fusionieren dort mit der Membran und ABC-Transporter-Proteine ermöglichen das schnelle und effiziente Ausschleusen von MIF aus der Zelle. Nocodazol verhindert den Transport der Vesikel zur Plasmamembran. Glyburid und Probenecid inhibieren die Entleerung der Vesikel, nicht jedoch die Verpackung von MIF in diese Vesikel. Weitere Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MIF, zur Existenz möglicher MIF-spezifischer Vesikel und zur Identifikation neuer Interaktionspartner des alternativen Sekretionsweges müssen jedoch die modellhafte Vorstellung des MIF-Exports noch weiter festigen.

8 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S. and Gupta, S. (1998). A possible role for multidrug resistance-associated protein in the secretion of basic fibroblast growth factor by osteogenic sarcoma cell line (MG-63). *Int J Oncol*, **13**, 1331-1334.
- Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S.S., Stefansson, S., Liao, G. and Hla, T. (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem*, **277**, 6667-6675.
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M.R., Chimini, G. and Rubartelli, A. (1999). The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*, **10**, 1463-1475.
- Ayrton, A. and Morgan, P. (2001). Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*, **31**, 469-497.
- Bacher, M., Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC and R., B. (1997). Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol*, **150**, 235-246.
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. and Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7849-7854.
- Barondes, S.H. (1984). Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science*, **223**, 1259-1264.
- Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. *et al.* (1994a) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, **76**, 597-598.

- Barondes, S.H., Cooper, D.W., Gitt, M.A. and Leffler, H. (1994b). Galectins. *J Biol Chem*, **269**, 20807-20810.
- Bar-Or, A., Oliveira, E.M., Anderson, D.E. and Hafler, D.A. (1999). Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, **100**, 252-259.
- Barroso, M., Nelson, D.S. and Sztul, E. (1995). Transcytosis-associated protein (TAP)/p115 is a general fusion factor required for binding of vesicles to acceptor membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 527-531.
- Basilico, C. and Moscatelli, D. (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*, **59**, 115-65.
- Baugh, J., Lin, X., Mitchell, R.A. and Bucala, R. (2001) MIF interacts with the vesicle-tethering protein p115 - A possible route for the secretion of leaderless MIF. *International Cytokine Society Conference*, Maui, Hawaii (8.-11. Nov. 2001).
- Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B. and Chimini, G. (1997). ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **272**, 2695-2699.
- Bendrat, K., Al-Abed, Y., Callaway, D., Peng, T., Calandra, T., Metz, C.N. and Bucala, R. (1997). Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry*, **36**, 15356-15362.
- Berenson, C.S., Patterson, M.A., Pattoli, M.A. and Murphy, T.F. (1996). A monoclonal antibody to human macrophage gangliosides inhibits macrophage migration. *J Leukoc Biol*, **59**, 371-379.
- Bernhagen, J. (1994a). Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF): Entdeckung, Klonierung, Aufreinigung und Charakterisierung eines neuen, neuroendokrinen Zytokins. *Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation*.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A. and Bucala, R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, **365**, 756-759.

- Bernhagen, J., Mischke, R., Kleemann, R. and Brunner, H. (1998). Role for the cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in cellular stress. *Herbsttagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie 1998, Freiburg*.
- Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A. and Bucala, R. (1994b). Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration Inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*, **33**, 14144-14155.
- Bernhagen, J., Sappeler, G., Demirdelen, B., Melms, A. and Vujovic, G. (1999). Role of MIF in multiple sclerosis. *DGfI Spring Meeting*, Stuttgart, Germany.
- Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1496-1500.
- Bloom, B. and Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction *in vi.tro* associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, **153**,80-82.
- Bloom, G.S., Luca, F.C. and Vallee, R.B. (1984). Widespread cellular distribution of MAP-1A (microtubule-associated protein 1A) in the mitotic spindle and on interphase microtubules. *J Cell Biol*, **98**, 331-340.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*, **1461**, 347-357.
- Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C. and David, J.R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*, **189**, 341-346.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bucala, R. (2000). Signal transduction. A most interesting factor. *Nature*, **408**, 146-147.
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H.E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J. and Ihling, C. (2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, **105**, 1561-1566.

- Burgess, W.H. and Maciag, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*, **58**, 575-606.
- Burmeister, G., Tarcsay, L. and Sorg, C. (1986). Generation and characterization of a monoclonal antibody (1C5) to human migration inhibitory factor (MIF). *Immunobiology*, **171**, 461-474.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A. and Bucala, R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, **377**, 68-71.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A. and Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*, **179**, 1985-1902.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy D.L, Pugin, J., Metz, C.N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R. and Glauser, M.P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, **6**, 164-170.
- Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N. and Bucala, R. (1998). Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 11383-11388.
- Calderwood, S.K., Bornstein, B., Farnum, E.K. and Stevenson, M.A. (1989). Heat shock stimulates the release of arachidonic acid and the synthesis of prostaglandins and leukotriene B4 in mammalian cells. *J Cell Physiol*, **141**, 325-333.
- Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A. and Bucala, R. (1999). An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*, **5**, 181-191.
- Chou, K.C. (2001). Prediction of signal peptides using scaled window. *Peptides*, **22**, 1973-1979.
- Choufani, G., Ghanooni, R., Decaestecker, C., Delbrouck, K., Simon, P., Schuring, M.P., Zick, Y., Hassid, S., Gabius, H.J. and Kiss, R. (2001). Detection of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human

- cholesteatomas and functional implications of correlations to recurrence status and to expression of matrix metalloproteinases-3/9, retinoic acid receptor-beta, and anti-apoptotic galectin-3. *Laryngoscope*, **111**, 1656-1662.
- Claros, M.G., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 394-398.
- Cole, N.B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J. and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell*, **7**, 631-650.
- Cooper, D.N. and Barondes, S.H. (1990). Evidence for Export of a Muscle Lectin from cytosol to extracellular Matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*, **110**, 1681-1691.
- Correia, J.J. and Lobert, S. (2001). Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs. *Curr Pharm Des*, **7**, 1213-1228.
- Cuzner, M.L., Gveric, D., Strand, C., Loughlin, A.J., Paemen, L., Opdenakker, G. and Newcombe, J. (1996). The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol*, **55**, 1194-1204.
- David, J.R. (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **56**, 72-77.
- de Jong, Y.P., Abadia-Molina, A.C., Satoskar, A.R., Clarke, K., Rietdijk, S.T., Faubion, W.A., Mizoguchi, E., Metz, C.N., Sahli, M.A., ten Hove, T., Keates, A.C., Lubetsky, J.B., Farrell, R.J., Michetti, P., van Deventer, S.J., Lolis, E., David, J.R., Bhan, A.K. and Terhorst, C. (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol*, **2**, 1061-1066.
- Dean, M., Hamon, Y. and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, **42**, 1007-17.

- Donnelly, S.C., Haslett, C., Reid, P.T., Grant, I.S., Wallace, W.A., Metz, C.N., Bruce, L.J. and Bucala, R. (1997). Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, **3**, 320-323.
- Drubin, D.G., Feinstein, S.C., Shooter, E.M. and Kirschner, M.W. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*, **101**, 1799-1807.
- Eickhoff, R., Wilhelm, B., Renneberg, H., Wennemuth, G., Bacher, M., Linder, D., Bucala, R., Seitz, J. and Meinhardt, A. (2001). Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med*, **7**, 27-35.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, **88**, 223-233.
- Elliott, G.D. and Meredith, D.M. (1992) The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J Gen Virol*, **73**, 723-726.
- Essex, D.W., Chen, K. and Swiatkowska, M. (1995). Localization of Protein Disulfide Isomerase to the External Surface of the Platelet Plasma Membrane. *Blood*, **86**, 2168-2173.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fingerle-Rowson, G.R. and Bucala, R. (2001). Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Immunol Cell Biol*, **79**, 368-375.
- Flieger, O. (1999) Sekretion des Cytokins MIF durch nicht-klassische Wege. *Universität Stuttgart, Diplomarbeit*.
- Florkiewicz, R.Z., Anchin, J. and Baird, A. (1998) The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem*, **273**, 544-551.

- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. and Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol*, **162**, 388-399.
- Golstein, P.E., Boom, A., van Geffel, J., Jacobs, P., Masereel, B. and Beauwens, R. (1999). P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch*, **437**, 652-660.
- Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, **62**, 385-427.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D.G. and Mukhtar, H. (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*, **42**, 73-78.
- Hamon, Y., Luciani, M.F., Becq, F., Verrier, B., Rubartelli, A. and Chimini, G. (1997). Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood*, **90**, 2911-2915.
- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 74-81.
- Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli. *J Biol Chem*, **254**, 3664-3671.
- Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J. and Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.*, **190**, 1375-1382.
- Hughes, R.C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1473**, 172-185.
- Jackson, A., Friedman, S., Zhan, X., Engleka, K.A., Forough, R. and Maciag, T. (1992). Heatshock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad. Sci USA*, **89**, 10691-10695.
- Jung, H., Kim, T., Chae, H.Z., Kim, K.T. and Ha, H. (2001). Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J Biol Chem*, **276**, 15504-15510.
- Jüttner, S., Bernhagen, J., Metz, C.N., Rollinghoff, M., Bucala, R. and Gessner, A. (1998). Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major

- by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J Immunol*, **161**, 2383-2390.
- Kaether, C. and Gerdes, H.H. (1995). Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett*, **369**, 267-71.
- Kato, Y., Muto, T., Tomura, T., Tsumura, H., Watarai, H., Mikayama, T., Ishizaka, K. and Kuroki, R. (1996). The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded β -sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 3007-3010.
- Kleemann, R. (2000a). Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. *Eur J Biochem*, **267**, 7183-7192.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H. and Bernhagen, J. (2000b) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, **408**, 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R.W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Jüttner, S., Brunner, H. and Bernhagen, J. (1998a). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol*, **280**, 85-102.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Mischke, R., Held, J. and Bernhagen, J. (1999) Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF. *Eur J Biochem*, **260**, 1-15.
- Kleemann, R., Mischke, R., Kapurniotu, A., Brunner, H. and Bernhagen, J. (1998b) Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes. *FEBS Lett*, **430**, 191-196.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a programm to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst*, **24**, 946-950.

- Kuchler, K., Rubartelli, A. and Holland, B. (1997). *Unusual secretory pathways: from bacteria to man*. R.G. Landes Company,, Austin TX, USA.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lan, H.Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D.J., Metz, C., Meinhardt, A., Bucala, R. and Atkins, R.C. (1997). The Pathogenic Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Immunologically Induced Kidney Disease in the Rat. *J Exp Med*, **185**, 1455-1465.
- Lan, H.Y., Mu, W., Yang, N., Meinhardt, A., Nikolic-Paterson, D.J., Ng, Y.Y., Bacher, M., Atkins, R.C. and Bucala, R. (1996) De novo renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathology*, **149**, 1119-1127.
- Langkopf, A., Hammarback, J.A., Muller, R., Vallee, R.B. and Garner, C.C. (1992) Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J Biol Chem*, **267**, 16561-16566.
- Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S.R., Bucala, R. and Morand, E.F. (1999) Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum*, **42**, 1601-8.
- Leech, M., Metz, C.N., Santos, L., Peng, T., Holdsworth, S.R., Bucala, R. and Morand, E.F. (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, **41**, 910-917.
- Li, Z., Davis, G.S., Mohr, C., Nain, M. and Gemsa, D. (1996). Inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production by colchicine and other microtubule disrupting drugs. *Immunobiology*, **195**, 624-639.
- Lin, C.M. and Hamel, E. (1981). Effects of inhibitors of tubulin polymerization on GTP hydrolysis. *J Biol Chem*, **256**, 9242-9245.
- Lin, S.G., Yu, X.Y., Chen, Y.X., Huang, X.R., Metz, C., Bucala, R., Lau, C.P. and Lan, H.Y. (2000). De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res*, **87**, 1202-1208.

- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E. and Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem*, **268**, 11750-7.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. and Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*, **4**, 449-60.
- MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A. and Surprenant, A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, **15**, 825-35.
- Mandelkow, E. and Mandelkow, E.M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 72-81.
- Martin, T.R. (1997) Cytokines and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a question of balance. *Nat Med*, **3**, 272-3.
- Matlin, K.S. and Simons, K. (1983) Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell*, **34**, 233-43.
- Matsunaga, J., Sinha, D., Pannell, L., Santis, C., Solano, F., Wistow, G.J. and Hearing, V.J. (1999). Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J Biol Chem*, **274**, 3268-71.
- Mehul, B. and Hughes, R.C. (1997). Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci*, **110**, 1169-78.
- Meinhardt, A., Bacher, M., McFarlane, J.R., Metz, C.N., Seitz, J., Hedger, M.P., de Kretser, D.M. and Bucala, R. (1996) Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology*, **137**, 5090-5.
- Messmer, U.K. and Brune, B. (1996). Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content, and p53 accumulation. *Arch Biochem Biophys*, **327**, 1-10.

- Metz, C.N. and Bucala, R. (1997). Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv Immunol*, **66**, 197-223.
- Meyer-Siegler, K. (2001). COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. *Mol Med*, **7**, 850-60.
- Meyer-Siegler, K., Fattor, R.A. and Hudson, P.B. (1998). Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Prostate. *Diagn Mol Pathol*, **7**, 44-50.
- Mignatti, P., Morimoto, T. and Rifkin, D.B. (1992). Basic Fibroblast Growth Factor, a Protein Devoid of Secretory Signal Sequence, Is Released by Cells via a Pathway Independent of the Endoplasmic Reticulum-Golgi Complex. *J Cell Physiol*, **151**, 81-93.
- Mikayama, T., Nakano, T., Gomi, H., Nakagawa, Y., Liu, Y.C., Sato, M., Iwamatsu, A., Ishii, Y., Weiser, W.Y. and Ishizaka, K. (1993). Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding glycosylation-inhibiting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10056-60.
- Mikulowska, A., Metz, C.N., Bucala, R. and Holmdahl, R. (1997). Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol*, **158**, 5514-5517.
- Mischke, R., Gessner, A., Kapurniotu, A., Juettner, S., Kleemann, R., Brunner, H. and Bernhagen, J. (1997). Structure Activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus. *FEBS Letters*, **414**, 226-232.
- Mischke, R., Kleemann, R., Brunner, H. and Bernhagen, J. (1998) Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Letters*, **427**, 85-90.
- Mitchell, R.A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J. and Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53:

- regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 345-50.
- Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T. and Bucala, R. (1999). Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*, **274**, 18100-6.
- Miyakawa, K., Hatsuzawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T. and Imamura, T. (1999). A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor- 9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem*, **274**, 29352-7.
- Miyake, A., Konishi, M., Martin, F.H., Hernday, N.A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, T., Arakawa, T. and Itoh, N. (1998). Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 148-52.
- Morelli, A.E., Zahorchak, A.F., Larregina, A.T., Colvin, B.L., Logar, A.J., Takayama, T., Falo, L.D. and Thomson, A.W. (2001). Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood*, **98**, 1512-23.
- Mühlhahn, P., Bernhagen, J., Czisch, M., Georgescu, J., Renner, C., Ross, A., Bucala, R. and Holak, T.A. (1996). NMR characterization of structure, backbone dynamics and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci.*, **5**, 2095-2103.
- Nathan, C.F., Karnovsky, M.L. and David, J.R. (1971). Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **133**, 1356-1376.
- Nathan, C.F., Remold, H.G. and David, J.R. (1973). Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage function. *J. Exp. Med.*, **137**, 275-288.
- Niino, M., Ogata, A., Kikuchi, S., Tashiro, K. and Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of

- patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. *J Neurol Sci*, **179**, 127-31.
- Nishihira, J., Koyama, Y. and Mizue, Y. (1996). Identification of macrophage migration inhibitory factor in human leukemia HL-60 cells and its induction by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Biol Int*, **40**, 861-869.
- Nishihira, J., Koyama, Y. and Mizue, Y. (1998). Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. *Cytokine*, **10**, 199-205.
- Nishihira, J. and Ogata, A. (2001). Macrophage migration inhibitory factor as a target molecule in multiple sclerosis. *Curr Opin Investig Drugs*, **2**, 778-82.
- Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K. and Bucala, R. (1995). Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med.*, **1**, 781-788.
- Odink, K., Cerletti, N., Bruggen, J., Clerc, R.G., Tarcsay, L., Zwadlo, G., Gerhards, G., Schlegel, R. and Sorg, C. (1987) Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*, **330**, 80-2.
- Ogata, A., Nishihira, J., Suzuki, T., Nagashima, K. and Tashiro, K. (1998) Identification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in neural cells of the rat brain by in situ hybridisation. *Neuroscience Letters*, **246**, 173-177.
- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M. and Nishihira, J. (2000) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*, **275**, 444-50.
- Onodera, S., Nishihira, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanaka, S. and Minami, A. (2002) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*, **277**, 7865-74.

- Onodera, S., Suzuki, K., Matsuno, T., Kaneda, K., Takagi, M. and Nishihira, J. (1997) Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology*, **92**, 131-137.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-58.
- Puig, A., Lyles, M.M., Noiva, R. and Gilbert, H.F. (1994) The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19128-19135.
- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M. and Sorg, C. (1997) Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*, **272**, 9496-9502.
- Revest, J.M., DeMoerlooze, L. and Dickson, C. (2000) Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem*, **275**, 8083-90.
- Ritchie, H. and Booth, N.A. (1998) Secretion of plasminogen activator inhibitor 2 by human peripheral blood monocytes occurs via an endoplasmic reticulum-golgi-independent pathway. *Exp Cell Res*, **242**, 439-50.
- Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Björk, P., Jacobsson, L. and Rorsman, H. (1997) The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett.*, **417**, 85-88.
- Rosengren, E., Bucala, R., Åman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C.N. and Rorsman, H. (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol. Med.*, **2**, 143-149.
- Rossi, A.G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A.P., Rahman, I., Metz, C.N., Bucala, R. and Donnelly, S.C. (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest*, **101**, 2869-2874.

- Roth, J., Burwinkel, F., van den Bos, C., Goebeler, M., Vollmer, E. and Sorg, C. (1993) MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood*, **82**, 1875-83.
- Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E. and Sitia, R. (1992) Secretion of Thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem*, **267**, 24161-24164.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. and Sitia, R. (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO Journal*, **9**, 1503-1510.
- Sakamoto, W., Nishihira, J., Fujie, K., Handa, H., Ozaki, M. and Yukawa, S. (1998) Inhibition of macrophage migration inhibitory factor secretion from macrophages by vitamin E. *Biochim Biophys Acta*, **1404**; (3), 427-34.
- Sakaue, S., Nishihira, J., Hirokawa, J., Yoshimura, H., Honda, T., Aoki, K., Tagami, S. and Kawakami, Y. (1999) Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression by Glucose and Insulin in Adipocytes In Vitro. *Mol Med*, **5**, 361-371.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview NY, USA.
- Sampey, A.V., Hall, P.H., Mitchell, R.A., Metz, C.N. and Morand, E.F. (2001) Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum*, **44**, 1273-80.
- Santos, L., Hall, P., Metz, C., Bucala, R. and Morand, E.F. (2001) Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen- induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*, **123**, 309-14.
- Sato, S., Burdett, I. and Hughes, R.C. (1993) Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res*, **207**, 8-18.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-79.

- Schmidt-Supprian, M., Murphy, C., While, B., Lawler, M., Kapurniotu, A., Voelter, W., Smith, O. and Bernhagen, J. (2000) Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes. *Eur Cytokine Netw*, **11**, 407-13.
- Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M. and Nishihira, J. (1999) 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**, 751-8.
- Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. and Warren, G. (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol*, **140**, 1013-21.
- Stein, J.M. and Luzio, J.P. (1991) Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J*, **274**, 381-6.
- Stevenson, F.T., Torrano, F., Locksley, R.M. and Lovett, D.H. (1992) Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol*, **152**, 223-31.
- Subramanya, H., Roper, D., Dauter, Z., Dodson, E., Davies, G., Wilson, K. and Wigley, D. (1996) Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry*, **35**, 792-802.
- Sugie, K., Nakano, T., Tomura, T., Takakura, K., Mikayama, T. and Ishizaka, K. (1997) High-affinity binding of bioactive glycosylation-inhibiting factor to antigen-primed T cells and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5278-83.
- Sugimoto, H., Suzuki, M., Nakagawa, A., Tanaka, I. and Nishihira, J. (1996) Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.*, **389**, 145-148.
- Sun, H., Bernhagen, J., Bucala, R. and Lolis, E. (1996) Crystal structure at 2.6 Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 5191-5196.

- Suzuki, H., Kanagawa, H. and Nishihira, J. (1996a) Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol. Lett.*, **51**, 141-147.
- Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J. and Sakai, M. (1996b) Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nature Struct. Biol.*, **3**, 259-266.
- Swope, M., Sun, H.-W., Blake, P.R. and Lolis, E. (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J*, **17**, 3534-3541.
- Takahashi, N. and Creighton, T.E. (1996) On the reactivity and ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, **35**, 8342-8353.
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Ohshima, T., Une, Y. and Todo, S. (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*, **4**, 707-14.
- Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H.O., Stockert, R.J. and Schilsky, M.L. (1995) Secretion, Surface Localization, Turnover, and Steady State Expression of Protein Disulfide Isomerase in Rat Hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 20410-20416.
- Thomson, A.W. (1998) *The Cytokine Handbook*. Academic Press, New York NY, USA.
- Trudel, C., Faure-Desire, V., Florkiewicz, R.Z. and Baird, A. (2000). Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol*, **185**, 260-8.
- Vedder, H., Krieg, J.C., Gerlach, B., Gemsa, D. and Bacher, M. (2000). Expression and glucocorticoid regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in hippocampal and neocortical rat brain cells in culture. *Brain Res*, **869**, 25-30.
- Waeber, G., Calandra, T., Bonny, C. and Bucala, R. (1999). A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **15**, 47-54.

- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J.A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C.N., Nicod, P. and Bucala, R., (1997). 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.
- Walter, P. and Blobel, G. (1983). Signal recognition particle: a ribonucleoprotein required for cotranslational translocation of proteins, isolation and properties. *Methods Enzymol*, **96**, 682-91.
- Waters, M.G., Clary, D.O. and Rothman, J.E. (1992). A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol*, **118**, 1015-26.
- Weiser, W.Y., Greineder, D.K., Remold, H.G. and David, J.R. (1981). Studies on human migration inhibitory factor: characterization of three molecular species. *J Immunol*, **126**, 1958-62.
- Weiser, W.Y., Temple, D.M., Witek-Gianotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C. and David, J.R. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding a human macrophage migration inhibition factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7522-7526.
- Wollman, E.E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J.P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P., Galibert, F. and et al. (1988). Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J Biol Chem*, **263**, 15506-12.
- Wymann, D., Bluggel, M., Kalbacher, H., Blesken, T., Akdis, C.A., Meyer, H.E. and Blaser, K. (1999) Human B cells secrete migration inhibition factor (MIF) and present a naturally processed MIF peptide on HLA-DRB1*0405 by a FXXL motif. *Immunology*, **96**, 1-9.
- Xu, D., McSorley, J., Tetley, L., Chatfield, S., Dougan, G., Chan, W.L., Satskar, A., David, J.R. and Liew, F.Y. (1998). Protective Effect on *Leishmania major* Infection of Migration Inhibitory Factor, TNF- α , IFN- γ Administered Orally via Attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunol*, **160**, 1285-1289.

- Yang, Y., Degranpre, P., Kharfi, A. and Akoum, A. (2000). Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4721-7.
- Young, P.R., Hazuda, D.J. and Simon, P.L. (1988). Human interleukin 1 β is not secreted from hamster fibroblasts when expressed constitutively from a transfected cDNA. *Journal of Cell Biology*, **107**, 447-456.
- Yu, F., Finley, R.L., Jr., Raz, A. and Kim, H.R. (2002). Galectin-3 Translocates to the Perinuclear Membranes and Inhibits Cytochrome c Release from the Mitochondria. *J Biol Chem*, **277**, 15819-27.
- Zhu, W.Q. and Ochieng, J. (2001). Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin. *Cancer Res.* **61** 1869-1873.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig durchgeführt und verfaßt, sowie keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Stuttgart, im Mai 2002

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized first letter 'A' followed by a series of connected loops and a final vertical stroke.