

**Makrophagen
migrationsinhibierender Faktor (MIF):
Struktur- und
Aktivitätsstudien**

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

**vorgelegt
von
Ralf Mischke**

Hauptberichter: Prof. Dr. Herwig Brunner

Mitberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2000

**Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik
Universität Stuttgart**

2000

Inhalt

Abkürzungen	6
Zusammenfassung	9
1 Einleitung	11
1.1 MIF als Zytokin und Hormon	11
1.1.1 Historisches	11
1.1.2 MIF als T-Zell- und Makrophagen-Zytokin	12
1.1.3 MIF als Hypophysenhormon und endokriner Faktor	14
1.1.4 Die Rolle von MIF bei Krankheiten	15
1.2 MIF als Enzym	19
1.3 Struktur von MIF	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	25
2.2 Geräte, Chemikalien und Enzyme	26
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	27
2.3.1 Medien	27
2.3.2 Puffer und Lösungen	27
2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.3.2.3 Western Blot	28
2.4 Methoden	28
2.4.1 Anzuchtbedingungen <i>E. coli</i>	28
2.4.2 Molekulargenetische Methoden	29
2.4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	29
2.4.2.2 Ortsspezifische Mutagenese mittels Polymerasekettenreaktion	29
2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.4.2.4 Gelelution von DNA-Fragmenten	29

2.4.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	30
2.4.2.6 Plasmidpräparation	30
2.4.2.7 DNA-Sequenzierung	30
2.4.2.8 Ligation	30
2.4.3 Expression der MIF-Mutanten in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	30
2.4.4 Aufreinigung der MIF-Mutanten	31
2.4.5 Renaturierung der MIF-Mutanten	31
2.4.6 LPS-Bestimmung	32
2.4.7 SDS-Gelelektrophorese	32
2.4.7.1 Gelelektrophorese mit dem <i>Phastgel</i> -System	32
2.4.7.2 Gelelektrophorese nach Laemmli	32
2.4.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
2.4.9 Western Blot	33
2.4.10 Immunfärbung von Proteinen	33
2.4.11 Massenspektrometrische Analyse	34
2.4.12 Analytische Gelfiltration	34
2.4.13 Quervernetzung	34
2.4.14 <i>Two-Hybrid-Screening</i>	35
2.4.15 Untersuchung der Sekundärstruktur von MIF	35
2.4.15.1 Circular dichroismus-Spektropolarimetrie	35
2.4.15.2 Guanidiniumhydrochlorid-induzierte Denaturierung	35
2.4.16 Biochemische und biologische Charakterisierung von MIF	36
2.4.16.1 Oxidoreduktasetest	36
2.4.16.2 Insulinassay	37
2.4.16.3 Tautomerase-Assay	37
2.4.16.4 Leishmanien-Tötungs-Test	37
2.4.16.5 Glucocorticoid- <i>Overriding</i> -Assay	38
2.4.17 Untersuchung des potenziellen Kanals im MIF-Trimer	39
2.4.17.1 Herstellung der Liposomen	39
2.4.17.2 Messung der Carboxyfluorescein-Freisetzung aus Liposomen	39
2.4.18 Strukturvergleiche und Modelling	39
2.4.19 Kultivierung und Ernte eukaryontischer Zellen	40
2.4.20 Transienter AP-1-Reporterassay	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Untersuchung des C-Terminus von MIF	41
3.1.1 Design der C-terminalen Mutanten	41
3.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung der C-terminalen Mutanten	41

3.1.3 LPS-Gehalt der Wildtyp- und Mutanten-MIF-Präparationen	43
3.1.4 Massenspektrometrische Analyse der Mutanten	43
3.1.5 Strukturelle Charakterisierung der C-terminalen Mutanten	44
3.1.6 Enzymatische Aktivität	49
3.1.7 Biologische Aktivität der C-terminalen Mutanten	52
3.2 Die kanalbildende Aktivität von MIF	54
3.3 Der Oligomerisierungsstatus von MIF	57
3.3.1 <i>Crosslinking</i> -Analysen von MIF und der Mutanten	57
3.3.2 <i>Molecular Modelling</i> eines dimeren MIF	60
3.4 Biologische Aktivität von MIF	62
3.4.1 Glucocorticoid- <i>Overriding</i> -Assay	62
3.4.2 Korrelation von biologischer und enzymatischer Aktivität von MIF	63
3.5 Die Suche nach MIF-bindenden Proteinen	65
3.5.1 <i>Two-Hybrid-Screening</i> auf MIF-bindende Proteine	65
3.5.2 MIF als Inhibitor der AP-1-abhängigen Transkription	66
3.5.2.1 Aktivierung der AP-1-abhängigen Transkription durch Jab1	66
3.5.2.2 TNF- α -induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivierung	68
3.5.2.3 UV-induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivierung	69
4 Diskussion	71
4.1 Bedeutung des C-Terminus für die Struktur von MIF	71
4.2 Untersuchung der kanalbildenden Funktion von MIF	73
4.3 Der Oligomerisierungsstatus von MIF	74
4.4 Die immunologische und enzymatische Aktivität von MIF	78
4.5 MIF als Jab1-bindendes Protein	82
Literatur	86
Publikationen	104

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner und Herrn Dr. Jürgen Bernhagen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Brunner danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier möchte ich mich für die Übernahme des Ko-referats bedanken.

Dr. Jürgen Bernhagen danke ich besonders für die Betreuung und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Robert Kleemann und Nguyen Tuyet Mai danke ich für die Überlassung ihrer MIF-Mutanten und der Unterstützung bei der Durchführung der Redoxassays.

Prof. Dr. Dr. hc. Wolfgang Voelter und Dr. Afroditi Kapurniotu vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen danke ich für die massenspektroskopischen Analysen und die Unterstützung bei den CD-Messungen.

Prof. Dr. Hans Rorsman und Dr. Evald Rosengren von der Universität Lund (Schweden) danke ich für die Durchführung der Tautomerasemessungen. PD Dr. André Gessner und Dr. Stefan Jüttner vom Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Universität Erlangen danke dich für die Testung der Mutanten im Leishmanien-Assay.

Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier, PD Dr. Franz-Josef Johannes und Dr. Angelika Hausser vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart danke ich für die Überlassung der Reporter-genplasmide und die Ermöglichung der Luminometer-messungen.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Grenzflächen-verfahrenstechnik für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Abkürzungen

4-OT	4-Oxalocrotonatautomerase
5-CHMI	5-Carboxymethyl-2-hydroxy-muconatisomerase
Abb.	Abbildung
ACTH	Adenocorticotropes Hormon
AP-1	<i>Activating protein 1</i>
AS	Aminosäure
BASED	Bis-(β -(4-azidosalicylamido)ethyl)disulfid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CXXC	Cys-Xaa-Xaa-Cys-Motiv
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	<i>Delayed-type hypersensitivity</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GC-OR	<i>Glucocorticoid overriding</i>
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GIF	Glykosylierungs-Inhibitionsfaktor
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
HED	2-Hydroxyethyl-disulfid
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
huMIF	Humanes MIF
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin

Abkürzungen

IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
Jab1	<i>Jun-activation domain-binding protein 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Makrophagen migrationsinhibierender Faktor
muMIF	Murines MIF
NA	Nicht anwendbar
NaPP	Natriumphosphatpuffer
ND	<i>Not determined</i> (Nicht bestimmt)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	Amino-terminal
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMA	Phorbolster
rMIF	Rekombinantes MIF exprimiert aus <i>E. coli</i>
RP-HPLC	<i>Reverse phase-HPLC</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
[θ]	Mittlere, molare Elliptizität pro Aminosäurerest
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
wt	Wildtyp
wtMIF	Wildtyp-MIF
$\Delta G_d^{H_2O}$	Freie Entfaltungsentnergie in Abwesenheit von Denaturand

Des Weiteren gelten die internationalen Abkürzungsregeln nach IUPAC sowie internationale Einheiten- und Größenbezeichnungen.

Zusammenfassung

Das Zytokin Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF) wurde vor über 30 Jahren im Zusammenhang mit der Spättyp-Hypersensitivität entdeckt und phänomenologisch als T-Zellprodukt beschrieben, das die ungerichtete Migration von Makrophagen hemmt. Neuere Studien zeigen auf, dass MIF an der Regulation zentraler Stressantworten beteiligt ist. Inzwischen ist eine große Anzahl, meist proinflammatorischer Wirkungen von MIF bekannt, welche weit über die ursprünglich namensgebende Migrationsinhibition hinausgehen. Die Aufklärung der Struktur von MIF durch verschiedene Methoden führte zwar zu einem tieferen Verständnis, lieferte aber auch sich widersprechende Ergebnisse. Darüber hinaus wurden bisher weder ein Rezeptor für MIF noch molekulare Mechanismen, welche die biologischen Wirkungen von MIF erklären könnten, gefunden.

Die vertiefte Untersuchung der Struktur von MIF, Struktur-Aktivitätsstudien sowie die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus waren deshalb Inhalt dieser Arbeit.

Es wurden Deletions- und Austauschmutanten von MIF hergestellt und der Einfluss dieser Mutationen sowohl auf die Struktur als auch auf die enzymatische und immunologische Aktivität von MIF untersucht. Durch Deletionen im C-terminalen Bereich von MIF konnte gezeigt werden, dass diese Region des Moleküls für die strukturelle Integrität von MIF entbehrlich ist. Auch für die enzymatische Oxidoreduktaseaktivität von MIF ist dieser Bereich nicht erforderlich. Der C-Terminus spielt jedoch eine Rolle bei der enzymatischen Tautomeraseaktivität und bei den zytokinartigen Wirkungen von MIF. Vergleichende Studien mit anderen MIF-Mutanten zeigen auf, dass die Basis der enzymatischen Oxidoreduktaseaktivität im zentralen CXXC-Motiv zu finden ist. Die Tautomeraseaktivität ist hingegen im N-terminalen Ende von MIF und in den diesen räumlich umgebenden C-terminalen Aminosäuren lokalisiert.

Die Untersuchung des laut Röntgenstruktur im Trimer vorhandenen Lösungsmittelzugänglichen Kanals ergab, dass diesem wohl keine funktionelle Bedeutung zukommt.

Über die Oligomerisierung von MIF liegen sich widersprechende Untersuchungen vor, die je nach verwendeter Technik unterschiedliche Resultate erbrachten. Da der Oligomerisierungsgrad von Bedeutung für den Wirkmechanismus, insbesondere auch für die potenzielle Rezeptorinteraktion ist, wurden Studien hierzu unter physio-

logischen Lösungsbedingungen durchgeführt. *Crosslinking*-Untersuchungen und Gelfiltrationsanalysen zeigen, dass MIF bei physiologischen Konzentrationen als Mischung aus Monomer, Dimer und Trimer vorliegt. Das Trimer, das nach den Röntgenstrukturanalysen die einzige oder zumindest vorherrschende Form sein sollte, hat überraschenderweise nur einen kleinen Anteil an der Oligomerenverteilung unter diesen Bedingungen.

Die Untersuchung der biologischen Wirkung von MIF wurde lange Zeit durch das Fehlen zuverlässiger und spezifischer Assays für MIF erschwert. Basierend auf der Glucocorticoid-*Overriding*-Wirkung von MIF wurde deshalb ein Assay entwickelt, der die Untersuchung der immunologischen Aktivität von MIF und der Mutanten ermöglichte. Die Untersuchung zeigte, dass die enzymatische Oxidoreduktase-Aktivität an den immunregulatorischen Effekten von MIF zumindest beteiligt ist. Die beobachteten Teilaktivitäten der Mutanten zeigen aber auch, dass möglicherweise weitere Mechanismen existieren.

Mittels eines *Two-Hybrid-Screens* wurde nach Bindungspartnern für MIF gesucht. Hierbei zeigte es sich, dass Jab1, ein Co-Aktivatoren der AP-1-abhängigen Transkription, spezifisch an MIF bindet. Durch Reporterassays wurde gezeigt, dass MIF in der Lage ist, die aktivierende Wirkung von Jab1 auf die AP-1-abhängige Transkription vollständig aufzuheben.

Die Identifizierung von Jab1 als MIF-Bindungspartner zeigt eine mögliche molekulare Grundlage für die bekannten immunologischen Wirkungen von MIF auf. Durch die intrazelluläre, direkte Interaktion mit diesem Transkriptions-Koaktivator könnte MIF zahlreiche regulatorische Wege in der Zelle modulieren.

1 Einleitung

Der Makrophagen migrationsinhibierende Faktor (*Macrophage migration inhibitory factor*, MIF) ist ein klassisches T-Zell-Zytokin und wurde im Zusammenhang mit der Spättyp-Hypersensitivität entdeckt und als T-Zellprodukt beschrieben, das *in vitro* die ungerichtete Migration von Makrophagen hemmt (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Trotz seiner Entdeckung vor über 30 Jahren schritt die Aufklärung der molekularen Wirkung von MIF nur langsam voran. Erst die vor wenigen Jahren erfolgte Klonierung des MIF-Gens führte zu weiteren Erkenntnissen (Weiser et al., 1989; Bernhagen et al., 1993). In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl, meist proinflammatorischer Effekte von MIF bekannt, welche weit über die ursprünglich namensgebende Migrationsinhibition hinausgehen.

1.1 MIF als Zytokin und Hormon

1.1.1 Historisches

Erste Hinweise auf migrationsinhibierende Faktoren gehen auf das Jahr 1932 zurück. Rich und Lewis zeigten, dass die Migration von Leukozyten und Makrophagen in Kulturen Tuberkulin-behandelter Gewebe durch Antigen inhibiert wurde und schlossen daraus, dass Lymphozyten durch Antigen zur Produktion von MIFs angeregt werden (Rich und Lewis, 1932). 1962 entwickelten George und Vaughan eine verbesserte Methode zur Messung der Migration von mononukleären Zellen in Kapillarröhrchen (George und Vaughan, 1962). Die eigentliche Definition von MIF als eigenständigen löslichen Faktor geht auf die Arbeiten von David et al. und Bloom und Bennett in den 60er Jahren zurück (David et al., 1964; Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass zelluläre Immunreaktionen wie die Spättyp-Hypersensitivität (*Delayed-type hypersensitivity*, DTH) durch einen löslichen, von aktivierten T-Zellen gebildeten Faktor verursacht werden.

In den folgenden Jahren wurde die Wirkung von MIF auf Makrophagen genauer untersucht. Es wurde gezeigt, dass MIF neben der Migrationsinhibition weitere Makrophagenfunktionen wie die Oberflächenadhäsion und Phagozytose aktiviert (Nathan et al., 1971; Nathan et al., 1973). Die molekulare Charakterisierung von MIF blieb jedoch unvollständig und widersprüchlich, da MIF nicht in hoher Reinheit hergestellt werden konnte (Weiser et al., 1981; Weiser et al., 1984; Weiser et al., 1985). Die Versuche zur biologischen Funktion von MIF wurden deshalb in der Regel mit Kulturüberständen von grob gereinigten Leukozytenkulturen durchgeführt. Es stellte

sich später heraus, dass auch andere in den Überständen enthaltene Zytokine, wie zum Beispiel Interferon- γ und Interleukin-4, eine migrationsinhibierende Wirkung auf Makrophagen haben (Thurman et al., 1985; McInnes und Rennick, 1988). Auch mitogene Komponenten wie LPS, das oft als Verunreinigung bei der Präparation von Proteinen auftritt, inhibiert die Migration von Makrophagen (Weiser et al., 1992; David, 1993; Weiser et al., 1997). Die Klonierung einer humanen MIF-cDNA und damit auch die Kenntnis der Gen- und Proteinsequenz von MIF im Jahre 1989 konnte zur molekularen Charakterisierung von MIF nur wenig beitragen, da es nicht gelang rekombinantes, biologisch aktives MIF herzustellen (Weiser et al., 1989). Erst mit der Entdeckung von MIF in corticotropen Hypophysenzellen und der damit verbundenen Klonierung und rekombinanten Herstellung begannen umfassende Untersuchungen der biologischen Wirkung und des molekularen Mechanismus von MIF (Bernhagen et al., 1993).

1.1.2 MIF als T-Zell- und Makrophagen-Zytokin

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1966 waren aktivierte T-Zellen als Produzenten von MIF bekannt (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Neuere Arbeiten bestätigen die Rolle von MIF als wichtiges T-Zell-Zytokin. Die Stimulation von primären T-Zellen durch mitogene oder antigenspezifische Reize induziert sowohl die Bildung von MIF-mRNA als auch die Ausschüttung des Proteins (Calandra et al., 1998). MIF selbst wiederum stimuliert die Proliferation von T-Zellen (Bacher et al., 1996). Eine Rolle von MIF als Suppressorfaktor für T-Helfer- und NK-Zellen wird noch kontrovers diskutiert (Mikayama et al., 1993; Liu et al., 1994; Sugie et al., 1997; Sugie et al., 1999). Bei einer anderen pathologischen zellulären Immunreaktion, der immuninduzierten Glomerulonephritis, ist MIF entzündungsfördernd beteiligt (Lan et al., 1996; Lan et al., 1997a; Lan et al., 1997b).

Ebenfalls in T-Zellen wurde der Zusammenhang zwischen MIF und Glucocorticoiden aufgezeigt. Durch rekombinantes MIF konnte die Proliferationsinhibition und die Hemmung der Zytokin-Synthese bei stimulierten T-Zellen, die mit hohen Glucocorticoiddosen behandelt wurden, aufgehoben werden (Bacher et al., 1996). Umgekehrt stimulieren Glucocorticoidgaben in physiologischen Konzentrationen die MIF-Sekretion aus T-Zellen.

Während für lange Zeit MIF als reines T-Zellprodukt angesehen wurde, das auf Makrophagen wirkt, zeigen neuere Untersuchungen, dass MIF in bedeutender Menge von Makrophagen gebildet wird. Sowohl in ruhenden Makrophagenlinien wie

auch in unstimulierten primären Monozyten liegt MIF in großer Menge vorgeformt vor (Calandra et al., 1994). Nach Stimulation durch verschiedene Agenzien wie Tumor Nekrose Faktor (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), *Toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) und Lipopolysaccharid (LPS) wird MIF spezifisch aus diesen Zellen sekretiert (Calandra et al., 1994; Bernhagen et al., 1998; Calandra et al., 1998). Die Sekretion von MIF als Antwort auf diese proinflammatorischen Stimulanzen folgt einer glockenförmigen dosisabhängigen Kurve. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein einer negativen Rückkopplungsschleife sein, welche die MIF-Produktion herunterreguliert. IL-10 und *Activated protein C* (APC) hemmen die Ausschüttung von MIF (Jüttner et al., 1998; Schmidt-Supprian, 1998).

Die genauere Untersuchung der schon lange bekannten Rolle von MIF bei der Spättyp-Hypersensitivität DTH ergab, dass die Makrophagen und nicht die T-Zellen die hauptsächliche Quelle der MIF-Ausschüttung während der DTH sind (Bernhagen et al., 1996). Die Gabe von Anti-MIF-Antikörpern führte bei Mäusen zu signifikant reduzierten DTH-Antworten.

MIF wirkt proinflammatorisch auf Makrophagen und induziert die Bildung von TNF- α , des Stickstoffoxids NO und der NO-Synthetase (bei Co-Stimulation mit IFN- γ) und des O₂⁻-Superoxidationradikals sowie der Interleukine 1, 6 und 8 (Calandra et al., 1994; Bernhagen et al., 1994c; Calandra et al., 1995; Jüttner et al., 1998; Swope et al., 1998a). MIF aktiviert Makrophagen zur Abtötung des intrazellulären Parasiten *Leishmania major* (Jüttner et al., 1998; Xu et al., 1998). Diese MIF-abhängige Aktivierung der Parasitentötung scheint TNF- α und Stickoxid NO zu benötigen. Andere makrophagen-aktivierende Wirkungen von MIF, wie die Stimulation der Phagozytose, scheinen ebenfalls auf der Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , Interleukin 1, 6 und 8 zu beruhen (Nathan et al., 1971; Onodera et al., 1997).

Weitere Immunzellen wurden kürzlich ebenfalls als Bildungsorte oder Zielzellen von MIF innerhalb von Immunreaktionen identifiziert. Dies sind eosinophile Granulozyten (Rossi et al., 1998), neutrophile Granulozyten (Swope und Lolis, 1999), Gewebemakrophagen (Bacher et al., 1997), B-Lymphozyten (Bacher et al., 1996; Takahashi et al., 1999), basophile Leukozyten und Mastzellen (Chen et al., 1998).

Einen Einfluss von MIF im Rahmen der Schwangerschaft und bei der embryonalen Entwicklung legt der Nachweis der Expression von MIF in der humanen Plazenta nahe (Arcuri et al., 1999). Beim Beginn einer Schwangerschaft mit der Nidation der

Eizelle spielen proinflammatorische Zytokine eine Rolle (Hunt und Robertson, 1996; Baines et al., 1997). MIF könnte über die Aktivierung von Makrophagen eine Bedeutung bei Beginn und Erhaltung einer Schwangerschaft besitzen (Arcuri et al., 1999).

In der Augenlinse werden signifikante Mengen MIF gebildet (Wistow et al., 1993; Matsuda et al., 1996; Matsuda et al., 1996; Matsuda et al., 1997). Eine Erklärung für das Auftreten eines proinflammatorischen Zytokins im Auge konnte noch nicht gefunden werden. Das Auge stellt eigentlich einen immun-privilegierten Ort dar, in dem immunvermittelte entzündliche Reaktionen unterdrückt sind, um das Auge zu schützen. Deshalb wurde über eine immunsuppressive Wirkung von MIF spekuliert (Apte et al., 1998). MIF scheint eine inhibitorische Wirkung auf natürliche Killerzellen (NK) zu besitzen und dadurch die NK-vermittelte Lyse von cornealen Endothelzellen und Epithelzellen der Augenlinse zu verhindern.

Mit Ausnahme dieses antiinflammatorischen Effektes von MIF auf natürliche Killerzellen sind die Wirkungen von MIF bei Immun- und Entzündungsantworten durchweg proinflammatorischer bzw. immunstimulatorischer Natur (Bernhagen et al., 1998).

1.1.3 MIF als Hypophysenhormon und endokriner Faktor

Als weitere Quelle von MIF wurden die Hypophysenzellen entdeckt (Bernhagen et al., 1993; Bernhagen, 1994a). MIF wird konstitutiv in corticotropen und thyrotropen Hypophysenzellen gebildet und wird nach Stimulation mit LPS aus den Hypophysenzellen in die Peripherie sekretiert. MIF colokalisiert sowohl mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) als auch mit Thyrotropin (TSH) in Sekretionsvesikeln. Wie auch die Ausschüttung von ACTH wird die MIF-Sekretion aus corticotropen Zellen durch *Corticotropin releasing hormone* (CRH) stimuliert (Bernhagen et al., 1993; Bernhagen et al., 1995; Nishino et al., 1995). MIF verhält sich wie andere Stresshormone aus dem Regulationsnetzwerk der HPA-Achse. Während systemischen Infektionen oder Stress scheint die Hypophyse die hauptsächliche Quelle von MIF im Serum zu sein (Bernhagen et al., 1993).

MIF wird in glucoseabhängiger Weise von den β -Zellen des endokrinen Pankreas sekretiert und stimuliert seinerseits die Insulinsekretion aus diesen Zellen (Waeber et al., 1997; Sakaue et al., 1999; Waeber et al., 1999). MIF ist damit das erste von β -Zellen ausgeschiedene Protein, das die Insulin-Sekretion positiv reguliert. Auch immunhistochemische Untersuchungen in der Nebennierenrinde oder im Pankreas

von Ratten nach experimentell induzierter Endotoxämie weisen auf eine funktionelle Beteiligung von MIF an endokrinen Prozessen hin (Bacher et al., 1997).

Mögliche endokrine Effekte von MIF werden im Zusammenhang mit der Identifizierung von MIF im Testis und in den Ovarien diskutiert (Meinhardt et al., 1996; Suzuki et al., 1996a; Wada et al., 1997; Meinhardt et al., 1998). Die Ausschüttung von MIF in den Ovarien als Antwort auf die Stimulation mit gonadotropem Hormon HCG und Lutropin trägt in nicht unerheblichem Maße zur MIF-Konzentration im Blut bei (Wada et al., 1999).

Ein möglicher funktioneller Zusammenhang der diversen hormonähnlichen Merkmale von MIF ist derzeit noch völlig unklar.

1.1.4 Die Rolle von MIF bei Krankheiten

Die Behandlung mit Anti-MIF-Antikörpern zeigt die Bedeutung von MIF bei systemischen Infektionen (Bernhagen et al., 1993; Calandra et al., 1998; Calandra et al., 2000). Die Gabe von LPS oder TSST-1 führt im Mausmodell zum Tod mit allen Symptomen von bakterieller Sepsis. Die Vorbehandlung von Mäusen mit Anti-MIF-Antikörpern führt zu einer signifikant erhöhten Überlebensrate. Dieser Schutz vor LPS-induzierter Letalität wurde auch schon beim Einsatz von Antikörpern gegen andere Zytokine wie TNF- α beobachtet (Tracey et al., 1987; Tracey, 1992). Die Symptome der Sepsis können im Tiermodell durch die Gabe von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β erzeugt werden (Okusawa et al., 1988; Tracey, 1992). Die Gabe von MIF alleine führt nicht zu solchen Symptomen; erst die gleichzeitige Injektion von LPS führt zu einer stark erhöhten Letalität (Bernhagen et al., 1993).

Die Wirkung von MIF als Gegenspieler von Glucocorticoiden konnte nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* gezeigt werden. Durch Gabe von Glucocorticoiden können Mäuse vor der letalen Wirkung von LPS-Injektionen geschützt werden. Eine gleichzeitige Injektion von MIF mit Glucocorticoiden hebt diesen Effekt vollständig auf (Calandra et al., 1995). In TNF- α -*Knockout*-Mäusen konnte die Bedeutung von MIF für die Sepsis bestätigt werden (Calandra et al., 2000).

Die Ausschaltung des MIF-Gens in Mäusen bestätigte einige Resultate der *in vivo*-Untersuchungen mit Anti-MIF-Antikörpern (Bozza et al., 1999). MIF^{-/-}-Mäuse scheinen sich normal zu entwickeln und weisen keine organischen Besonderheiten

auf. Die Stimulation mit hohen Dosen LPS zeigte, dass MIF^{-/-}-Mutanten widerstandsfähig gegen die letalen Auswirkungen der Sepsis sind. Dabei war der TNF- α -Spiegel im Blut der Mutanten deutlich niedriger als in Wildtypmäusen. Nach Stimulation mit LPS und IFN- γ zeigten die MIF^{-/-}-Mutanten geringere TNF- α -Ausschüttung und eine erhöhte NO-Produktion. Nach der Infektion der Lunge mit gramnegativen *Pseudomonas aeruginosa* konnte in den MIF^{-/-}-Mäusen ein beschleunigtes Abklingen der Infektion beobachtet werden.

Eine nicht unbedeutende Rolle scheint MIF auch beim *Acute respiratory distress syndrome* (ARDS) zu spielen. ARDS ist eine oft tödlich verlaufende Krankheit mit einer inflammatorischen Reaktion in der Lunge als Folge von akuten Traumata oder von Sepsis. Die Aktivierung von Neutrophilen führt hierbei zum Zusammenbruch der Endothel- und Epithelmembranen der Lunge. ARDS-Patienten weisen erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in den Alveolen auf. Die Gabe von Anti-MIF-Antikörpern reduziert die Anzahl der Neutrophilen in der Lunge von Mäusen (Makita et al., 1998). Diese Wirkung scheint nicht direkt durch einen chemotaktischen Effekt von MIF hervorgerufen zu werden, sondern vielmehr durch eine mögliche Induktion von Chemokinen wie MIP-2 (*macrophage chemoattractant inflammatory protein-2*) (Swope und Lolis, 1999). Die erhöhten MIF-Konzentrationen von ARDS-Patienten stammen von alveolären Makrophagen (Donnelly et al., 1997). MIF überschreibt den inhibierenden Effekt von Glucocorticoiden in alveolären Zellen von ARDS-Patienten. Stimulation alveolärer Zellen mit exogenem MIF führt zur Induktion von TNF- α und IL-8, während die Zugabe von Anti-MIF-Antikörpern deren Produktion verringert. MIF könnte somit den anti-inflammatorischen Effekt von pharmazeutisch eingesetzten Glucocorticoiden aufheben.

Bei einigen anderen Krankheiten scheint MIF ebenfalls eine Rolle zu spielen, z. B. bei der rheumatoiden Arthritis (Mikulowska et al., 1997; Leech et al., 1998; Leech et al., 1999; Zschäbitz et al., 1999), bei Asthma (Rossi et al., 1998), bei IgA-Nephropathien (Taniguchi et al., 1998) und bei proliferativer Vitreoretinopathie (Mitamura et al., 1999). Darüber hinaus scheint es auch bei Formen der Dermatitis (Shimizu et al., 1997) und bei der Multiplen Sklerose (Bernhagen et al., 1999) beteiligt zu sein. Zum Prozess der Wundheilung nach UV-Bestrahlung und nach mechanischen Verletzungen der Epidermis scheint MIF in Verbindung mit anderen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α beizutragen (Waelti et al., 1992; Shimizu et al., 1999). Eine Behandlung mit Anti-MIF-Antikörpern führt *in vivo* zur Verzögerung der Wundheilung (Abe et al., 2000). Die erhöhten MIF-Konzentrationen am Verletzungsort wirken dabei möglicherweise über die nachgewiesene chemotaktische Wirkung auf

Keratinocyten. Im Mausmodell der Autoimmunkrankheit EAU (experimentelle Autoimmun-Uveoretinitis) wurde durch Injektion von Anti-MIF-Antikörpern gezeigt, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Proliferation von T-Zellen spielt (Kitaichi et al., 2000).

Neuere Arbeiten weisen auf eine Rolle von MIF im Rahmen der Apoptose hin. Mittels Antisense-MIF wurde gezeigt, dass MIF die anti-IgM vermittelte Apoptose in B-Zellen unterdrückt (Takahashi et al., 1999). MIF hemmt ebenfalls die durch pro-oxidativen Stress induzierte Apoptose in HL-60-Monozyten (Nguyen et al., Manuskript in Vorbereitung). Eine apoptosehemmende Wirkung von MIF durch die Unterdrückung der Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 wurde von Hudson et al. gefunden (Hudson et al., 1999). Aktivierte Makrophagen schütten NO und andere Sauerstoffradikale aus (MacMicking et al., 1997). Diese sind jedoch auch in der Lage, Apoptose in den Makrophagen selbst zu induzieren. Durch die Hemmung der Apoptose in den Makrophagen könnte MIF ein Schutz vor Selbstzerstörung darstellen. Es sind einige chronisch-entzündliche Erkrankungen bekannt, die im Verdacht stehen, zur Tumorentstehung ursächlich beizutragen (Weitzman und Gordon, 1990). Da an den Orten der Entzündung sowohl hochreaktive Oxidantien, welche zu DNA-Schäden führen, als auch erhöhte MIF-Konzentrationen gefunden wurden, welche wiederum die p53-kontrollierte Apoptose dieser beschädigten Zellen verringern, könnte dies zu einer Anhäufung von onkogenen Mutationen und damit zur Tumorentstehung führen (Hudson et al., 1999). Einen weiteren Einfluss von MIF auf die Tumorentwicklung zeigen Chesney et al. auf. Durch den Einsatz von MIF-Antikörpern wurden das Wachstum und die Vaskularisierung von Lymphomen in Mäusen signifikant gehemmt (Chesney et al., 1999). Diese angiogene Aktivität wurde auch schon bei anderen Chemokinen wie IL-8 beobachtet (Arenberg et al., 1996).

In Zusammenhang mit der Apoptose-hemmenden Wirkung von MIF könnte auch der Befund stehen, dass MIF die Umwandlung von zwei toxischen Quinonprodukten katalysiert (Luo et al., 1998; Matsunaga et al., 1999a; Matsunaga et al., 1999b) (siehe Kapitel 1.2). Es wurde spekuliert, dass MIF so zur Entgiftung der Catecholamine beiträgt. Von diesen Dopaminen geht auch eine apoptotische Wirkung aus, welche teilweise redoxvermittelt ist (Offen et al., 1995; Offen et al., 1996; Luo et al., 1998; Offen et al., 1999).

In den parasitischen Nematoden *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* und *Onchocera volvulus* wurde die Expression und Sekretion eines MIF-Homologs nachgewiesen (Pastrana et al., 1998; Pennock et al., 1998). Die Klonierung dieses bmMIF ergab, dass im Vergleich zu humanem MIF die Aminosäuren zu über 40 Prozent identisch

sind. Darüber hinaus weist bmMIF das für MIF typische zentrale CXXC-Motiv auf, besitzt wie huMIF eine Tautomeraseaktivität und besitzt eine mit humanem MIF vergleichbare Makrophagen-migrationsinhibierende Wirkung (Esumi et al., 1998; Pastrana et al., 1998). Über die Frage, wieso Parasiten ein immunstimulierendes Zytokin ausschütten, kann bisher nur spekuliert werden. Möglicherweise stellt MIF nur den ersten Schritt in einer Veränderung der Immunantwort des befallenen Organismus dar. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass Zytokine eine essentielle Rolle beim Wachstum und der Fortpflanzung von einigen Parasiten spielen, so dass die Ausschüttung von MIF-Homologen ein Schritt zur Versorgung der Parasiten mit diesen Zytokinen sein könnte (Amiri et al., 1992; Bakhiet et al., 1996).

1.2 MIF als Enzym

Über seine Eigenschaften als Zytokin hinaus sind für MIF auch enzymatische Aktivitäten beschrieben worden. Die erste für MIF beschriebene enzymatische Aktivität war die Glutathion-S-Transferase-Aktivität (Blocki et al., 1993). Sie konnte aber nachfolgend nicht bestätigt werden und ist wahrscheinlich als Artefakt anzusehen (Mühlhahn et al., 1996; Swope et al., 1998b).

Bei der Untersuchung von Melanomazellen wurde gezeigt, dass MIF die Umwandlung von D-Dopachrom (2-Carboxy-2,3-dihydroindol-5,6-quinon) zu DHICA (5,6-dihydroxyindol-2-carboxysäure) katalysiert (Abb. 1A) (Zhang et al., 1995; Rosengren et al., 1996). Das nichtphysiologische D-Dopachrom wurde in diesen Untersuchungen eigentlich als Negativkontrolle eingesetzt. Es wurde außer MIF noch ein anderes neues Enzym gefunden. Dieses Enzym, das D-Dopachrom-Tautomerase genannt wurde, besitzt eine 27%ige Sequenzidentität mit MIF. Die Aufklärung der Röntgenstruktur von D-Dopachrom-Tautomerase zeigte eine große strukturelle Verwandtschaft mit MIF und somit auch mögliche funktionelle Ähnlichkeiten (Sugimoto et al., 1999).

Bei der Suche nach den physiologischen Substraten der D-Dopachrom-Tautomeraseaktivität zeigte es sich, dass MIF die Umwandlung von 3,4-Dihydroxyphenylaminochrom und Norepinephrinchrom, beides toxische Quinonprodukte der Neurotransmitter-Catecholamine 3,4-Dihydroxyphenylamin und Norepinephrin, zu Indoldihydroxy-Derivaten katalysiert (Matsunaga et al., 1999a; Matsunaga et al., 1999b). Es wird spekuliert, dass MIF so an der Entgiftung der Catecholamine im Gehirn beteiligt sein könnte.

Als weitere katalytische Aktivität von MIF wurde die Phenylpyruvat-Tautomerase-Aktivität beschrieben (Abb. 1B) (Rosengren et al., 1997). Hierbei katalysiert MIF die Keto-Enol-Isomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat und von Phenylpyruvat. Beides sind natürlich vorkommende Abbauprodukte von Phenylalanin und Tyrosin. Ob diese beiden Substrate von physiologischer Bedeutung sind, wird bezweifelt, da die gemessenen K_m -Werte zu hoch im Verhältnis zu den bekannten physiologischen Konzentrationen sind.

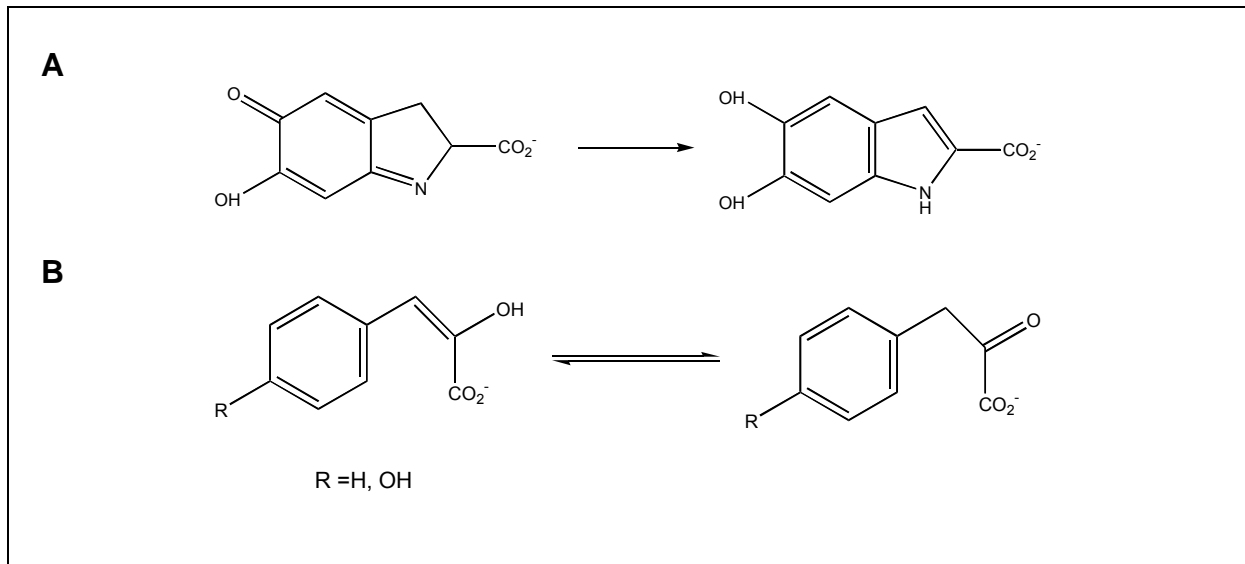


Abb. 1. Von MIF katalysierte chemische Reaktionen. A D-Dopachrom-Tautomerase (Rosengren et al., 1996) **B** Phenylpyruvat-Tautomerase (Rosengren et al., 1997)

Bei vergleichenden Studien der Sequenzen von MIFs aus verschiedenen Organismen fiel das Vorhandensein einer konservierten CXXC-Sequenz auf (Kleemann et al., 1998a; Kleemann et al., 1999). Dieses Sequenzmotiv ist als Teil des aktiven Zentrum der Thiol-Protein-Oxidoreduktasen bekannt. Zu dieser Enzymklasse gehören zum Beispiel Thioredoxin (Takahashi und Creighton, 1996), Glutaredoxin (Holmgren, 1979a), die Proteindisulfidisomerase (PDI) (Puig et al., 1994) und das bakterielle PDI-Analog DsbA (Zapun et al., 1993). Der katalytische Mechanismus dieser Enzyme beruht auf Bildung bzw. Reduktion einer katalytischen Disulfidbrücke zwischen den beiden Cystein-Resten des CXXC-Motivs. Je nach Proteinstruktur und Aminosäuresequenz innerhalb und in der Umgebung des CXXC-Motivs weisen die Thiol-Protein-Oxidoreduktasen reduzierende oder oxidierende Potenziale auf (Siedler et al., 1993; Siedler et al., 1994; Gilbert, 1995; Aslund et al., 1997). Eine Analyse der katalytischen Aktivität von MIF ergab, dass es die Reduktion von Disulfidgruppen in Insulin und 2-Hydroxyethylidisulfid (HED) katalysiert (Mischke et al., 1997; Kleemann et al., 1998a ; Kleemann et al., 1998b; Kleemann et al., 1999, und diese Arbeit).

1.3 Struktur von MIF

Die dreidimensionale Struktur von MIF wurde mittels Röntgenstrukturanalyse (Sugimoto et al., 1995; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996a; Suzuki et al., 1996b) und NMR (Mühlhahn et al., 1996) bestimmt. Das MIF-Monomer besteht aus zwei antiparallelen α -Helices und aus sechs β -Strängen, wovon vier ein β -Faltblatt bilden (Abb. 2 A). Drei Monomere bilden eine α/β -Struktur, welche aus drei zentralen β -Faltblättern besteht, die von sechs α -Helices umgeben werden (Abb. 2 B). Die Abmessungen des Komplexes betragen ungefähr $40 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$.

Die verschiedenen Röntgenstrukturanalysen von humanem und murinem MIF stimmen größtenteils überein. Die huMIF-Struktur von Sugimoto et al. beschreibt zusätzlich einen kurzen β -Strang am C-Terminus (Sugimoto et al., 1996). Damit wären am C-Terminus 2 kurze β -Stränge vorhanden und würden ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt bilden. Für dieses β -Faltblatt wird durch die Interaktion mit dem benachbarten Monomer ein Beitrag zu Stabilisierung des Trimers postuliert. Die Röntgenstruktur von murinem MIF, das eine Sequenzidentität von 90% zu humanem MIF aufweist, unterscheidet sich ebenfalls nur bezüglich des C-Terminus von humanem MIF (Suzuki et al., 1996b). Hier weist die Analyse keine Strukturelemente auf, was bedeuten könnte, dass diese Strukturen entweder aufgrund experimenteller Probleme nicht detektiert wurden, oder dass der C-Terminus von Ratten-MIF flexibel ist.

MIF weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den bakteriellen Enzymen 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconatisomerase (CHMI) (Abb. 2 C) und 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT) (Abb. 2 D) auf (Subramanya et al., 1996; Suzuki et al., 1996b). Beide Enzyme katalysieren Umwandlungen von aromatischen Kohlenwasserstoffen zu Produkten, die in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden (Whitman et al., 1992; Hajipour et al., 1993). CHMI ist ein Homotrimer mit einer zentralen β -Faltblattstruktur, vergleichbar mit der von MIF. Bei 4-OT liegt ein Hexamer vor, welches aus jeweils drei Dimeren, die in ihrer Struktur stark dem MIF-Monomer ähneln, aufgebaut ist. Auch hier findet sich die zentrale β -Faltblattstruktur, die von α -Helices umgeben ist. Trotz der großen Ähnlichkeit auf struktureller Ebene finden sich keine Sequenzhomologien zwischen MIF, CHMI und 4-OT.

Zum Oligomerisierungszustand von MIF lagen zu Beginn dieser Arbeit sich stark widersprechende Beobachtungen vor. Die Röntgenstrukturanalysen sehen MIF als Trimer (Kato et al., 1996; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996b). Dagegen wurde

mittels NMR das Vorliegen eines Dimers bestimmt (Mühlhahn et al., 1996). Während bei der analytischen Ultrazentrifugation von murinem MIF die Bildung eines Dimers beobachtet wurde (Nishihira et al., 1995), wurde durch Gelfiltration bei humanem MIF ein Dimer (Zeng et al., 1993) oder bei bovinem MIF ein Monomer gefunden (Galat et al., 1994). SDS-PAGE von MIF, das chemisch quervernetzt wurde, erbrachte Hinweise auf das Vorliegen von Trimeren (Bendrat et al., 1997).

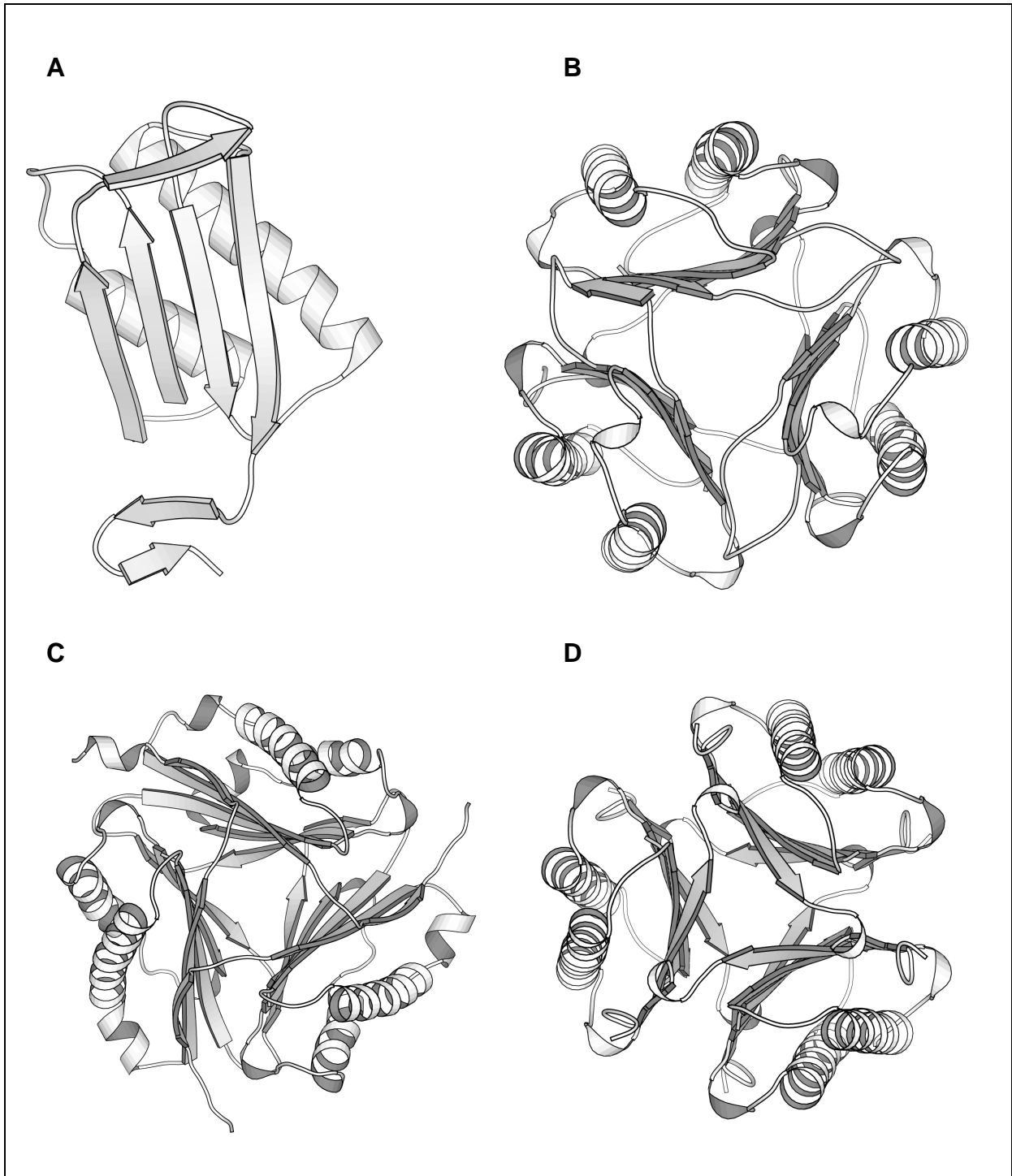


Abb. 2. Dreidimensionale Struktur von A MIF Monomer B MIF Trimer C 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconatisomerase (CHMI) Trimer D 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT) Hexamer.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularen Grundlagen der biologischen Effekte von MIF sind weitgehend ungeklärt. Es sind weder ein Rezeptor noch sonstige biologisch relevante Bindungspartner von MIF bekannt.

Neben der vertieften Untersuchung der strukturellen Gegebenheiten von MIF sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der Wirkmechanismen von MIF Struktur-Aktivitätsstudien durchgeführt werden. Durch Mutagenesestudien sollten die Grundlagen der verschiedenen beobachteten Aktivitäten von MIF aufgeklärt werden und insbesondere auch der Zusammenhang zwischen den enzymatischen und immunologischen Aktivitäten von MIF untersucht werden. Darüber hinaus sollte versucht werden, durch den Einsatz von *Two-Hybrid-Screening* molekulare Interaktionspartner von MIF zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1: Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp/Phänotyp	Herkunft
BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)	Stratagene, Heidelberg
DH5α	F ⁻ Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>supE44</i> <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA</i> λ <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Life Technologies, Eggenstein

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft/Referenz
pET11b	T7-Promotorregion	Amp	Novagen, Abington/UK
pMIF	huMIF in pET11b	Amp	(Bernhagen et al., 1994c)
pRM10.1	huMIF C-term. um 5 AS verkürzt	Amp	(Mischke et al., 1997)
pRM10.4	huMIF C-term. um 10 AS verkürzt	Amp	(Mischke et al., 1997)
pAS-1	Bindungsdomäne für Gal4	Amp	Clontech, Heidelberg
pRM12	huMIF in pAS2-1	Amp	diese Arbeit
pTRE	AP-1-Promotor vor Luziferase	Amp	(Angel et al., 1987)
pRSV-LacZ	β-Galaktosidase	Amp	(Johannes et al., 1998)
pJAB	Jab1 in pCLneo (Promega, Mannheim)	Amp	diese Arbeit
pRK2	EGFP in pCLneo (Promega, Mannheim)	Amp	diese Arbeit

2.2 Geräte, Chemikalien und Enzyme

Acetonitril p.a.	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Agarose	Life Technologies, Eggenstein
BASED	Pierce, Rockford/USA
C8-SepPak RP-Kartusche	Waters Corp., Silica/USA
Coomassie-Brilliant-Blue G-350	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	Life Technologies, Eggenstein
DSS	Pierce, Rockford/USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
HED	Aldrich, Steinheim
IPTG	Life Technologies, Eggenstein
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose-Membranen	Schleicher & Schuell, Dassel
PhastGel™ Silver Kit	Pharmacia, Freiburg
Protein-Assay (Bradford-Reagenz)	Biorad, München
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Heidelberg
RNase	New England BioLabs, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SpectraPor7 Dialysemembran	Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Vent-DNA Polymerase	New England BioLabs, Heidelberg
Whatman 3mm Papier	Whatman International, England

Alle anderen Reagenzien wurden von Sigma, Deisenhofen, bezogen.

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 Medien

<u>LB-Medium</u>	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1l
	für Platten: 1.5 % Bacto-Agar	

2.3.2 Puffer und Lösungen

<u>TE</u>	Tris/HCl, pH 8.0	1 mM
	EDTA, pH 8.0	0.1 mM

<u>Natriumphosphatpuffer</u>	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	pH 7.2 mit 5 N NaOH	

<u>Ampicillin-Stammlösung</u>	100 mg/ml in Ethanol p.a.
-------------------------------	---------------------------

<u>Stammlösung des Oxidoreduktasetests</u>	H ₂ O	2283 µl
	Tris (500 mM, pH 8)	600 µl
	NADPH (40 mM)	30 µl
	BSA (10 mg/ml)	30 µl
	EDTA (250 mM, pH 8)	24 µl
	Glutathion-Reduktase (1 mg/ml)	18 µl
	GSH (200 mM)	15 µl

2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<u>Probenpuffer (2x)</u>	Tris, pH 6.8	125 mM
	SDS	4 %
	Glycerol	20 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
	Bromphenolblau	0.01 %

<u>Ammoniumperoxodisulfat-Lösung</u>	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	10 %
	in H ₂ O, unmittelbar vor Verwendung hergestellt	

2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

<u>Ethidiumbromid-Stammlösung</u>	10 mg/ml in H ₂ O	
<u>Auftragspuffer für DNA (10x)</u>	Bromphenolblau	0.2 %
	Xylenyanol	0.2 %
	Orange G	0.2 %
	Saccharose	60 %
<u>TBE (10x)</u>	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	7.4 g
	pH 8.3	

2.3.2.3 Western Blot

<u>CAPS-Transferpuffer</u>	10 mM CAPS 20 % Methanol in H ₂ O, pH 11 mit 5 N NaOH	
<u>Bindungspuffer</u>	Tris	50 mM
	NaCl	500 mM
	BSA	1 %
	Tween20	0.05 %
	pH 7.5 mit 6 M HCl	
<u>Blockierungspuffer</u>	Tris	50 mM
	NaCl	500 mM
	fettarmes Trockenmilchpulver	5%
	Tween20	0.05 %
	pH 7.5 mit 6 M HCl	

2.4 Methoden

2.4.1 Anzuchtbedingungen *E. coli*

Zur Anzucht von Vorkulturen und zur Präparation von Plasmiden wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12 bis 15 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Tageskulturen wurden aus der Vorkultur 1:100 angeimpft und im Schüttler inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (DU-50 Spektrophotometer, Beckman/München).

2.4.2 Molekulargenetische Methoden

2.4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Restriktionsanalyse wurden 100-500 ng DNA in 15-20 µl Endvolumen im enzym-spezifischen Puffer bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 2 h mit 1 U Restriktionsenzym behandelt.

2.4.2.2 Ortsspezifische Mutagenese mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde in PCR-Geräten vom Typ *DNA Thermal Cycler* 480 und 9700 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. In 100 µl Gesamtvolumen des Ansatzes wurden ca. 20 ng pMIF-DNA als Template und 2 U Vent-Polymerase verwendet. Die Endkonzentration der Primer betrug jeweils 10 µM und die der dNTPs jeweils 2.5 µM. Das verwendete PCR-Programm war wie folgt: 6 Minuten 94°C zur anfänglichen Denaturierung, dann 35 Wiederholungen der 3 Schritte: 70 Sekunden bei 96°C zur Denaturierung, 45 Sekunden bei 50°C zur Anlagerung der Primer und 30 Sekunden bei 72°C zur DNA-Polymerisierung. Nach Abschluss des Programms wurden die Ansätze bei 4°C gehalten. Die Isolierung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.4.2.3) und anschließender Gelelution (Abschnitt 2.4.2.4).

2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen, die 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten, in Kammern der Firmen Pharmacia (Freiburg) und Stratagene (Heidelberg). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10xAuftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm in einem Laufpuffer aus 1xTBE. Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (254 nm) identifiziert.

2.4.2.4 Gelelution von DNA-Fragmenten

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde auf dem UV-Leuchttisch (356 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des *Jetsorb Gel Extractions Kits* von Genomed (Bad Oeyenhausen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

2.4.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Ein 50 µl-Aliquot der kompetenten Zellen wurde zu 50 ng DNA gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min bei 42°C wurde zu den Zellen 1 ml LB pipettiert und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 13000 g) und Resuspendierung in 100 µl LB wurden die transformierten Zellen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und 15 h bei 37°C inkubiert.

2.4.2.6 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von kleineren und größeren Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden das *QIAprep Spin Miniprep Kit* und das *Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen (Hilden) nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

2.4.2.7 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der MIF-Mutanten wurde die Plasmid-DNA nach Abschnitt 2.4.2.6 aus *E. coli* DH5α isoliert und mit einem *Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* mit *AmpliTaq* DNA-Polymerase nach Vorschrift des Herstellers Perkin-Elmer (Weiterstadt) behandelt. Die automatisierte Sequenzierung erfolgte bidirektional mit einem Sequenziergerät der Firma Perkin-Elmer (Weiterstadt) vom Typ *ABI Prism 377*.

2.4.2.8 Ligation

Äquimolare Mengen an DNA-Fragmenten (ca. 100 ng) wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl 10xLigasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U) versetzt. Die Ligationsreaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

2.4.3 Expression der MIF-Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)

Die mit dem entsprechenden MIF-Plasmid transformierten *E. coli* BL21 (DE 3) aus einem bei -80°C gelagerten Glycerolstamm wurden auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden anschließend mit einer Spur der ausgestrichenen *E. coli* BL21 (DE 3) angeimpft und etwa drei Stunden in einem 2 Liter Kolben mit Schikane bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0.7-0.8 wurde IPTG mit 1 mM Endkonzentration zugesetzt. Als nicht-induzierte Kontrolle dienten 10 ml der

Bakterienlösung, die vor der IPTG-Induktion abgenommen wurden. Die Kontrolle und die induzierte Bakterienlösung wurden bei 37°C drei Stunden weiter geschüttelt. Anschließend wurden die induzierten *E. coli* BL21 (DE 3) in 50 ml Aliquots 30 min bei 4°C und 3000 Upm abzentrifugiert (MinifugeT, Heraeus/Stuttgart), der Überstand dekantiert und das Pellet bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.4.4 Aufreinigung der MIF-Mutanten

Ein nach der Induktion eingefrorenes Pellet wurde mit 3 ml 30 mM Tris/100 mM NaCl, pH 7.2 auf Eis resuspendiert und in der French Press (SLM Instruments, Urbana/USA) bei 1240 Psi aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 4°C mit 4000 g zentrifugiert (JA-20 Rotor; Beckman/München) und der erhaltene klare Überstand durch einen sterilen 0.2 µm Einmalfilter (Schleicher&Schuell, Dassel) gedrückt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde nach Proteinbestimmung (Bradford, 1976) bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Das im Rohextrakt gelöste MIF wurde mittels einer HQ FPLC-Anionenaustauschersäule (Roche, Mannheim) unter Verwendung des Pharmacia FPLC-Systems vorgereinigt. Die Säule wurde dazu mit vier Säulenvolumen 30 mM Tris/100 mM NaCl, pH 7.2 voräquilibriert. Je Lauf wurden etwa vier Milligramm Gesamtprotein auf die Säule gegeben. MIF wurde dann mit demselben Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert und erschien in den ersten Durchlaufaktionen (1.5 ml). Die MIF-enthaltenden Durchlaufaktionen wurden vereinigt, ihre Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und die Fraktionen bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

Eine C8-SepPak RP-Kartusche wurde mit 10 ml Methanol und danach mit 10 ml Wasser äquilibriert. Anschließend wurde soviel von der HQ-Durchlaufaktion aufgetragen, dass die Kartusche mit maximal 2 mg Protein beladen wurde. Schwach- und nichtbindende Substanzen wurden mit 10 ml Wasser und anschließend 10 ml 20% Acetonitril heruntergewaschen. MIF wurde mit 5 ml 60% Acetonitril eluiert. Bei der Aufreinigung über die C8-SepPak RP-Kartuschen wurden nahezu sämtliche LPS-Verunreinigungen entfernt (Bernhagen, 1994a). Die Proteinkonzentration im Eluat wurde nach Bradford bestimmt. Die Eluate wurden bei -80°C gefroren, lyophilisiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.5 Renaturierung der MIF-Mutanten

Das lyophilisierte MIF wurde zunächst unter reduzierenden Bedingungen mit GdnHCl entfaltet und in der daran anschließenden Dialyse langsam in die native Kon-

formation zurückgefaltet. Es wurden ausschließlich LPS-freie Materialien und Chemikalien verwendet. 1 mg lyophilisiertes MIF wurde in 3.3 ml 6 M GdnHCl (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2) gelöst. Dann wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Lösung wurde danach in einen Dialyseschlauch (SpectraPor7 Dialysemembran, MWCO 8000 Da) pipettiert und gegen 1 Liter 20 mM Natriumphosphatpuffer/5 mM DTT, pH 7.2 mindestens sechs Stunden bei 4°C dialysiert. Anschließend wurde vier Mal je sechs Stunden gegen 2 Liter 20 mM Natriumphosphat, pH 7.2 bei 4°C weiter dialysiert. Die Endkonzentration des so renaturierten, LPS-freien MIF betrug etwa 250 µg/ml.

2.4.6 LPS-Bestimmung

Der LPS-Gehalt von renaturiertem Wildtyp-MIF und der Mutanten wurde mittels des *Limulus amoebocyte lysate QCL-100 bacterial endotoxin quantitation kit* (BioWhittaker, Walkersville MD, USA) nach Vorschrift des Herstellers in 96-Well-Platten durchgeführt.

2.4.7 SDS-Gelelektrophorese

2.4.7.1 Gelelektrophorese mit dem *PhastGel*-System

Zur schnellen SDS-Gelelektrophorese von Proteinproben wurden das *PhastGel*-System der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Es wurden homogene 20 %ige Gele und SDS-Puffer-Streifen verwendet und mit dem *PhastGel Silver Kit* (Pharmacia, Freiburg) nach Vorschrift des Herstellers angefärbt. Nach der Anfärbung wurden die Gele für mindestens 1 h in 50% Methanol/10% Eisessig geschüttelt und anschließend auf dem Vakuumtrockner getrocknet.

2.4.7.2 Gelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli als diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt. Zur Auftrennung wurde das *Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell-Minielektrophorese*-System (Biorad, München) verwendet. Es wurden 10-18%ige Gele verwendet, die direkt vor ihrer Verwendung hergestellt wurden (Laemmli, 1970). Auf ein Entgasen der Lösungen wurde verzichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 5 min gekocht. Nach Abkühlen und Abzentrifugieren wurden die Proben bis zum Gebrauch auf Eis gehalten. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 10-50 µl. Die Probenauftrennung erfolgte bei

100 V und wurde gestoppt, sobald die Farbstofflaufrfront aus dem Gel trat. Als Molekulargewichtsmarker wurden vorgefärbte Standards von Life Technologies (Eggenstein) verwendet. Die Molekulargewichte der Standards betragen 2.5, 6.2, 14.3, 18.4, 29.0 und 43.0 kDa.

2.4.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde Protein-Assay-Reagenz (Biorad, München) verwendet, welches jeweils frisch 1:5 mit Wasser verdünnt wurde. Zu 980 µl verdünnter Bradford-Lösung wurden 20 µl Probenlösung pipettiert und die Lösung nach Durchmischen für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen die entsprechende Referenzlösung gemessen und anhand einer Eichkurve die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.4.9 Western Blot

Zum Probentransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte in einer *Mini Trans-blot Cell System Western Blotting* Einheit (Biorad, München). Der Transfer erfolgte bei 50 V und 150 mA für 16 h bei 4°C in CAPS-Transferpuffer (Towbin et al., 1979).

2.4.10 Immunfärbung von Proteinen

Nach dem Transfer wurden die Membranen in Blockierungspuffer 1 h inkubiert und zweimal je 20 min mit Bindungspuffer ohne BSA gewaschen. Dann wurde eine 1:1000 Verdünnung des Antikörpers in Bindungspuffer zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem fünfminütigem Waschen in Bindungspuffer ohne BSA wurden die Membranen mit einer 1:10000 Verdünnung des HRP-gekoppelten zweiten Antikörpers nach Angaben des Herstellers (Amersham, Braunschweig) für die ECF (*enhanced chemifluorescence*)-Methode entwickelt. Anschließend wurden die Banden in einem CCD-basierten Chemilumineszenzdetektionssystem (System LAS-1000, Raytest, Straubenhardt) visualisiert.

2.4.11 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse (MS) der MIF-Mutanten und MIF-Alkylierungen wurde durch matrixunterstützte Laserdesorptions-MS (LD-MS) unter Verwendung eines Kratos Kompact MALDI III Gerätes (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) durchgeführt. Als Matrixsubstanz wurde Sinapinsäure verwendet. Für jede Analyse wurden 20 individuelle Spektren akkumuliert.

2.4.12 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration von renaturiertem MIF und den Mutanten wurde auf einem HPLC-System Gold (Beckman, München) durchgeführt. Ungefähr 10 µg Protein wurden auf eine Säule vom Typ Bio-Sil SEC 125-5 mit den Abmessungen 300x7.8 mm (Biorad, München) gegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Markerproteine verwendet: bovines Serumalbumin, *Carbonic Anhydrase*, Cytochrom C und Aprotinin.

2.4.13 Quervernetzung

Für *Crosslinking* mit Glutaraldehyd wurde MIF in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) mit 1 % Glutaraldehyd für 3 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von NaBH₄ (2 M in 0.1 M NaOH) in einer Endkonzentration von 50 mM wurde die Reaktion gestoppt und die quervernetzten Produkte stabilisiert. Nach 20 min Inkubation wurde Natriumdeoxycholat (Endkonzentration 0.01 %) zugesetzt und der pH-Wert mit Trichloressigsäure (78 %) auf 2.0 erniedrigt. Nach Zentrifugation (20 min, 13000 g, 4°C) wurde das Protein mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Um den Einfluss der Konzentration auf die Oligomerbildung zu untersuchen, wurden MIF-Konzentrationen von 0.1 µM bis 18 µM eingesetzt. Als Kontrolle der *Crosslinking*-Effizienz diente Tumor Nekrose Faktor (TNF)-α in einer Konzentration von 1 µM.

Zum *Crosslinking* mit Bis-[β-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfid (BASED) wurde BASED in DMSO aufgelöst und zur Proteinlösung hinzugefügt (Endkonzentration 0.6 mg/ml). Die anschließende Photoaktivierung wurde unter UV-Licht (366 nm) bei Raumtemperatur für 30 min durchgeführt. Die Proben wurden dann wie oben beschrieben mit TCA gefällt und unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.14 Two-Hybrid-Screening

Das Hefe-*Two-Hybrid-Screening* auf MIF-Bindungsproteine wurde mit dem *Matchmaker Two-Hybrid-System* von Clontech (Heidelberg) durchgeführt. Das *Screening* erfolgte mit einer humanen Lymphozyten-cDNA-Bibliothek von Clontech. Die gesamte huMIF-Sequenz wurde als *Bait* verwendet.

2.4.15 Untersuchung der Sekundärstruktur von MIF

2.4.15.1 Circular dichroismus-Spektropolarimetrie

Circular dichroismus (CD)-Spektren wurden mit einem Jasco J-700 CD-Spektropolarimeter (JAPAN Spectroscopic LTD, Tokyo/Japan) aufgenommen. Die verwendeten Küvetten (10 mm) wurden in Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelagert und vor Verwendung mehrmals mit HFIP gereinigt. Vor jeder Messung wurden sie mit Wasser, 100% Ethanol und 100% Methanol gespült und luftgetrocknet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei einer Bandweite von 1 nm, einer Sensitivität von 20 mdeg, einem Messintervall von 0.5 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Zeitkonstante von 8 Sekunden. Alle Spektren wurden um die jeweilige Pufferbasislinie korrigiert. Dreißig Minuten vor der CD-Messung wurden die Proteine aus den Stammlösungen auf eine Endkonzentration von 1 μ M mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 aus dem letzten Dialyseschritt der Renaturierung verdünnt. Um die gleichmäßige Durchströmung des Messraums mit Stickstoff sicherzustellen, wurde nach Einlegen der Küvette in den Messschlitten bis zum Start der Messung 5 min gewartet.

2.4.15.2 Guanidiniumhydrochlorid-induzierte Denaturierung

Die MIF-Stammlösung wurde mit wachsenden Volumina einer 8 M GdnHCl-Stammlösung gemischt, so dass stets eine MIF-Endkonzentration von 1 μ M und die GdnHCl-Endkonzentrationen von 0 M, 0.5 M, 1 M, 1.5 M, 2 M, 2.5 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M und 7 M erzielt wurden. Die Proben wurden vor der CD-Messung 0.5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spektren wurden jeweils um das Referenzspektrum der entsprechenden GdnHCl-Konzentration korrigiert. Der Messbereich wurde wegen der zunehmenden Absorption des GdnHCl in höheren Konzentrationen bei Wellenlängen kleiner als 210 nm auf 210 nm bis 250 nm festgesetzt.

Zur Ermittlung der freien Entfaltungsenergie wurde von einem Zwei-Stufen-Mechanismus bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung ausgegangen (Bernhagen,

1994a). Im linearen Bereich der Entfaltungskurven kann dann für die freie Entfaltungsenergie die Gleichung

$$\Delta G = \Delta G_0 - m \cdot [\text{GdnHCL}] \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} \Delta G: \text{freie Entfaltungsenergie} \\ \Delta G_0: \text{freie Entfaltungsenergie in Puffer} \\ m: \text{Steigung} \\ [\text{GdnHCL}]: \text{GdnHCl-Konzentration} \end{array}$$

angenommen werden (Pace, 1986).

Die freie Entfaltungsenergie ΔG ergibt sich aus den ermittelten Werten für die Proteinentfaltung zu

$$\Delta G = -RT \ln \frac{f_u}{f_f}$$

mit R : Gaskonstante $8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$
 T : Temperatur in Kelvin
 f_u : Anteil des entfalteten Proteins
 f_f : Anteil des nicht entfalteten Proteins

2.4.16 Biochemische und biologische Charakterisierung von MIF

2.4.16.1 Oxidoreduktasetest

Die Messung der MIF-Aktivität beruht auf der Reduktion von Disulfiden durch Glutathion (GSH). MIF katalysiert diese Reduktion und besitzt damit eine GSH-Disulfid-Transhydrogenase-Aktivität. Bei diesem Test handelt es sich um den für Glutaredoxin etablierten HED-Transhydrogenasetest (Holmgren, 1979a). Die zugesetzte Glutathion-Reduktase reduziert in einer gekoppelten Reaktion das oxidierte Glutathion (GSSG) unter Verbrauch von NADPH. Die NADPH-Abnahme im Ansatz wurde bei 340 nm spektrophotometrisch mit einem DU-50 Spektrophotometer (Beckman, München) verfolgt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor der Messung 30 min auf Eis inkubiert. Die Messungen wurden gegen 100 mM Tris, pH 8.0 in der Referenzküvette abgeglichen. Unmittelbar vor Durchführung der Messungen wurde die Stammlösung angesetzt. In den beiden Messküvetten wurden 500 μl der Stammlösung und 30 μl HED (14 mM) gut durchmischt und die Absorptionsänderung je Minute ($\Delta A_{340}/\text{min}$) erfasst. Sobald die Absorptionsänderung je Minute auf Werte kleiner als 0.02 OD-Einheiten/min sank und konstant blieb, wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 μg renaturiertem MIF oder der MIF-Mutanten in 20 mM Natrium-

phosphatpuffer, pH 7.2 in die Messküvette bzw. das gleiche Volumen 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 in die Kontrollmessküvette gestartet. Die Endkonzentration von MIF oder der MIF-Mutanten in der Probe betrug 2 μ M. Über ein Messprogramm wurden die Küvetten alle 30 sec durchgemessen und die Absorptionsabnahme der Messküvetten graphisch dargestellt. Der Bereich linearer Absorptionsabnahme (*steady state*) begann 1-5 min nach Zugabe des Enzyms und wurde der Berechnung der Absorptionsänderungen von Kontrolle und MIF zugrunde gelegt.

2.4.16.2 Insulinassay

Die enzymatische Redoxaktivität von MIF und den Mutanten wurde auch anhand ihrer Fähigkeit Insulin zu reduzieren bestimmt. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen wie von Holmgren et al. beschrieben (Holmgren, 1979c; Holmgren, 1985). Der Insulinassay beruht auf der Reduktion von Insulin und dem daraus resultierenden Ausfallen der Insulin β -Kette. Die entstehende Trübung wird photometrisch verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 178 μ l der Probe (Endkonzentration 1.8 μ M MIF) und 23 μ l reduziertem Glutathion (GSH, 200 mM) zu 700 μ l eisgekühlter Reaktionsmischung (100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) mit 1 mg/ml Insulin und 2 mM EDTA) gestartet. Der Verlauf der Reaktion wurde photometrisch bei 650 nm über einen Zeitraum von 2 h verfolgt. Die Proben wurden dabei jeweils nach 10 min vorsichtig geschüttelt. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Steigung der Reaktion unter Abzug der Steigung der Kontrollreaktion ohne MIF verwendet.

2.4.16.3 Tautomerase-Assay

Die Tautomeraseaktivität von MIF wurde mit einem für MIF etablierten Assay, der p-Hydroxyphenylpyruvat als Substrat verwendet, bestimmt (Knox, 1955; Rosengren et al., 1997).

2.4.16.4 Leishmanien-Tötungs-Test

Im *Leishmania-Killing-Test* wird die Aktivierung von Makrophagen zur Abwehr einer Infektion mit *Leishmania major* durch Zytokine untersucht.

Der Test erfolgte wie von Vieth et al. beschrieben (Vieth et al., 1994). Die verwendeten Makrophagen wurden nach Thioglycolat-Stimulation aus dem Zwerchfell von Mäusen gewonnen. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in C-

RPME-Medium 1640 (Biochrom, Berlin, ergänzt durch 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES-Puffer, 7.5 % NaHCO₃, 0.05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 µg/ml Penicillin, 160 µg/ml Gentamycin und 10 % FCS mit einem LPG-Gehalt kleiner 60 pg/ml) resuspendiert. Je 2·10⁵ Zellen wurden dann in Zellkulturkammern für 3-4 h bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch drei Waschschrirte mit Medium entfernt und die Zellen nochmals für 4 h inkubiert. Dann wurden die Makrophagen durch Zugaben von Promastigoten von *L. major* für 4 h infiziert. Das Verhältnis von Parasiten zu Makrophagenzellen betrug 8:1. Anschließend wurden die nicht phagozytierten *Leishmania* abgewaschen und die Kulturen für 48 h weiter inkubiert. Zur Auswertung im Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Kulturen mit 50 µg/ml Ethidiumbromid und 5 µg/ml Acridin-Orange in PBS für 8 min inkubiert. Nach zwei Waschschrirten wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops von Zeiss (Oberkochen). Es wurde jeweils der Anteil an infizierten Makrophagen und die Anzahl von Parasiten pro infizierter Zelle bestimmt.

2.4.16.5 Glucocorticoid-Overriding-Assay

Frisches Spenderblut wurde zur Isolierung vom PBMCs 1:1 mit PBS gemischt. Je 10 ml dieser Blut/PBS-Mischung wurden dann vorsichtig auf 5 ml Ficoll in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen überschichtet. Nach Zentrifugation (30 min, 1500 Upm) wurde der gebildete *Buffy coat* zwischen Serum und Ficoll vorsichtig herauspipettiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS die Zellen in Medium aufgenommen (RPME 1640 mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 mM Penicillin/Streptomycin)

Je 5·10⁵ dieser Zellen wurden in 0.5 ml Medium in 48-Well-Gewebekulturplatten für 12 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Zum Entfernen der nicht anhaftenden Zellen wurde dann und nach weiteren 12 Stunden das Medium ausgetauscht. Danach wurde Dexamethason (Endkonzentration 10⁻⁹ M für ruhige, ausgeglichene Spender, sonst 10⁻⁸ M) zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurde MIF zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde 1 µg/ml LPS zugegeben und für 12 h inkubiert. Nach Zentrifugation des Überstandes zur Entfernung von Zellen wurde in diesem die TNF-α-Konzentration mittels Elisa (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt.

2.4.17 Untersuchung des potenziellen Kanals im MIF-Trimer

2.4.17.1 Herstellung der Liposomen

Je 20 mg der Lipide Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und Dimyristoyl (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen) wurden in 200 µl Chloroform gelöst. Durch Abdampfen wurde das Chloroform aus der Lipidmischung entfernt. Zur Liposomenbildung wurde die Lipidmischung mit Puffer, der 6-Carboxyfluorescein in hoher Konzentration enthielt (20 mM Natriumphosphatpuffer mit 50 mM Carboxyfluorescein, pH 7.2), rehydriert, für 10 min durch vortexen gemischt und für 30 min bei 30°C ultrabeschallt (Bandelin Sonorex RK100H; Bandelin GmbH, Frankfurt).

Nach Dialyse für 16 h in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 in einer SpectraPor7 Dialysemembran (MWCO 8000 Da; Roth, Karlsruhe) bei 4°C wurden die Liposomen durch Gelfiltration (Pharmacia Sephadex G-25M; Pharmacia-Amersham Biotech, Freiburg) von nicht eingeschlossenem Carboxyfluorescein und von nicht eingebauten Lipiden getrennt. 500 µl Fraktionen wurden aufgefangen und die Vesikel enthaltenden Fraktionen 3-5 wurden im Weiteren verwendet.

2.4.17.2 Messung der Carboxyfluorescein-Freisetzung aus Liposomen

200 µl der Liposomenfraktion wurden in 2 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 in der Messküvette verdünnt. Nach einer Vorlaufzeit von 1 min wurden MIF (rekombinantes huMIF) bzw. Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, San Francisco, CA) zugegeben (Endkonzentration 40 µg/ml). Die Freisetzung des Carboxyfluoresceins aus den Liposomen wurde durch Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm verfolgt. Nach der Messung wurde Triton X-100 (0.5% v/v Endkonzentration) zugesetzt, um die vollständige Freisetzung des Carboxyfluoresceins zu verursachen.

2.4.18 Strukturvergleiche und Modelling

Die für die Strukturvergleiche verwendeten Computerprogramme sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Folgende Programme wurden eingesetzt:

- WhatIf nach Vriend (1990)
- MolMol nach Koradi et al. (1996)

- MOLSCRIPT nach Kraulis (1991)
- Raster3D nach Merritt et al. (1997)

2.4.19 Kultivierung und Ernte eukaryontischer Zellen

293T-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 5% hitzeinaktiviertem FCS bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Zum Ernten der Zellen wurden diese für 5 min mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem Medium behandelt.

2.4.20 Transienter AP-1-Reporterassay

Jeweils $2 \cdot 10^4$ 293T-Zellen wurden in 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 50 ng des Reportergenkonstrukts pTRE, 50 ng des β -Galaktosidase-Konstrukts pRSV-LacZ und 150 ng Expressionsvektor (z. B. pJab) wurden mit 1 μ l Superfect (Quiagen, Hilden) in 150 μ l serumfreiem RPMI für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 75 μ l serumhaltigem RPMI wurden die Zellen darin für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Transfektionsmediums wurden die Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium mit MIF (Konzentrationen 1 pM bis 1 μ M) über Nacht inkubiert. Eine Stimulation mit TNF (10 ng/ml) oder PMA (100 nM) erfolgte dann für 20 min. Bei der Stimulation durch UV-Bestrahlung wurden die Zellen für 20 min mit UV bestrahlt und danach für 1.5 h bei 37°C weiter inkubiert.

Nach vorsichtigem Absaugen wurden die Zellen durch Zugabe von jeweils 100 μ l Lysispuffer (*Luziferase Assay System*, Promega, Mannheim) lysiert. Die Expression der AP-1-abhängigen Luziferase wurde in 30 μ l des Zelllysats unter Zugabe von 50 μ l Luziferase-Assay-Substrat luminometrisch (Lucy2, Anthos, Salzburg/Österreich) bestimmt. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression wurden zu 70 μ l Zelllysat 50 μ l β -Galaktosidase-Substrat gegeben und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Davon wurden 70 μ l in einer neuen Messplatte nach Zugabe von 100 μ l Accelerator II luminometrisch bestimmt. Zur Normierung wurden die Luziferase-Messwerte durch die β -Galaktosidase-Messwerte geteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des C-Terminus von MIF

3.1.1 Design der C-terminalen Mutanten

Die genaue Struktur des C-terminalen Endes von MIF war auch nach den erfolgten Röntgenstruktur- und NMR-Analysen nicht eindeutig bzw. widersprüchlich definiert. Bei Ratten-MIF konnte der C-Terminus strukturell nicht eingeordnet werden (Suzuki et al., 1996b), während bei humanem MIF die Existenz von keinem, einem oder zwei kurzen C-terminalen β -Strängen aus den Strukturuntersuchungen abgeleitet wurde (Kato et al., 1996; Mühlhahn et al., 1996; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996a). Die Strukturanalysen, welche einen C-terminalen β -Strang fanden, schlugen eine Trimer-stabilisierende Funktion der carboxyterminalen Aminosäuren durch Interaktion mit den Aminosäuren des benachbarten Monomers vor (Kato et al., 1996; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996a).

Zur Aufklärung der genauen Struktur des C-Terminus wurden vier C-terminale Deletionsmutanten erzeugt (Abb. 3). In MIF(1-109) mit 5 deletierten Aminosäuren sollte der potenzielle β_7 -Strang deletiert sein. In MIF(1-104) sind zehn C-terminale Aminosäuren deletiert, was zur Deletion der putativen β -Stränge 6 und 7 führen sollte. In MIF(1-99) sind zusätzlich noch weitere Aminosäuren des folgenden β -Strangs deletiert. In MIF(1-92) ist dieser vollständig deletiert.

3.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung der C-terminalen Mutanten

Die Klonierung der Deletionsmutanten erfolgte mittels PCR. Als Template wurde das Plasmid pMIF, ein pET11b-Konstrukt verwendet, das die MIF-Sequenz aus humanen Jurkat-H33HJ-JA1-Zellen enthält (Bernhagen et al., 1993). Zur Amplifizierung einer C-terminal um 5 Aminosäuren verkürzten MIF-Mutante bei gleichzeitiger Einführung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden die Primer huMIFN-1 5'-GCT AGC GCA TAT GCC GAT GTT CAT CGT AAA CAC-3' und huMIFC-1 5'-CGG GAT CTT TAG TTC CAG CCC ACA TTG GCC G-3' verwendet. Zur Amplifizierung einer C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzten MIF-Mutante wurden die Primer huMIFN-1 und huMIFC-2 5'-CGG GAT CCT TAG GCC GCG TTC ATG TCG TAA TAG-3' verwendet, für MIF(1-99) huMIFN-1 und 5'-CGG GAT CCT TAG TAA TAG TTG ATG TAG ACC CTG-3' und für MIF(1-92) huMIFN-1 und 5'-CGG GAT CCT TAG TCC GGG CTG ATG CGC AGG CGC-3'.

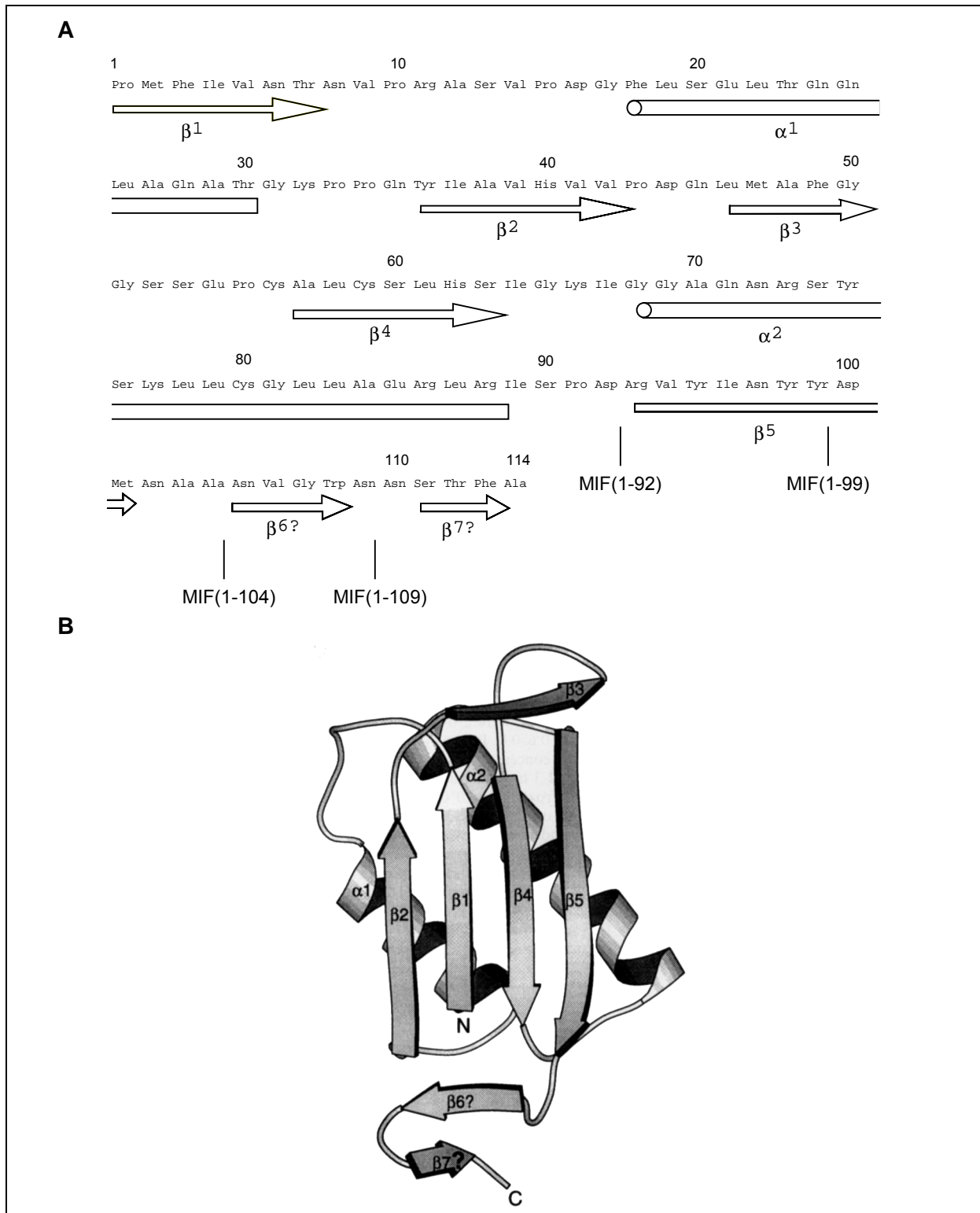


Abb. 3. Aminosäuresequenz von huMIF und die Zuordnung von Sekundärstrukturelementen. **A** Primär- und Sekundärstruktur von MIF. Die C-terminalen Enden der Deletionsmutanten sind jeweils durch senkrechte Striche markiert. Zylinder stehen für α -Helices, Pfeile für β -Stränge. **B** Sekundärstruktur von MIF. Das N- und das C-terminale Ende sind markiert. Das N-terminale Methionin von MIF wird sowohl in Eukaryonten wie auch nach Expression in *E. coli* posttranslational prozessiert, so dass ein 114-Aminosäuren langes Polypeptid resultiert (Bernhagen et al., 1994c). In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Nummerierung der Aminosäuren in MIF mit dem auf dieses Methionin folgenden Prolin begonnen.

Das jeweilige PCR-Produkt wurde nach elektrophoretischer Aufreinigung mit *NdeI* und *BamHI* behandelt und in ebenfalls mit *NdeI* und *BamHI* behandelte pET11b-DNA ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α transformiert. Die Richtigkeit der klonierten Sequenzen wurde anschließend durch bidirektionale Sequenzierung bestätigt.

Die Expression erfolgte in dem für wtMIF etablierten pET11b/BL21(DE3)-Expressionssystem. Die Aufreinigung der mutierten MIF-Proteine (1-104) und (1-109) wurde ebenfalls nach einem Protokoll durchgeführt, welches dem entsprechenden wtMIF-Protokoll weitgehend entspricht. Abweichend hiervon erfolgte der Aufschluss der Zellen in einer *French-Press* (SLM Instruments, Urbana/USA) und es wurde eine Poros-HQ-Anionenaustauschersäule (Roche, Mannheim) zur Auftrennung in der FPLC verwendet. Die weitere Aufreinigung unterschied sich von der des Wildtyps in zwei Punkten. Die Bakterienpellets wurden in einer niedrigeren Salzkonzentration aufgenommen (30 mM Tris, 100 mM NaCl anstatt 50 mM Tris, 150 mM NaCl) und dieser Puffer wurde auch zur Elution auf der Anionenaustauschersäule verwendet. Hierdurch ging weniger Protein durch unspezifische Aggregation verloren.

Die Mutanten MIF(1-92) und MIF(1-99) bildeten *Inclusion bodies* und ließen sich weder nach dem Standard-Protokoll noch nach der für die anderen C-terminalen Deletionsmutanten etablierten Variante aufreinigen.

3.1.3 LPS-Gehalt der Wildtyp- und Mutanten-MIF-Präparationen

Da es durch die Expression von MIF in *E.coli* zu einer Lipopolysaccharidverunreinigung kommen kann, wurden die MIF-Präparationen nach dem Renaturieren auf ihren LPS-Gehalt geprüft. Der LPS-Gehalt lag dabei immer unter 0.9 pg LPS/ μ g Protein.

3.1.4 Massenspektrometrische Analyse der Mutanten

Nach der Aufreinigung und Renaturierung wurden die Massen der MIF-Mutanten durch Maldi-TOF bestimmt (Tab. 3). Die ermittelten Massen lagen im erwarteten Bereich. Eine Masse der Mutanten MIF(1-99) und MIF(1-92) aus den *Inclusion Bodies* war nicht bestimmbar.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der theoretisch zu erwartenden Massen der MIF-Mutanten und die massenspektrometrisch bestimmten Massen.

	Theoretische Masse aufgrund der AS-Sequenz [Da]	Masse aus massenspektroskopischer Analyse [Da]
MIF(1-109)	11824	12823
MIF(1-104)	11253	11241

3.1.5 Strukturelle Charakterisierung der C-terminalen Mutanten

Zur vergleichenden strukturellen Charakterisierung der Deletionsmutanten wurden Circular dichroismus-Messungen eingesetzt. Far-UV-CD zeigte, dass die C-terminalen Mutanten MIF(1-104) und MIF(1-109) über eine generelle strukturelle Ähnlichkeit mit der Wildtypstruktur verfügen (Abb. 4). Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Deletionen die allgemeine Strukturintegrität von MIF nicht zerstört wurde. Deshalb wurden die Auswirkungen der Deletionen in detaillierten Untersuchungen von Struktur und Aktivität ermittelt.

Obwohl die Spektren der Mutanten mit dem Spektrum des Wildtyps nahezu identisch waren, zeigte eine genauere Analyse Unterschiede. Die Spektren der Mutanten wiesen einen kleinen Shift der Minima zu niedrigeren Wellenlängen auf, was einem leicht erhöhten *Random coil*-Strukturanteil entspricht.

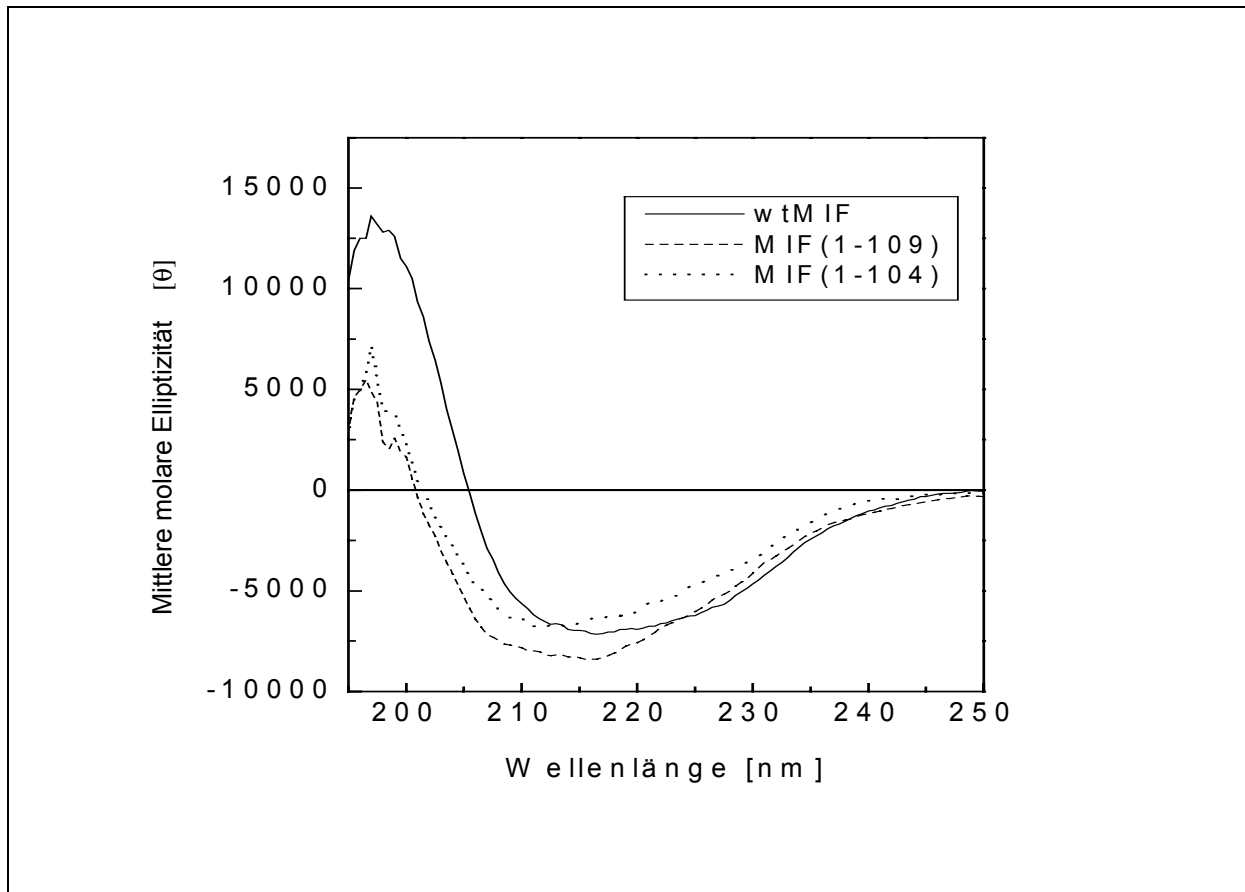


Abb. 4. CD-Spektropolarimetrie von wtMIF und den carboxyterminal deletierten Mutanten MIF(1-109) und MIF(1-104). Die CD-Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 μM in 20 mM Natriumphosphat, pH 7.2 aufgenommen.

Eine Quantifizierung der Strukturelemente durch Anwendung von rechnerbasierter Dekonvolution der Spektren nach verschiedensten Methoden (LINCMB in Verbindung mit den Referenzdatensätzen von Perczel et al. (1992b), Yang et al. (1974) und Brahms und Brahms (1980), CONTIN (Provencher und Glöckner, 1981; Venyaminov et al., 1993) sowie SELCON (Sreerama und Woody, 1993; Sreerama und Woody, 1994)) bestätigte zum einen die Ähnlichkeit der Mutanten zu wtMIF. Andererseits wurde eine Vielzahl kleiner, aber signifikanter Unterschiede beobachtet (Tab. 4).

Tabelle 4: Quantitative Analyse der Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Mutanten im Vergleich zu wtMIF.

Methode	Sekundärstruktur-Anteile (%)						
	α -Helix	β -Faltblatt	Paralleles β -Faltblatt	Antiparall. β -Faltblatt	Parall. β -Falt./ β -Turn	β -Turn	<i>Random coil</i>
1							
wtMIF	13	NA	NA	45	22	NA	21
MIF(1-109)	7	NA	NA	27	27	NA	36
MIF(1-104)	11	NA	NA	26	30	NA	34
2							
wtMIF	25	30	NA	NA	NA	33	12
MIF(1-109)	19	28	NA	NA	NA	23	30
MIF(1-104)	22	26	NA	NA	NA	24	28
3							
wtMIF	11	50	NA	NA	NA	15	24
MIF(1-109)	18	34	NA	NA	NA	11	38
MIF(1-104)	10	43	NA	NA	NA	9	38
4							
wtMIF	24	NA	10	20	NA	22	25
MIF(1-109)	27	NA	6	20	NA	28	24
MIF(1-104)	30	NA	6	16	NA	26	22
5							
wtMIF	21	34	NA	NA	NA	21	24
MIF(1-109)	25	26	NA	NA	NA	12	38
MIF(1-104)	28	28	NA	NA	NA	14	31

1, 2, 3: Rechnung durch das LINCMB-Programm in Verbindung mit den Referenzdatensätzen nach Perczel et al. (1992b), Yang et al. (1974) und Brahms & Brahms (1980); **4, 5:** Analyse durch die CONTIN (Provencher und Glöckner, 1981; Venyaminov et al., 1993) und SELCON (Sreerama und Woody, 1993; Sreerama und Woody, 1994) Computerprogramme. NA, nicht anwendbar.

Die Deletion der Aminosäuren 110-114 in MIF(1-109) führte zu einem signifikanten Anstieg an *Random coil*-Struktur bei einem gleichzeitigen Absinken des β -Faltblattanteils. Die weitere Deletion der Reste 105-109 führte dagegen zu keinem weiteren Anstieg an *Random coil*. Auch war die Deletion dieser Aminosäuren nicht mit einem weiteren Sinken an β -Faltblattstruktur verbunden.

Aus der Analyse nach LINCMB/Perczel et al. konnte geschlossen werden, dass sich die Reste 111-115 in einer antiparallelen β -Faltblatt-Struktur befinden. Die β -Turn-Strukturanteile verhielten sich weitgehend analog zu den gemessenen β -Faltblattwerten. Signifikante Veränderungen der α -Helixanteile wurden nicht beobachtet.

Der vermutete stabilisierende Effekt des C-Terminus wurde durch GdnHCl-induzierte Entfaltungsmessungen untersucht (Abb. 5). Es bestätigte sich, dass die Mutanten eine leicht, aber signifikant erniedrigte thermodynamische Stabilität aufwiesen. Während der Mittelpunkt der Entfaltung für wtMIF bei 1.8 M Gdn lag, wurden für MIF(1-109) 1.6 M und für MIF(1-104) 1.5 M gemessen (Abb. 6 A).

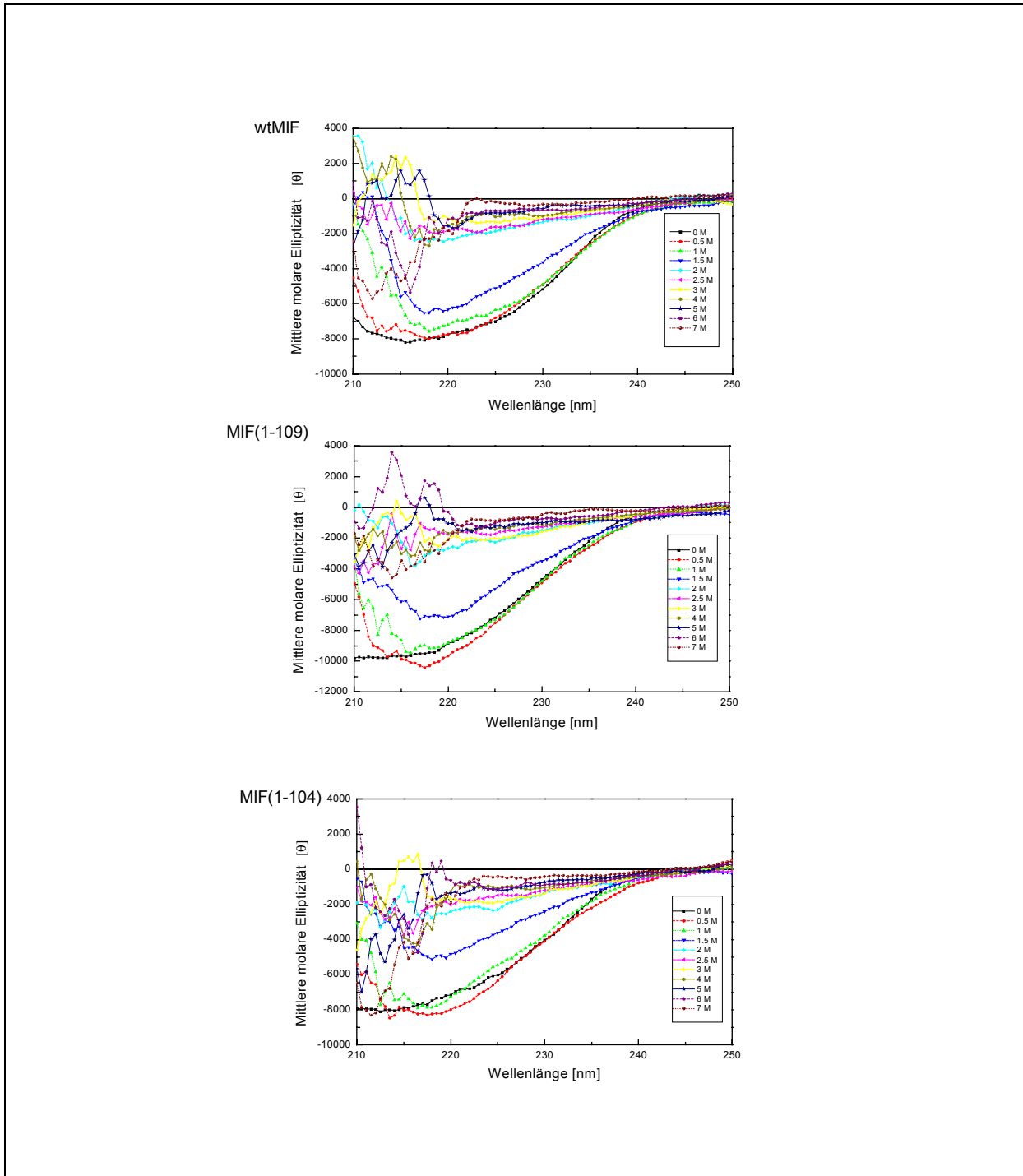


Abb. 5. Guanidinium-induzierte Denaturierung von wtMIF, MIF(1-109), MIF(1-104) verfolgt mittels CD-Spektroskopie. Die CD-Spektren wurden mit GdnHCl-Konzentrationen im Bereich von 0–7 M aufgenommen.

Zur Ermittlung der freien Entfaltungsentnergie wurde von einem Zwei-Stufen-Mechanismus bei der Entfaltung ausgegangen. In Abb. 6 B sind die freien Entfaltungsentnergien von MIF, MIF(1-109) und MIF(1-104) über die GdnHCl-Konzentration aufgetragen. Die $\Delta G_d^{H_2O}$ -Werte für die freie Entfaltungsentnergie in Abwesenheit von Denaturand für die C-terminalen Mutanten waren geringer als die

von wtMIF. Sie lagen für wtMIF bei $12.51 \text{ kJ mol}^{-1}$, für MIF(1-109) bei 11.9 kJ mol^{-1} und für MIF(1-104) bei 8.55 kJ mol^{-1} .

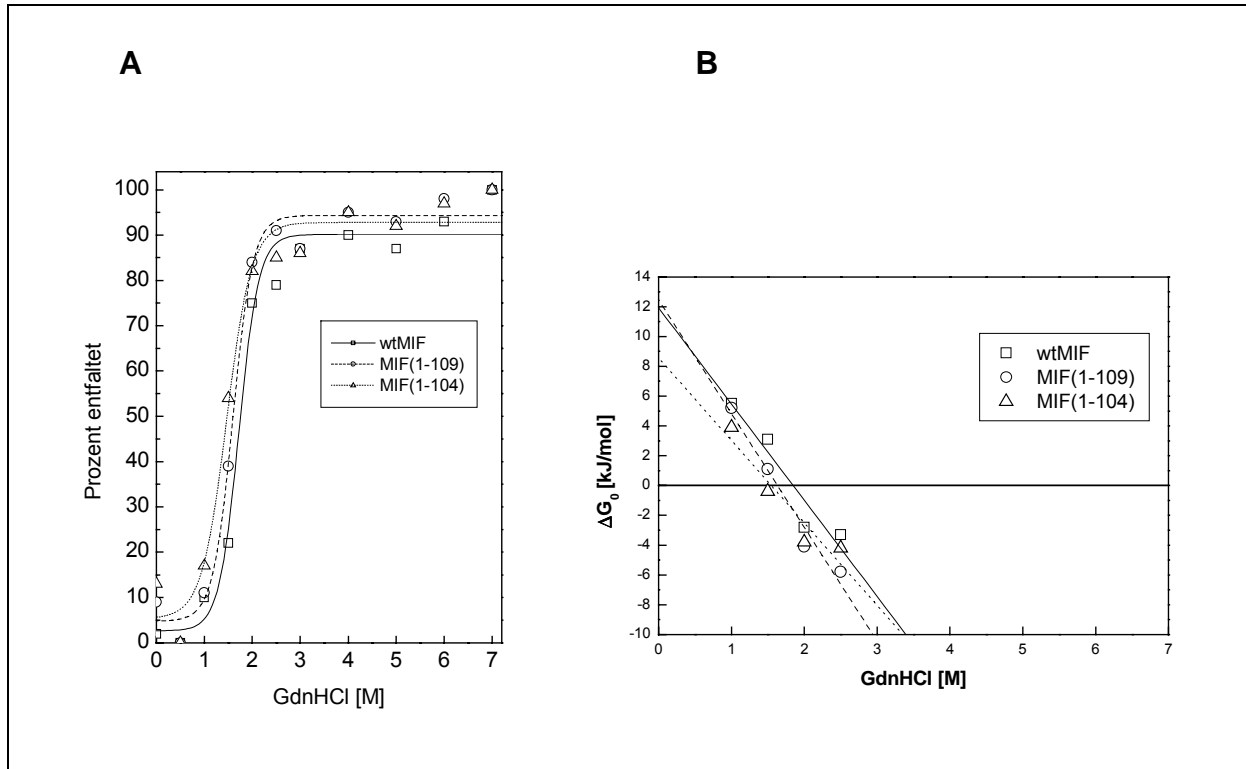


Abb. 6. GdnHCl-induzierte Entfaltung von wtMIF und der Mutanten MIF(1-104) und MIF(1-109). **A** Die Entfaltungskurven sind als Prozent entfaltetes Protein gegen die GdnHCl-Konzentration aufgetragen. **B** Freie Entfaltungsenergie über die GdnHCl-Konzentration ermittelt nach Pace (1986).

3.1.6 Enzymatische Aktivität

Zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der enzymatischen Aktivitäten von MIF wurden nicht nur die C-terminalen Deletionsmutanten, sondern auch noch einige andere verfügbare Mutanten hinsichtlich ihrer Aktivität charakterisiert. Zum einen wurden zwei N-terminale Deletionsmutanten MIF(2-114) und MIF(4-114), bei denen eine bzw. drei Aminosäuren deletiert wurden, untersucht. Zum anderen wurde die Austauschmutante P1AMIF, bei der das N-terminale Prolin gegen Alanin ausgetauscht ist, untersucht.

Es wurden zwei Assays, die auf der Redoxaktivität von MIF beruhen, und ein Assay, der die Phenylpyruvatautomerase-Aktivität von MIF benutzt, verwendet (Abb. 7).

Im Insulinassay betrug die Aktivität von MIF(1-109) $88 \% \pm 13$ und von MIF(1-104) $93 \% \pm 17$ der Aktivität von Wildtyp-MIF. Die Mutante P1AMIF zeigte eine Aktivität von

90 % \pm 19, MIF(2-114) 84 % \pm 20 und MIF(4-114) 95 % \pm 6. Alle Mutanten waren in diesem Assay in ihrer Aktivität also nur minimal reduziert.

Im HED-Redoxetest betrug die Aktivität von MIF(1-109) 50 % \pm 6, von MIF(1-104) 38 % \pm 4, von P1AMIF 33 % \pm 7 und von MIF(2-114) 40 % \pm 11 der Aktivität von Wildtyp-MIF. Diese Mutanten weisen damit eine reduzierte, aber immer noch signifikant vorhandene Aktivität auf. Die Mutante MIF(4-114) ist jedoch mit einer Aktivität von 1 % \pm 4 vollständig inaktiv.

Im Tautomerasetest zeigte MIF(1-109) eine Aktivität, die 0.3 % der Wildtypaktivität entsprach, MIF(1-104) eine Aktivität von 0.1 %, P1AMIF 2 % und MIF(2-114) 0.1 % der Wildtyp-Aktivität.

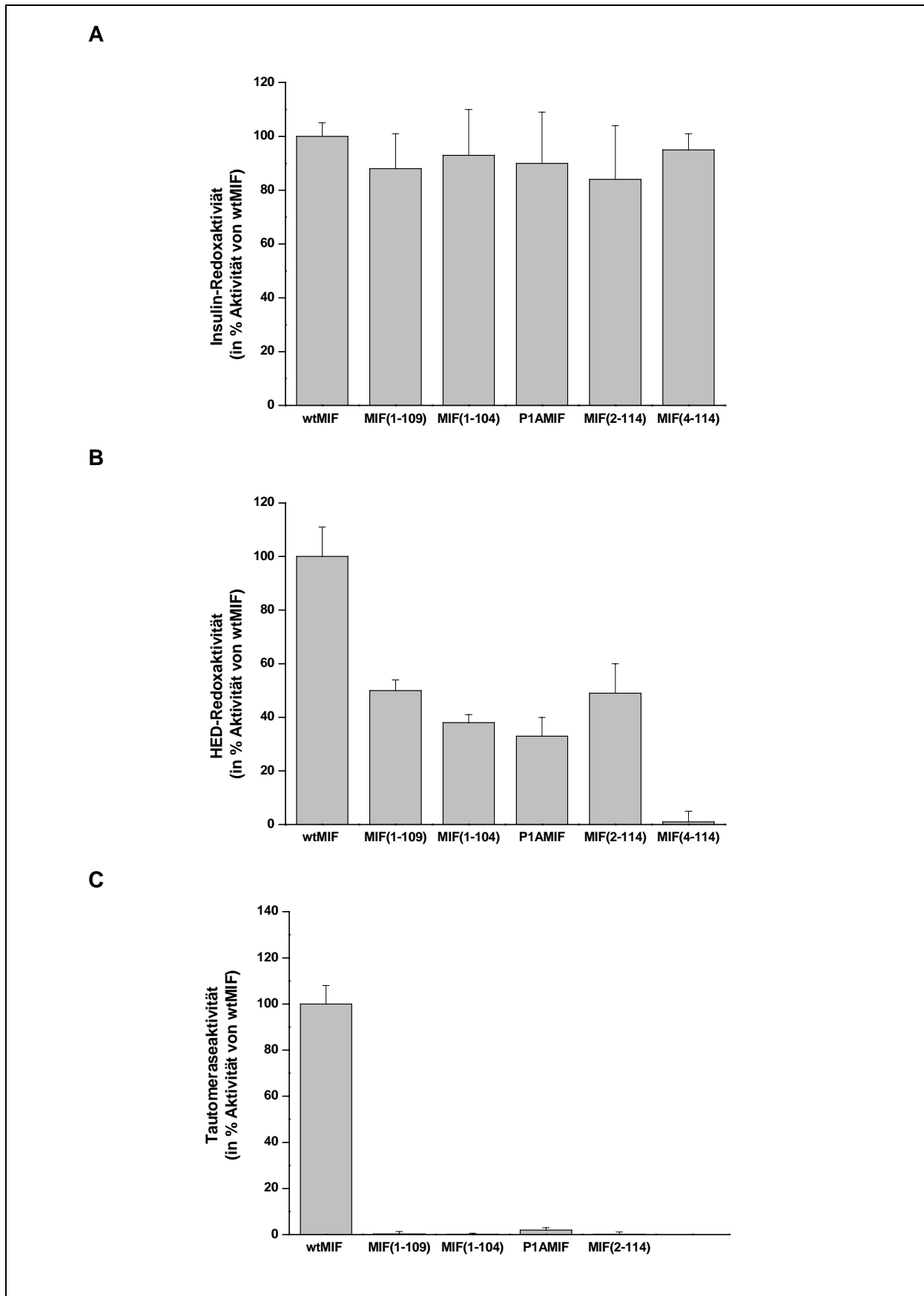


Abb. 7. Enzymatische Aktivitäten der C- und N-terminalen Mutanten. A Insulintest nach Holmgren (1979c) **B** HED-Oxidoreduktasetest nach Kleemann et al. (1998b) **C** Tautomerasetest nach Rosengren et al. (1997).

3.1.7 Biologische Aktivität der C-terminalen Mutanten

Die biologische Aktivität der C-terminalen Deletionsmutanten wurde in zwei Assays ermittelt. Im *Leishmania-killing*-Assay waren die Deletionsmutanten nicht in der Lage, die Makrophagen zur *Leishmania*-Bekämpfung zu aktivieren. Der Anteil an infizierten Makrophagen betrug bei wtMIF 55 % \pm 6, bei MIF(1-109) 82 % \pm 6 und bei MIF(1-104) 80 % \pm 6 (Abb. 8). Bei dem als Positivkontrolle eingesetzten IFN- γ waren 45 % \pm 2 der Makrophagen infiziert. Die Aktivität im Glucocorticoid-*Overriding*-Assay betrug bei MIF(1-109) 28 % \pm 3 und bei MIF(1-104) 33 % \pm 6 der Wildtypaktivität. Die beiden Mutanten wiesen also in beiden Assay eine fehlende bzw. stark verringerte Aktivität auf.

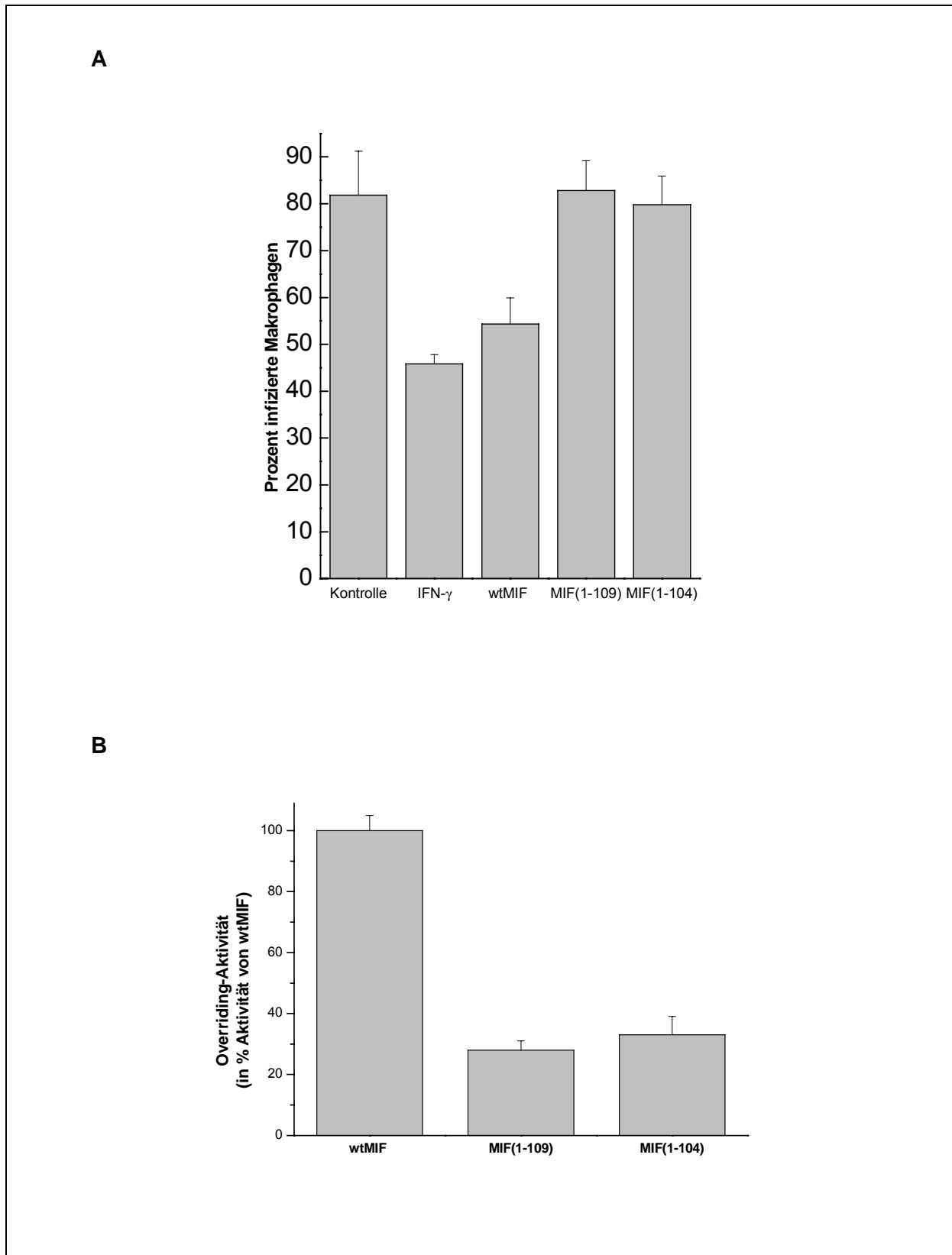


Abb. 8. Biologische Aktivität der C-terminalen Deletionsmutanten. A Leishmanientest nach Jüttner et al. (Jüttner et al., 1998). **B** Der Glucocorticoid-*Overriding*-Assay wurde wie in dieser Arbeit etabliert durchgeführt (Abschnitt 3.4.1).

3.2 Die kanalbildende Aktivität von MIF

Eine sofort ins Auge fallende Eigenschaft des MIF-Trimers ist ein Kanal, welcher durch die Mitte des Proteins entlang der 3-fach-Symmetrieachse verläuft (Abb. 9). Dieser Kanal besitzt einen Durchmesser von 5 - 15 Å. Entlang der Innenseite des Kanals finden sich vor allem hydrophobe Aminosäuren. Eine Kartierung der elektrostatischen Potenziale entlang des Kanals zeigte, dass der Kanal ein überwiegend positives Potenzial aufweist. Deshalb wurde spekuliert, dass der Kanal für negativ geladene Moleküle passierbar sein müsste und eine funktionelle Rolle im unbekanntem Wirkmechanismus von MIF haben könnte.

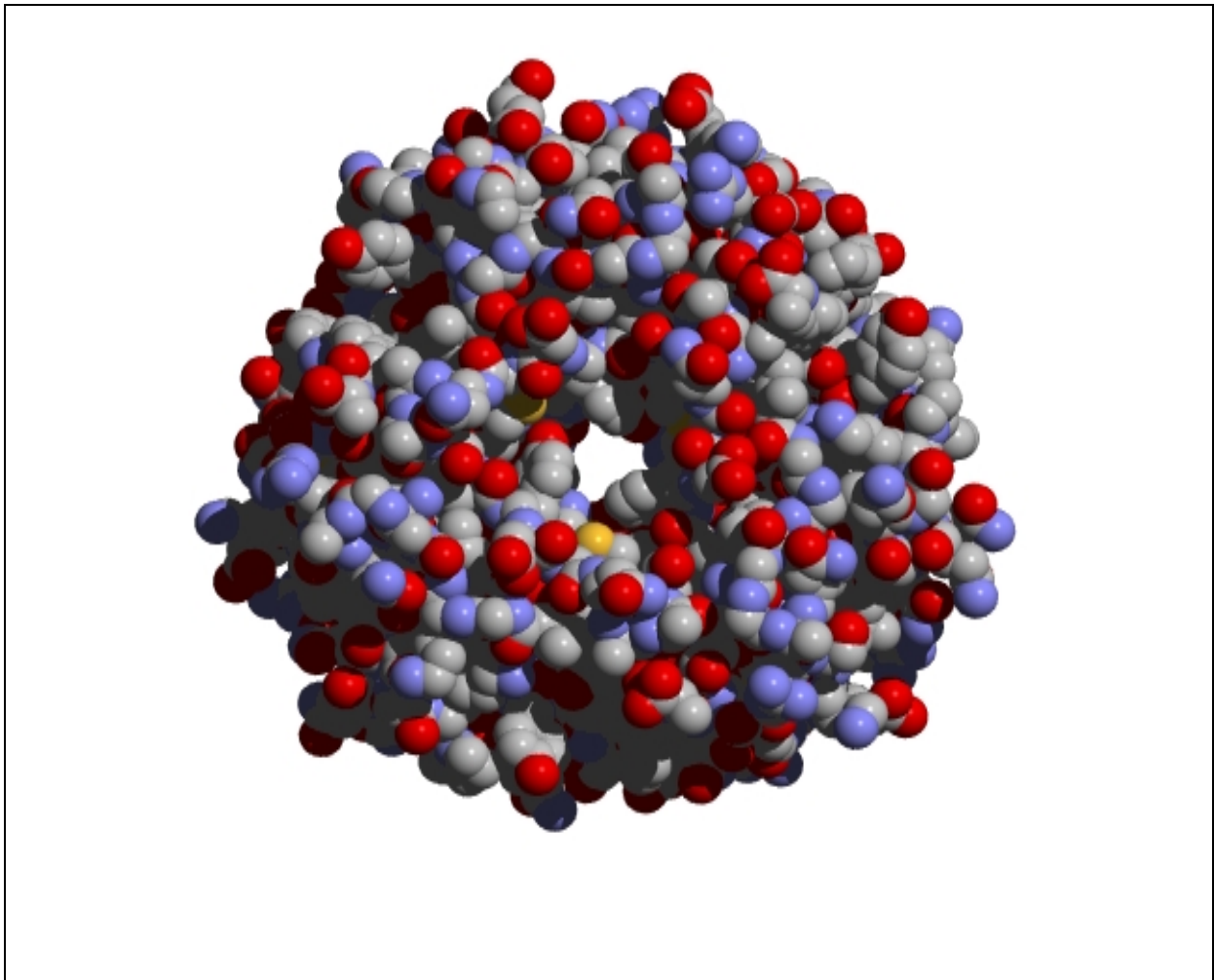


Abb. 9. Solvenzzugänglicher Kanal im MIF-Trimer. Aufsicht auf das CPK-Modell des Trimers entlang der 3-fach-Symmetrieachse. Die Atome sind nach Atomtyp gefärbt: C - grau, O - rot, N - blau, S - gelb

Um die Durchgängigkeit des Kanals zu untersuchen, wurde MIF in Liposomen, welche einen fluoreszierenden Farbstoff enthielten, eingebaut und der Transport des

Farbstoffs aus den Liposomen heraus bestimmt (Abb. 10). Als Positivkontrolle diente der Apoptoseinhibitor Bcl-2, von dem bekannt ist, dass er farbstoffgängige Kanäle bildet (Schendel et al., 1997). Für den verwendeten Farbstoff, 6-Carboxyfluorescein, liegen Berichte über eine Durchgängigkeit durch Poren bis zu einem minimalen Durchmesser von 10 Å vor (Veenstra et al., 1994; Ikigai et al., 1996).

Während für Bcl-2 die erwartete Freisetzung von 6-Carboxyfluorescein aus Liposomen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich für MIF keine kanalbildende Aktivität. Um den Einfluss des verwendeten Puffers auf die Stabilität der Liposomen und die Aktivität von MIF zu untersuchen, wurden alle Versuche außer in Natriumphosphatpuffer auch noch in 100 mM NaCl/20 mM Hepes-Tris, pH 7.4, 20 mM Natriumcitrat, pH 5.0 und PBS, pH 7.5 durchgeführt. Außer einer destabilisierenden Wirkung des Natriumcitratpuffers auf die Liposomen hatte die Verwendung dieser Puffer jedoch keine Auswirkungen auf die kanalbildende Aktivität von MIF.

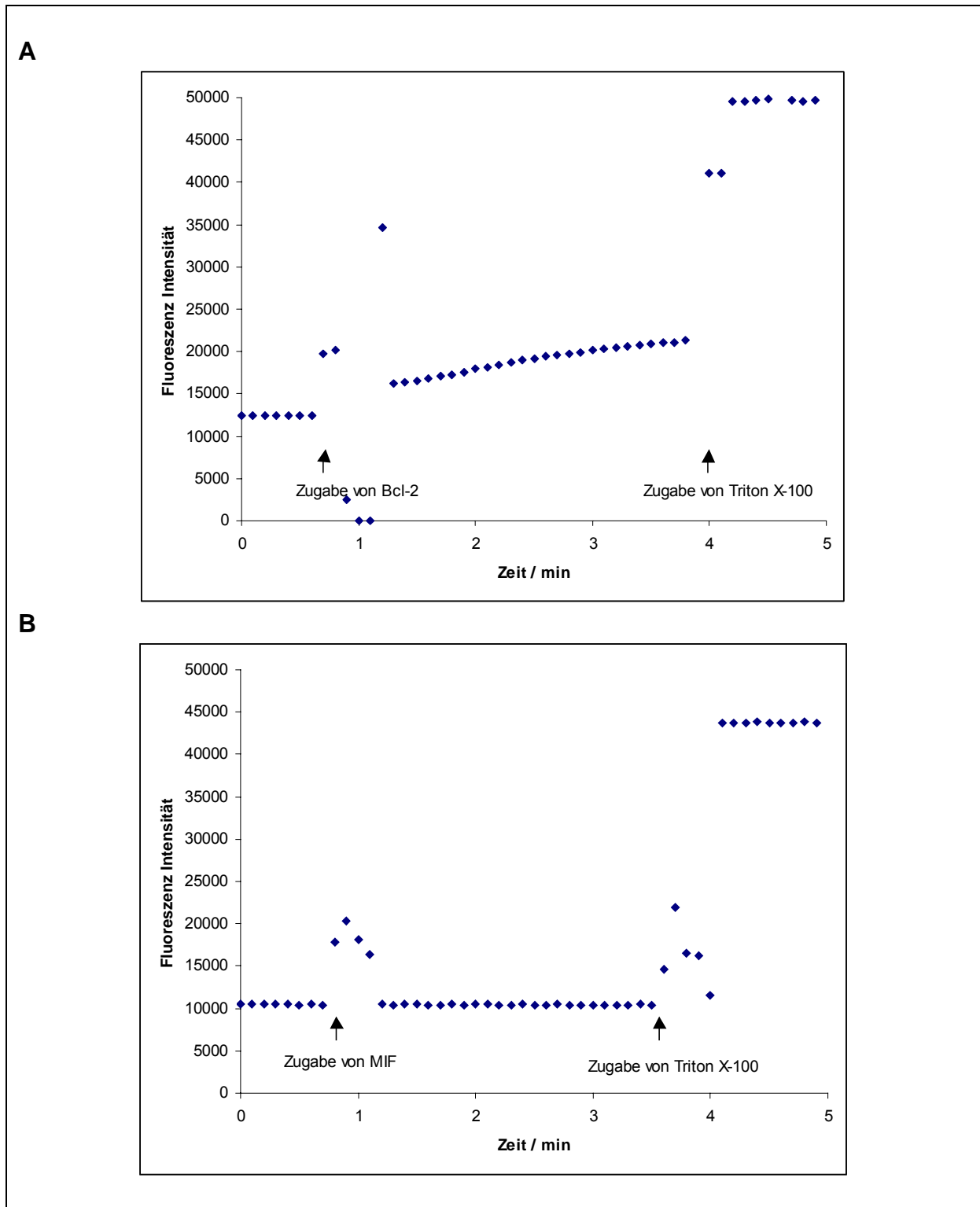


Abb. 10. Liposomen-Farbstofftransport-Assay zur Untersuchung der potenziellen Funktionalität des MIF-Kanals. Die Fluoreszenzintensität (relative Einheiten) des transportierten Carboxyfluoresceins ist gegen die Zeit aufgetragen. Nach einer Vorlaufzeit von ungefähr 1 min wurde die Probe zur Liposomenlösung zugegeben und die Fluoreszenz verfolgt. Dann wurde Triton X-100 zur Zerstörung der Liposomen zugegeben. **A** Effekt des Kanalbildners Bcl-2. **B** Effekt von huMIF. Beide Proteine wurden bei einer Endkonzentration von 40 µg/ml gemessen.

3.3 Der Oligomerisierungstatus von MIF

3.3.1 *Crosslinking*-Analysen von MIF und der Mutanten

Über die Oligomerisierung von MIF liegen sich widersprechende Untersuchungen vor, die je nach verwendeter Technik unterschiedliche Resultate erbrachten. Um die Frage der Oligomerisierung der MIF-Untereinheiten zu untersuchen, wurden *Crosslinking*-Studien von wtMIF und den Mutanten aus physiologischen Lösungen durchgeführt. Insbesondere die C-terminalen Deletionsmutanten waren hierbei von Interesse, da nach einigen Strukturanalysen der C-Terminus durch Interaktion mit dem benachbarten MIF-Molekül im Trimer zur Stabilisierung desselben beiträgt.

Zunächst wurde der Oligomerisierungsgrad durch native Gelfiltration untersucht. Unter diesen nicht-denaturierenden Bedingungen wurde MIF als Dimer eluiert (apparentes Molekulargewicht: ~27000 Da; nicht gezeigt). Acetonitril-denaturiertes MIF chromatographierte unter den nicht-denaturierenden Elutionsbedingungen als Monomer ($M_r = \sim 13000$ Da). Dieses Ergebnis bestätigt einerseits Berichte anderer (Zeng et al., 1993; Nishihira et al., 1995), andererseits können bei Gelfiltration unter nativen Bedingungen Wechselwirkungen des Proteins mit der Gelmatrix auftreten, die die Molekülassoziation im potenziellen Oligomer beeinflussen.

Deshalb wurden MIF-Präparationen durch *Crosslinking* kovalent stabilisiert und im Anschluss unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Humanes und murines Wildtyp-MIF wurden bei einer Konzentration von 1 μM mit Glutardialdehyd behandelt und die quervernetzten Produkte durch SDS-PAGE/Silberfärbungsanalyse untersucht (Abb. 11). TNF- α , welches bekanntermaßen als Trimer vorliegt (Smith und Baglioni, 1987), wurde als Vergleich und zur Methodvalidierung der *Crosslinking*-Analyse unterworfen.

Nicht-quervernetztes Protein migrierte sowohl im Falle von MIF als auch bei TNF- α ausschließlich als Monomer. Quervernetztes TNF migrierte wie erwartet ausschließlich als Trimer, während MIF nach der Quervernetzung ein heterogenes Migrationsmuster aufwies (Abb. 11). Sowohl monomeres als auch dimeres und trimeres Produkt wurden beobachtet. Eine densitometrische Auswertung der Mengenverhältnisse zeigte, dass bei der Quervernetzung von humanem MIF mit Glutardialdehyd 44 % Monomer, 33 % Dimer und 23 % Trimer vorliegen.

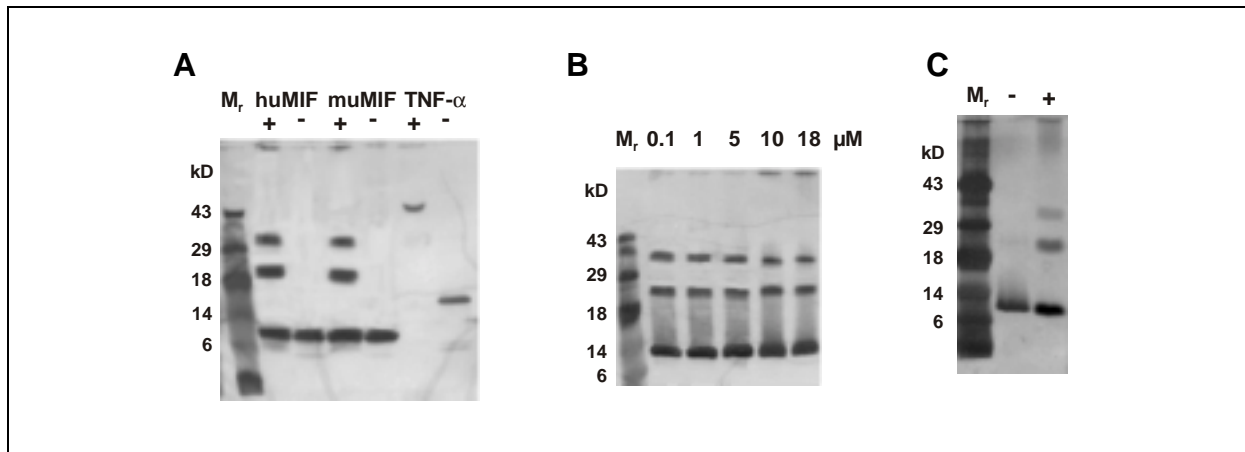


Abb. 11. SDS-PAGE und Silberfärbung von wtMIF nach Quervernetzung. **A** Vergleich von humanem wtMIF (huMIF) und murinem wtMIF (muMIF) mit TNF- α . Die Quervernetzung durch Glutaraldehyd wurde bei einer Proteinkonzentration von 1 μ M durchgeführt. Kontrollreaktionen ohne *Crosslinking* wurden zum Vergleich durchgeführt. **B** Abhängigkeit der Oligomerisierung von der eingesetzten Proteinkonzentration. HuMIF wurde bei den angezeigten Konzentrationen untersucht. **C** *Crosslinking* mit dem Photo-*Crosslinker* BASED. HuMIF wurde bei einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt. + bedeutet Probe mit *Crosslinker* behandelt; - bedeutet Kontrollinkubation ohne *Crosslinker*.

Um den Einfluss der eingesetzten Proteinkonzentration auf die Oligomerisierung zu untersuchen, wurde die Oligomerisierung von MIF in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt. Hierzu wurde die Quervernetzung über einen möglichst weiten Bereich an MIF-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 11 B). Die obere Konzentrationsgrenze ergab sich aus der maximalen Löslichkeit von MIF, während die untere Grenze durch die, bei sehr kleinen Konzentrationen erforderlichen, sehr großen Reaktionsvolumen gesetzt wurde. In einem Bereich von 0.1 μ M bis 18 μ M wurden keine Konzentrationsabhängigkeiten festgestellt.

Da Glutaraldehyd zur Autopolymerisation neigt, kann es gelegentlich zu einer artifiziellen Untereinheitenvernetzung kommen. Deshalb wurde ein weiterer *Crosslinker*, Bis-(β -(4-azidosalicylamido)ethyl)disulfid (BASED), der Proteine durch unspezifische Photoaktivierung vernetzt, eingesetzt. Mit diesem *Crosslinker* wird eine ähnliche Oligomerenverteilung wie nach Glutaraldehydvernetzung gefunden (Abb. 11 C). Es lagen 59 % des Proteins als Monomer, 29 % als Dimer und 12 % als Trimer vor.

Versuche, MIF mit einem weiterem *Crosslinker*, der Disuccinimidylsuberinäure (DSS), welche wie Glutaraldehyd auch mit den Aminoseitengruppen der Lysin- und Arginin-Reste reagiert, zu vernetzen, waren nicht erfolgreich (nicht gezeigt). Eine Vermessung der Abstände der Aminoseitenketten zwischen allen Oligomerformen zeigte, dass die *Spacer*-Länge dieses *Crosslinkers* deutlich kürzer als die entsprechenden Abstände der Aminogruppen ist.

Die Ergebnisse des SDS-PAGE von quervernetztem MIF wurden dann durch denaturierende Gelfiltration bestätigt. Mit dieser Methode wurden 2 Fraktionen entsprechend dem monomeren und dimeren MIF identifiziert (Massen = ~12400 und 27000 Da). Trimeres MIF wurde nicht detektiert.

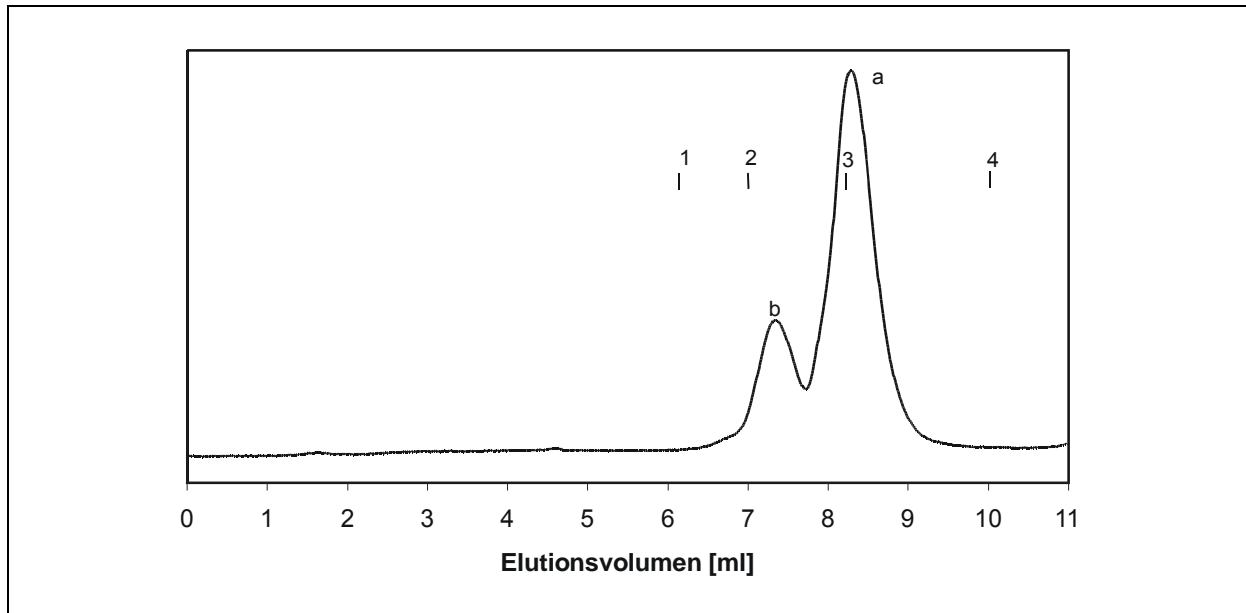


Abb. 12. Gelfiltration von *crossgelinktem* humanem MIF. Nach *Crosslinken* mit Glutaraldehyd wurde MIF unter denaturierenden Bedingungen chromatografiert. Die Elutionsvolumen der Markerproteine sind markiert (1, bovines Serum Albumin; 2, Carbonic Anhydrase; 3, Cytochrom C; 4, Aprotinin). a, Peak eluiert bei ca. 12400 Da; b, Peak bei ca. 27000 Da.

Im folgenden wurde eine *Crosslinking*-Analyse der verfügbaren MIF-Mutanten durchgeführt (Abb. 13). Bei den C-terminalen Deletionsmutanten sollte die Rolle des C-Terminus für die Stabilisierung des Trimers untersucht werden. Darüber hinaus wurden auch drei Austauschmutanten untersucht, bei denen die drei in MIF vorkommenden Cysteine durch Serine ersetzt sind. In den Mutanten C56SMIF, C59SMIF und C80SMIF sind die Cysteine 56, 59 und 80 jeweils durch Serin ersetzt.

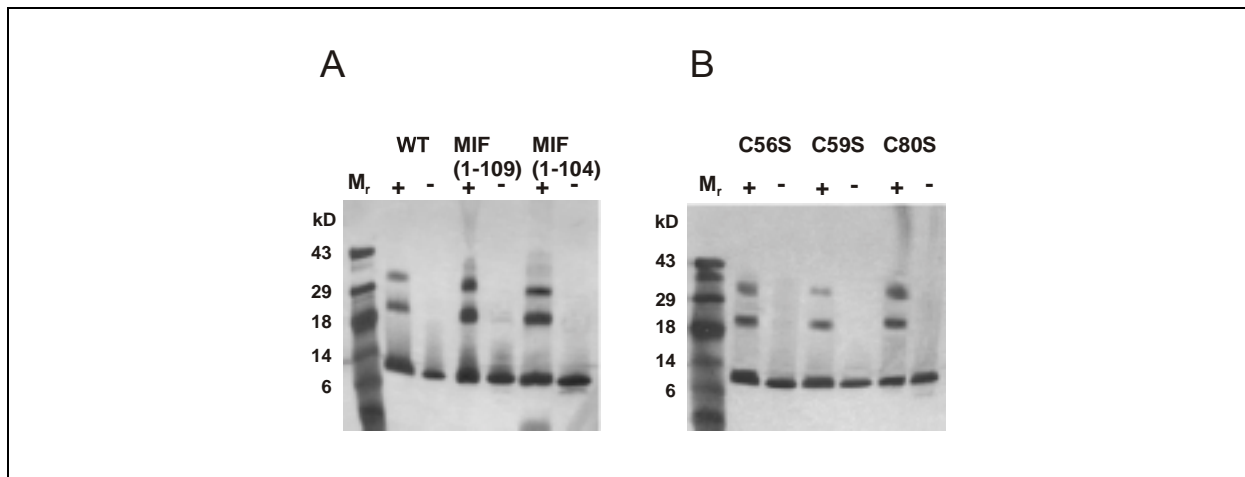


Abb. 13. Quervernetzung von wtMIF und den Mutanten. SDS-PAGE und Silberfärbung der C-terminal deletierten Mutanten und der Cysteinmutanten jeweils nach *Crosslinking* mit Glutaraldehyd. **A** Analyse der C-terminalen Mutanten. **B** Analyse der Cysteinmutanten. + bedeutet Probe mit *Crosslinker* behandelt; - bedeutet Kontrollinkubation ohne *Crosslinker*.

Die Analyse der Mutanten bestätigt die vorher erhaltenen Ergebnisse mit wtMIF. Bei den C-terminalen Mutanten MIF(1-109) und MIF(1-104) liegen keine signifikanten Veränderungen der Oligomerenverteilung vor. Der Trimeranteil ist bei diesen Mutanten sogar leicht erhöht (29 bzw. 27 %).

Bei den Cystein-Mutanten C80S und C56S liegt eine ähnliche Oligomerenverteilung wie beim Wildtyp vor. Die Mutante C59 weist dagegen nur 10 % Trimer sowie einen erniedrigten Dimeranteil von 27 % auf.

3.3.2 *Molecular Modelling* eines dimeren MIF

Aufgrund der Daten der Quervernetzungsversuche, die nicht das Trimer als dominierende Spezies in Lösung zeigen, sondern das überwiegende Vorliegen von Monomer- und Dimerformen nachweisen, wurde die Bildung eines MIF-Dimers mittels *Molecular Modelling* untersucht. Die Suche nach möglichen Kontaktstellen für die Dimerisierung ergab, dass innerhalb des zentralen β -Faltblatts zahlreiche hydrophobe Aminosäuren vorliegen (Abb. 14 A). Durch die Wechselwirkung der Aminosäuren in den zentralen β -Faltblättern könnte eine Dimerisierung erfolgen, die durch die hydrophoben Aminosäurencluster in diesem Bereich stabilisiert werden könnte (Abb. 14 B). Andere umfassende Wechselwirkungsregionen, an denen eine Dimerisierung erfolgen könnte, wurden nicht identifiziert.

Mit Hilfe des VAST-Algorithmus (Madej et al., 1995; Gibrat et al., 1996) wurde eine strukturelle Ähnlichkeit des Enzyms S-Adenosylmethioninsynthetase mit MIF gefunden. S-Adenosylmethioninsynthetase setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen, wobei jeweils zwei dieser Untereinheiten durch hydrophobe Wechselwirkungen der β -Faltblätter miteinander interagieren (Fu et al., 1996; Takusagawa et al., 1996). Obwohl die Untereinheiten der S-Adenosylmethioninsynthetase mit 383 Aminosäuren wesentlich größer als ein MIF-Monomer sind, weisen sie einen ähnlichen Aufbau aus β -Faltblättern und α -Helices auf und konnten deshalb als Modell für ein dimeres MIF verwendet werden (Abb. 14 B).

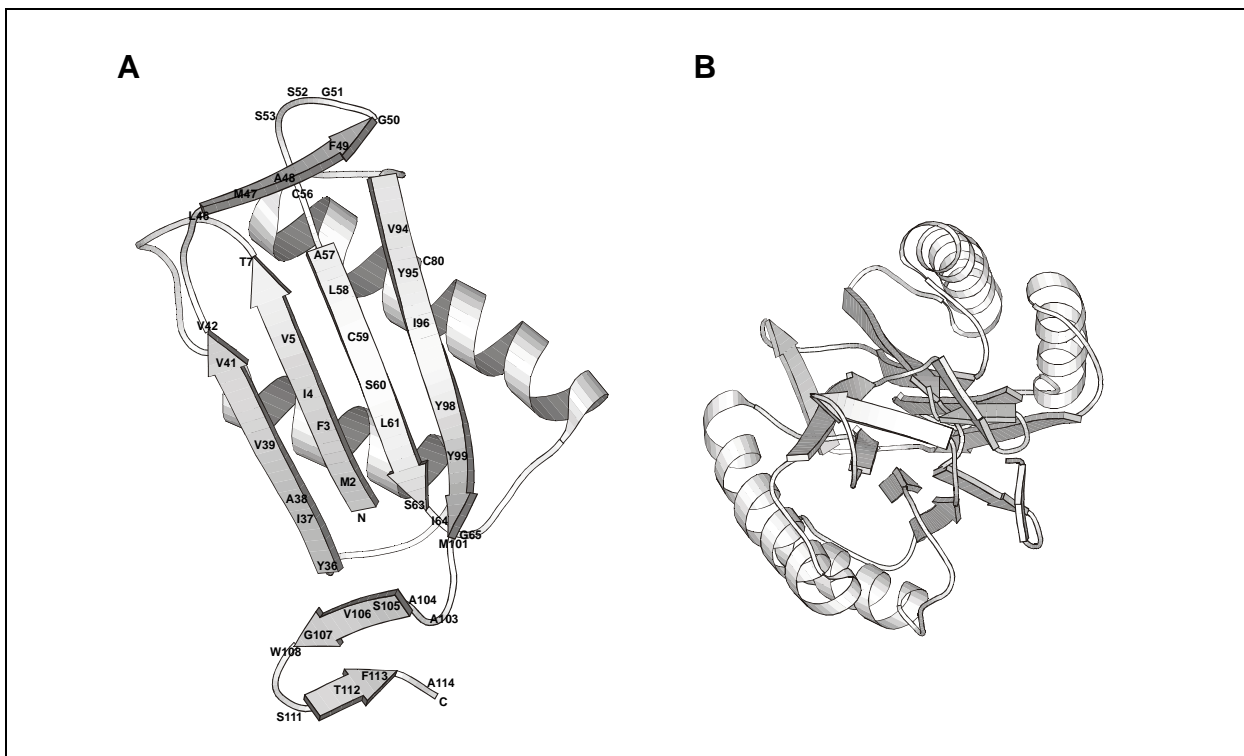


Abb. 14. Molecular Modelling von dimerem MIF. **A** MIF-Monomer MIF. Die hydrophoben Reste sind markiert. Sie wurden nach der Bewertungsskala von Wolfenden et al. (1981) bestimmt. **B** Modell eines möglichen MIF-Dimers. Die Abb. wurde mit Molscrip (Kraulis, 1991) erstellt.

3.4 Biologische Aktivität von MIF

3.4.1 Glucocorticoid-Overriding-Assay

Die Fähigkeit von MIF, die immunsuppressive Wirkung von Glucocorticoiden zu überschreiben, ist schon länger bekannt (Calandra et al., 1995). Dieser sogenannte Glucocorticoid-Overriding-Effekt sollte genutzt werden, um einen Assay zu entwickeln, in dem die erzeugten MIF-Mutanten auf ihre immunologische Aktivität hin getestet werden können. Ein spezifisches Überschreiben der immunsuppressiven Wirkung der Glucocorticoide ist bisher nur für MIF beobachtet worden. Darüber hinaus wurde der Effekt von MIF bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich nachgewiesen. Es handelt sich hierbei also um eine typisch zytokinartige Aktivität.

Bei diesem Assay werden periphere Blutmonozyten (PBMCs) mit Dexamethason behandelt. Dies führt zu einer Unterdrückung der LPS-induzierten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-8. Die Gabe von MIF hebt diese Hemmung auf. Um einen optimalen Assay zur Untersuchung der verschiedenen MIF-Mutanten zur Verfügung zu stellen, wurde der *Overriding*-Assay mit unterschiedlichen Präinkubationsbedingungen durchgeführt (Abb. 15).

Als optimal hinsichtlich eines maximalen Überschreibeffekts erwies sich die Präinkubation mit Dexamethason für 1 Stunde, anschließend die Inkubation mit MIF für eine Stunde, auf die dann die Stimulation mit LPS folgte. Nach 12 Stunden wurde dann die TNF- α -Konzentration im Überstand bestimmt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Protokoll verwendet.

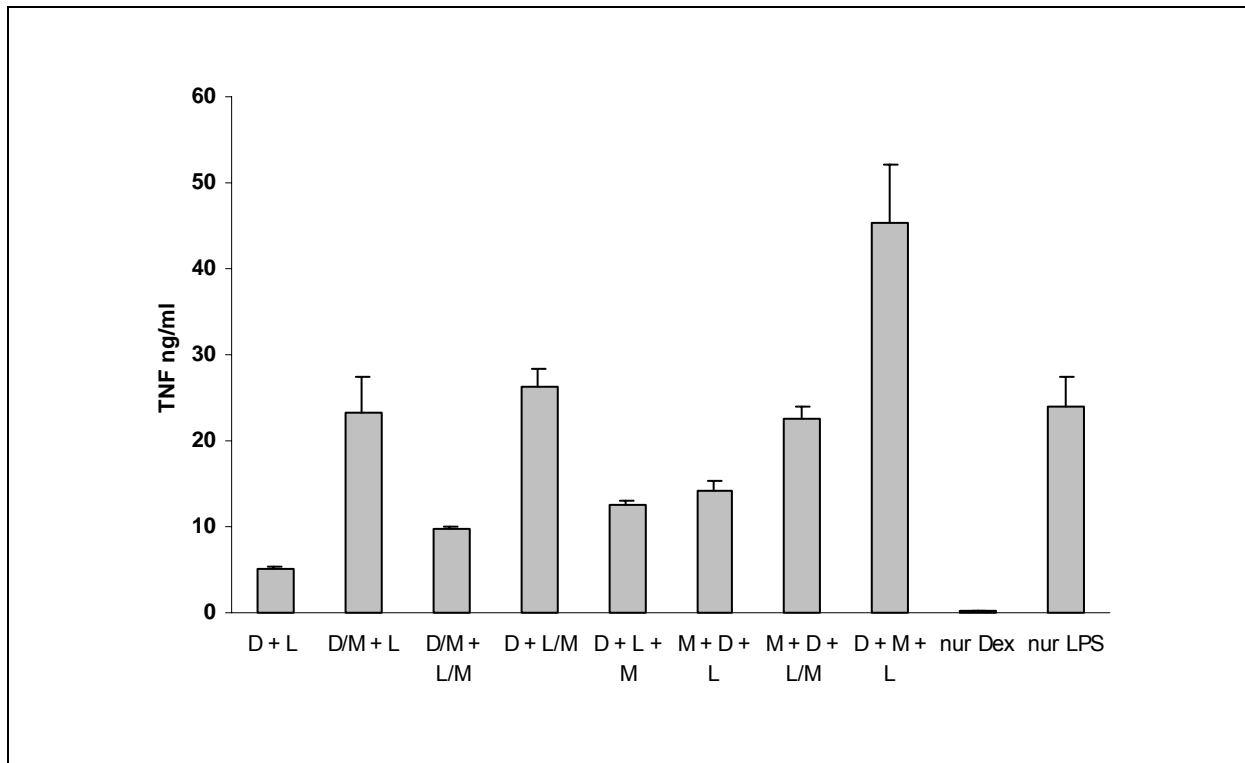


Abb. 15. Glucocorticoid-Overriding-Assay. *Overriding* der glucocorticoid-induzierten Hemmung der TNF- α -Ausschüttung nach LPS-Stimulation unter verschiedenen Präinkubationsbedingungen. + steht für eine Inkubationszeit von 1 h, / steht für gleichzeitige Gabe von zwei Agenzien (L: LPS 1 μ g/ml, D: Dexamethason 10^{-9} M, M: MIF 1 ng/ml)

3.4.2 Korrelation von biologischer und enzymatischer Aktivität von MIF

Da der Zusammenhang der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten von MIF mit den immunologischen Aktivitäten noch nie untersucht wurde, wurden die verfügbaren Mutanten von MIF in den verfügbaren Enzymassays und den immunologischen Assays getestet. Die Aktivität der C-terminalen Mutanten wurde sowohl mit dem Wildtyp als auch mit anderen ortsspezifischen MIF-Mutanten verglichen. Hierzu wurden die für MIF bekannten enzymatischen Aktivitäten bestimmt. Es wurde die Thiolprotein-Oxidoreduktase- und Tautomeraseaktivität untersucht. Darüber hinaus wurden die Mutanten auch in den immunologischen Assays, die auf der zytokinartigen Wirkung von MIF beruhen, eingesetzt. Diese Assays umfassten den *Leishmanien-Killing-Assay* und den *Glucocorticoid-Overriding-Assay* (Tab. 5).

Tabelle 5: Untersuchungen der biologischer und enzymatischen Aktivität der verfügbaren MIF-Mutanten. Die biologische Aktivität der Mutanten wurde in verschiedenen enzymatischen und immunologischen Assays untersucht und jeweils mit der Aktivität von wtMIF verglichen.

	Enzymatische Assays (in % Aktivität von wtMIF)			Zytokinassays (in % Aktivität von wtMIF)	
	HED-Redoxtest	Insulin-Redoxtest	Tautomerasetest	<i>Leishman.-Kill.-Test</i>	<i>Overriding-Test</i>
MIF(1-104)	38±4	93±17	< 0.1	9±3	33±6
MIF(1-109)	50±6	88±13	< 0.3	2±5	28±3
P1AMIF	33±7	90±19	< 2	ND	77±18
MIF(2-114)	49±11	84±20	< 0.1	ND	82±4
MIF(4-114)	1±4	95±6	ND	ND	125±14
C56SMIF	68±12	55±15	80±4	67±8	67±18
C59SMIF	5±4	14±5	80±5	<5	37±8
C80SMIF	81±4	70±12	33±3	88±22	78±12

HED-Oxidoreduktasetest nach Holmgren (1979b) und Kleemann et al. (1998a); Insulin-Redoxtest nach Holmgren (1979c) und Kleemann et al. (1998a); Tautomerasetest nach Rosengren et al. (1996); Leishmanientest nach Jüttner et al. (1998); Glucocorticoid-*Overriding*-Assay nach Abschnitt 3.4.1. ND: nicht durchgeführt

Die C-terminalen Deletionsmutanten MIF(1-109) und MIF(1-104) zeigen eine zwar verringerte, aber trotzdem signifikante Aktivität im HED-Redoxaktivitätstest. Im Insulintest sind diese Mutanten nahezu voll aktiv. Im Tautomerasetest sind beide Mutanten vollständig inaktiv. Im Leishmanien-Test sind die beiden C-terminalen Mutanten praktisch inaktiv, während sie im *Overriding*-Assay noch eine Aktivität von ungefähr 30 % der Wildtyp-Aktivität zeigen.

Neben den terminalen Deletionsmutanten und der Prolin-Austauschmutante P1AMIF wurden auch drei Cystein-Austauschmutanten untersucht. Bei diesen Mutanten sind die drei in MIF vorkommenden Cysteine jeweils gegen Serin ausgetauscht.

Die Mutante P1AMIF ist im Insulinassay praktisch voll aktiv und im HED-Assay zeigt sie eine zwar verringerte, aber immer noch signifikant vorhandene Aktivität. Im Tautomerase-Assay ist sie inaktiv. Im *Overriding*-Test ist sie praktisch vollständig aktiv. Die N-terminalen Deletionsmutanten MIF(2-114) und MIF(4-114) sind im Insulin-Assay voll aktiv. Im HED-Assay zeigt nur noch MIF(2-114) Aktivität, während MIF(4-114) vollständig inaktiv ist. Im Tautomerase-Assay ist MIF(2-114) vollständig inaktiv. Beide Mutanten sind im *Overriding*-Assay aktiv, wobei MIF(4-114) sogar eine höhere Aktivität als der Wildtyp aufweist.

Die enzymatischen Aktivitäten der Cystein-Mutanten C56S und C80S ist zwar verringert, aber trotzdem in allen drei Assays signifikant vorhanden. Die Mutante C59SMIF zeigt in den redoxbasierten Assays eine praktisch nicht mehr vorhandene Aktivität, während die Aktivität im Tautomerase-Assay kaum reduziert ist. Die Zytokinaktivitäten der Mutanten C56S und C80S sind zwar reduziert, aber dennoch signifikant vorhanden. C59S zeigt im Leishmanien-Test praktisch keine stimulierende Wirkung mehr und im *Overriding*-Test eine deutlich reduzierte Aktivität.

3.5 Die Suche nach MIF-bindenden Proteinen

Seit der Entdeckung von MIF wurde über die Existenz eines Rezeptors spekuliert. Bis heute konnte jedoch kein Rezeptor gefunden werden. Die enzymatischen Aktivitäten von MIF legen darüber hinaus die Möglichkeit von intrazellulären Funktionen nahe. Um sowohl solche intrazellulären Bindungspartner als auch mögliche Rezeptoren zu finden, wurde ein *Two-Hybrid-Screening* in Hefe durchgeführt (Fields und Song, 1989).

3.5.1 *Two-Hybrid-Screening* auf MIF-bindende Proteine

Die komplette Sequenz von humanem MIF wurde aus dem Plasmid pMIF in pAS-1 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* kloniert. Die Richtigkeit des erhaltenen Klons wurde durch bidirektionale Sequenzierung überprüft und bestätigt und das resultierende Plasmid mit pRM12 bezeichnet.

Mit dem MIF-Plasmid pRM12 wurde ein *Two-Hybrid-Screening* wie vom Hersteller (Clontech, Heidelberg) vorgeschrieben durchgeführt. Es wurde eine *Library* aus humanen Lymphozyten mit $3 \cdot 10^6$ unabhängigen Klonen mit cDNA-Längen von 0.4 bis 3 kb verwendet.

Aus 10^7 Transformanden wurden durch Nährstoffselektion und nach Austesten der β -Galaktosidaseaktivität drei Klone isoliert. Das humane Protein Jab1, ein Koaktivator der AP-1-abhängigen Transkription, (Claret et al., 1996) wurde in einem dieser Klone als MIF-bindendes Protein gefunden. Die anderen Klone enthielten die Sequenz von humanem MIF und bestätigten damit, dass MIF zur Homo-Oligomerisierung fähig ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Rolle von MIF bei der Regulation Jab1-vermittelter Vorgänge und die Frage, ob hierbei die Enzymaktivitäten von MIF eine Bedeutung haben, untersucht.

3.5.2 MIF als Inhibitor der AP-1-abhängigen Transkription

Jab1 ist ein 38 kD Protein, das ursprünglich als Koaktivator der c-Jun und JunD Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (Claret et al., 1996).

3.5.2.1 Aktivierung der AP-1-abhängigen Transkription durch Jab1

Die Wirkung von Jab1 beruht auf der Erhöhung der AP-1-abhängigen Transkription. Um den Einfluss von MIF auf diese AP-1-abhängige Transkription über die Bindung an Jab1 zu testen, wurden Kotransfektionsexperimente in 293T-Zellen durchgeführt. Als Reporter-genkonstrukt wurde der Kollagenase *12-o-Tetradecanol phorbol acetate response element* (TRE) Promoter vor Luziferase verwendet (Abb. 16). Die transiente Kotransfektion von Jab1 aktiviert diese AP-1-Reporter-genaktivität. Die Präinkubation mit MIF inhibiert diese Aktivität in dosisabhängiger Weise fast vollständig.

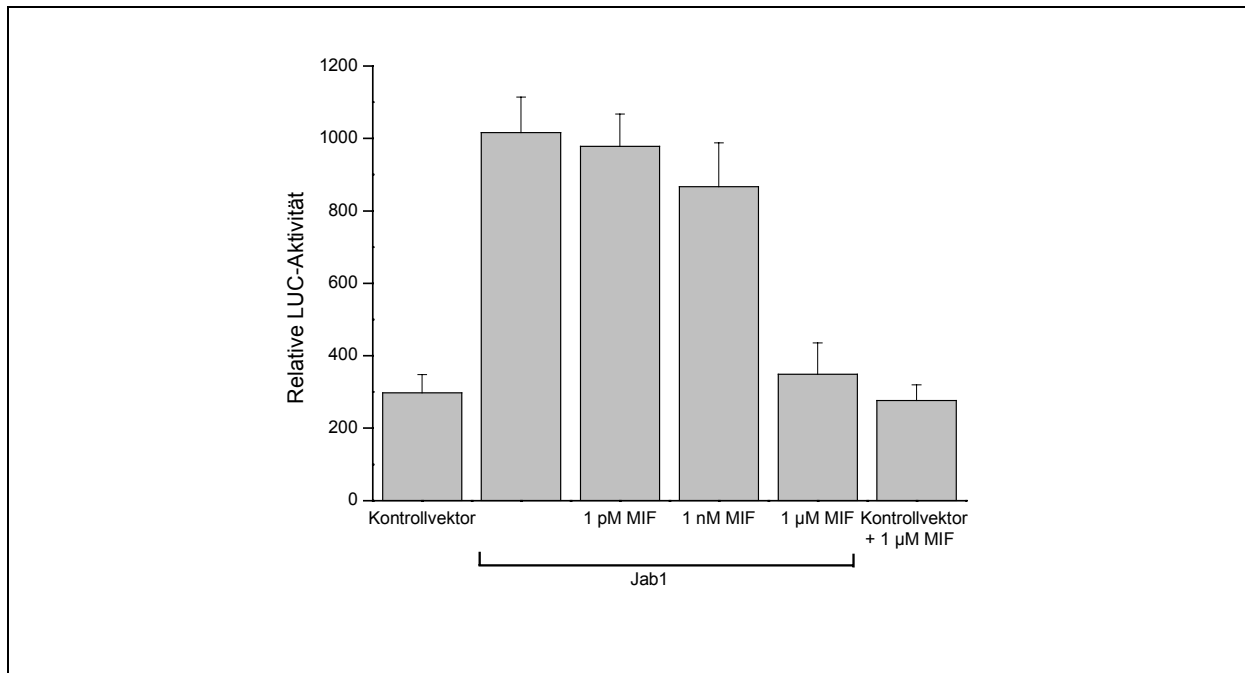


Abb. 16. MIF inhibiert die Aktivierung der AP-1 Transkription durch Jab1. MIF inhibiert die Jab-1-vermittelte Aktivierung des Kollagenase *12-o-tetradecanol phorbol acetate response element* (TRE) Promoters. 293T Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt und pJab oder mit einem Kontrollplasmid cotransfiziert und mit den angegebenen MIF-Konzentrationen für 18 h inkubiert. Die Ergebnisse sind als relative Luziferase-Aktivität, normiert auf die ebenfalls kotransfizierte β -Galaktosidase, angegeben.

Als Kontrolle, um Einflüsse der Inkubation mit MIF auf den Zellstatus auszuschließen und um die Transformationseffizienz zu überprüfen, wurde in einer weiteren Kotransfektion ein Plasmid, welches das Protein *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP) einhielt, zusätzlich zu dem AP-1-Reporter-genkonstrukt und dem Jab1-Plasmid transfiziert. Anschließend wurden die aufgeschlossenen 293T-Zellen mittels *Western-Blot* und anti-EGFP- und anti-Jab1-Antikörpern analysiert (Abb. 17). Die EGFP-Expression war in allen vier Ansätzen gleich stark. Jab1 wurde nur in den Ansätzen sichtbar exprimiert, in die Jab1 transfiziert wurde.



Abb. 17. EGFP und Jab1 Expression in Jab1-transfizierten Zellen. EGFP wird in allen Ansätzen gleich stark exprimiert. Jab1 ist nur in den Ansätzen nachweisbar, die mit Jab1 transfiziert wurden.

3.5.2.2 TNF- α -induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivierung

Ein Protein, das die AP-1-abhängige Transkription stimuliert, ist der Tumor Nekrose Faktor TNF- α (Brenner et al., 1989). Zur Untersuchung des Einflusses von MIF auf diese aktivierende Wirkung von TNF- α wurden 293-Zellen in unterschiedlichen MIF-Konzentrationen präinkubiert und mit TNF- α stimuliert. MIF inhibiert die TNF-induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivität vollständig (Abb. 18). Die Inhibierung durch MIF ist schon bei einer Konzentration von 1 nM signifikant und wird bei einer MIF-Konzentration von 1 μ M vollständig. Die C59S-MIF-Mutante, die keine enzymatische Tautomeraseaktivität und eine reduzierte immunologische Aktivität besitzt, zeigt keine inhibitorische Wirkung. Die Kontrollansätze mit MIF, aber ohne die Stimulation mit TNF- α , zeigen keine Reduktion der AP-1-Transkriptionsaktivität.

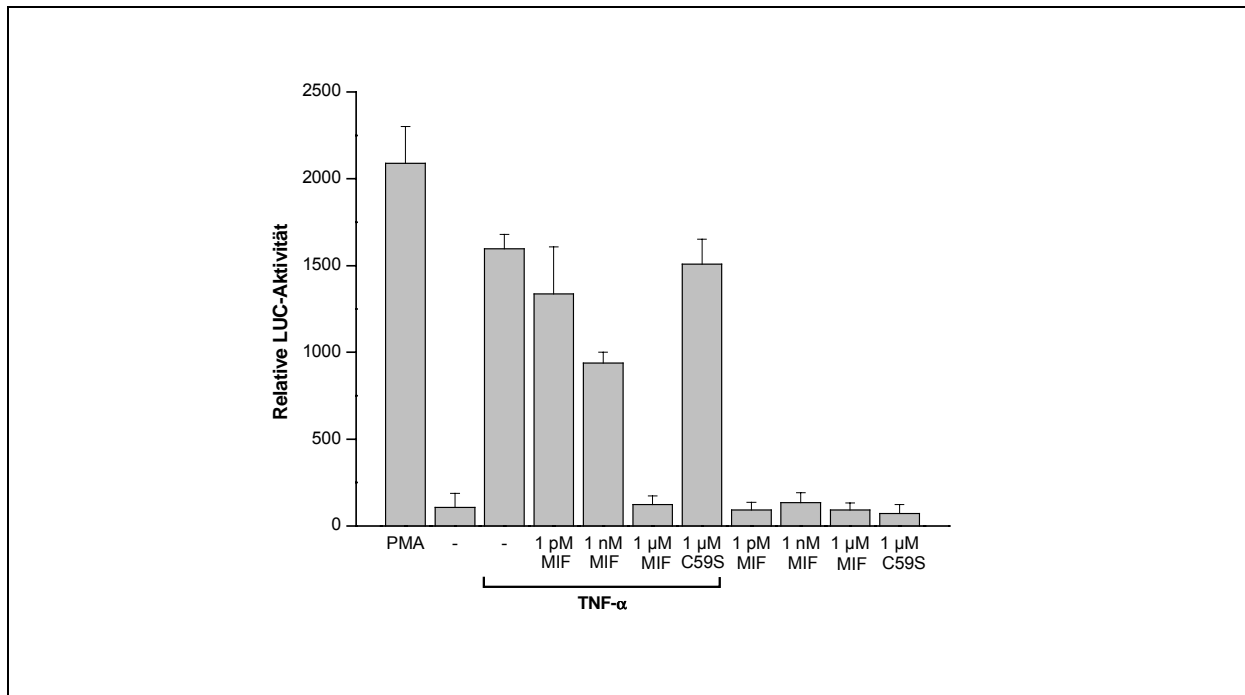


Abb. 18. MIF inhibiert die TNF-induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivität. Nach 18 h Inkubation mit den angegebenen MIF-Konzentrationen wurden 293T-Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) behandelt. *Phorbol myristate acetate* (PMA, 100 nM) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden mit dem TRE-Reportergenkonstrukt transient transfiziert. Die Ergebnisse sind als relative Luziferase-Aktivität normiert auf die kotransfizierte β -Galaktosidase angegeben.

Die Testung der anderen beschriebenen MIF-Mutanten in diesem Assay war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

3.5.2.3 UV-induzierte AP-1-abhängige Transkriptionsaktivierung

Die AP-1-abhängige Transkription wird nicht nur durch Phorbolester wie PMA oder durch Zytokine wie TNF- α aktiviert, sondern auch durch UV-Strahlung (Stein et al., 1989). Um den Einfluss von MIF auf diesen Aktivierungsweg der AP1-Transkription zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit MIF präinkubiert und mit UV-Strahlung behandelt (3.6 Joule/cm²). Die UV-Bestrahlung führt erwartungsgemäß zu einer Aktivierung der AP-1-abhängigen Transkription (Abb. 19). Werden die Zellen mit MIF vorbehandelt, so zeigt sich, dass MIF diese UV-induzierte AP-1-Reportergenaktivierung schon in einer Konzentration von 1 pM signifikant inhibiert. Bei einer 1 μ M MIF-Konzentration wird die UV-Induktion vollständig aufgehoben.

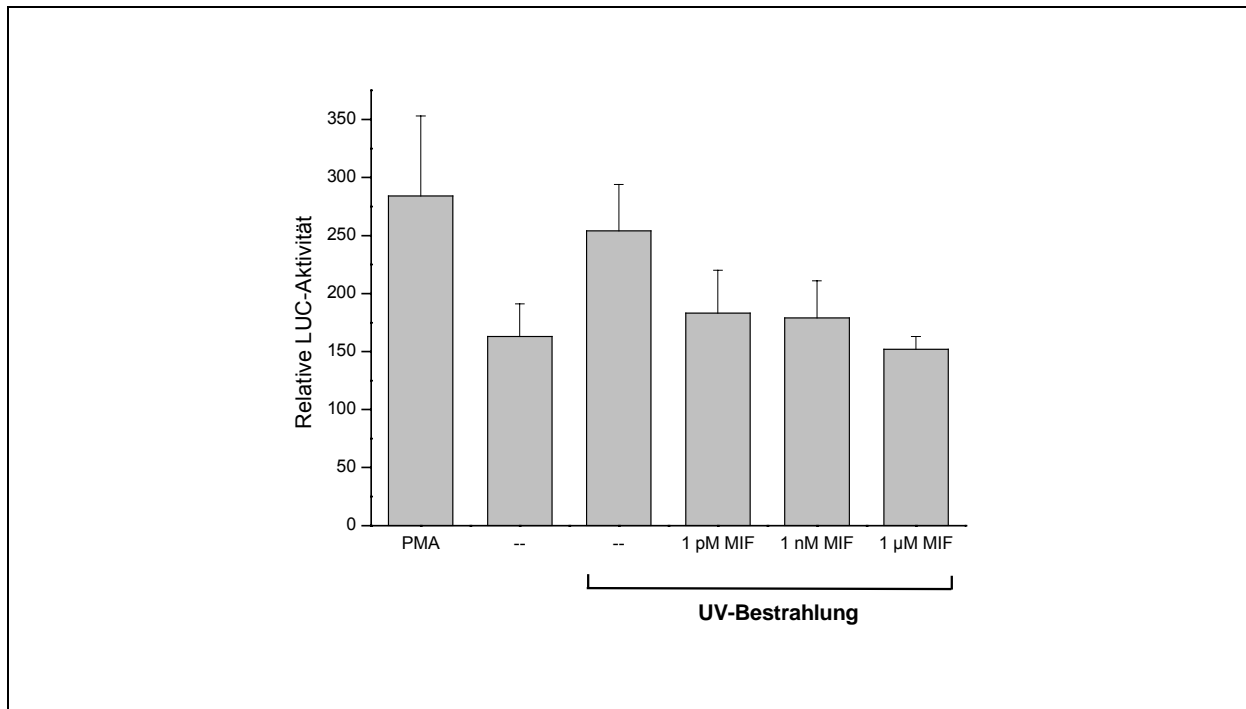


Abb. 19. UV-induzierte AP1-Aktivierung wird durch MIF inhibiert. 293T Zellen wurden für 18 h mit den angegebenen MIF-Konzentrationen inkubiert und anschließend für 20 min UV-bestrahlt oder mit PMA als Positivkontrolle behandelt und für 1.5 h die Inkubation fortgesetzt. Die Ergebnisse sind als relative Luziferase-Aktivität normiert auf die kotransfizierte β -Galaktosidase angegeben.

4 Diskussion

In den letzten Jahren kam es zu einer Vielzahl von Erkenntnissen, welche dazu beitragen die Struktur und biologische Funktion von MIF aufzuklären (Bernhagen et al., 1993; Calandra et al., 1994; Bernhagen et al., 1994b; Calandra et al., 1995; Bacher et al., 1996; Bernhagen et al., 1996; Lan et al., 1997a). Diese Studien zeigten auf, dass MIF an der Regulation der Immun- und zentralen Stressantworten beteiligt ist. Die Analyse der Röntgenstruktur von MIF führte zu einem tieferen Verständnis von Struktur und Aktivität von MIF (Kato et al., 1996; Sun et al., 1996a; Suzuki et al., 1996b). Da bisher jedoch weder ein Rezeptor von MIF identifiziert wurde noch eine physiologische enzymatische Aktivität von MIF gefunden wurden, blieb der genaue Wirkmechanismus von MIF unklar.

4.1 Bedeutung des C-Terminus für die Struktur von MIF

Einen wichtigen Beitrag zu Aufklärung der molekularen Funktion von MIF wurde von Struktur- und Aktivitätsstudien des C-terminalen Endes von MIF erwartet. Es wurde postuliert, dass diese Region zur Stabilisierung der Trimerstruktur von MIF beiträgt (Sun et al., 1996a). Dies soll durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den C-terminalen β -Strängen benachbarter Monomere geschehen. Aufgrund einer auffallenden Ähnlichkeit mit dem bakteriellen Enzym 5-Carboxymethyl-2-hydroxy-muconatisomerase (CHMI) wurde darüber hinaus für dieser Region eine funktionelle Rolle vorgeschlagen (Suzuki et al., 1996b). Die genaue Struktur dieser Region konnte jedoch durch die verschiedenen Analysemethoden nicht aufgeklärt werden. Bei murinem MIF konnte der C-Terminus strukturell nicht eingeordnet werden (Suzuki et al., 1996b), während bei humanem MIF die Existenz von keinem, einem oder zwei kurzen C-terminalen β -Strängen aus den Strukturuntersuchungen abgeleitet wurde (Kato et al., 1996; Mühlhahn et al., 1996; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996a). Dieselben gegensätzlichen Ergebnisse finden sich auch bei den NMR-Daten wieder (Nishihira et al., 1995; Mühlhahn et al., 1996; Mozetic-Francky et al., 1997).

Zur besseren Aufklärung von Struktur und Bedeutung des C-Terminus wurden vier C-terminale Deletionsmutanten erzeugt. In MIF(1-109) mit fünf deletierten Aminosäuren sollte der potenzielle β_7 -Strang deletiert sein. In MIF(1-104) sind zehn C-terminale Aminosäuren deletiert, was zur Deletion der putativen β -Stränge 6 und 7 führen sollte. In MIF(1-99) sind zusätzlich noch weitere Aminosäuren des davor liegenden β -Strangs deletiert. In MIF(1-92) wäre dieser vollständig deletiert. Für den

β_6 -Strang wurde in einer Röntgenstruktur die Interaktion mit dem benachbarten Monomer vorgeschlagen, welche eine trimerstabilisierende Wirkung ausüben sollte (Sun et al., 1996a). In einer anderen Röntgenstrukturanalyse wurde vorgeschlagen, dass diese stabilisierende Interaktion von zwei β -Strängen, 6 und 7, die ein antiparalleles β -Faltblatt bilden, erzeugt würde (Sugimoto et al., 1996). Bei den letzten beiden Mutanten war zu erwarten, dass die teilweise oder vollständige Deletion des β_5 -Strangs zu einer Beeinträchtigung der strukturellen Integrität des Monomers führt, da dieser β_5 -Strang Teil des zentralen β -Faltblattes ist (Abb. 3). Die Mutanten MIF(1-99) und MIF(1-92) bildeten bei der Expression in *E. coli* Inclusion bodies und konnten nicht aufgereinigt werden. Die Deletionen des β_5 -Strangs führten sehr wahrscheinlich zu einer massiven Beeinträchtigung der Struktur des Moleküls, die zu dem vom Wildtyp abweichenden Verhalten dieser Mutanten führte. Die Mutanten MIF(1-109) und MIF(1-104) konnten nach dem für Wildtyp-MIF etablierten Protokoll exprimiert, aufgereinigt und renaturiert werden.

Durch den Einsatz von Circular dichroismus-Spektroskopie war es möglich, die Sekundärstrukturanteile der Deletionsmutanten zu bestimmen. Die Strukturbestimmung erfolgt hierbei in Lösung bei nahezu physiologischen Konzentrationen. Damit ist die Ergänzung von Daten, die mittels Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden, möglich. Die Circular dichroismus-Messungen der Deletionsmutanten zeigten, dass die beiden C-terminalen Mutanten MIF(1-109) und MIF(1-104) eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit Wildtyp-MIF aufweisen. Somit beeinflusst vorhersagegemäß die Deletion der Aminosäuren 105-114 die Strukturintegrität von MIF nicht. Zur genaueren Analyse der CD-Daten wurde auf Dekonvolutionsprogramme zurückgegriffen. Mit diesen Programmen ist es möglich, aus CD-Daten die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente in einem Protein abzuschätzen. Es zeigte sich, dass die Deletion der Aminosäuren 110-114 zu einem Anstieg an *Random coil*-Struktur in Verbindung mit einem Absinken des β -Faltblattanteils führt. Die CD-Daten belegen damit die Existenz des in einer der Kristallstrukturanalysen postulierten β_7 -Strangs. Obwohl die Auswertelgorithmen hinsichtlich des β -Faltblattanteils zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, findet der Algorithmus nach Perczel et al. (1992a), der sich besonders gut für die Analyse des β -Faltblattgehalts eignet, einen signifikanten Rückgang an antiparallelen β -Faltblattstrukturen aufgrund der Deletion der Aminosäuren 110-114. Die weitere Deletion der Aminosäuren 105-110 führt nach diesem Algorithmus zu keinem weiteren Rückgang des β -Faltblattanteils. Damit deuten die CD-Messungen an, dass in der C-terminalen Region von MIF ein antiparalleles β -Faltblatt, das aus den β -Strängen 6 und 7 gebildet wird, existiert. Diese Darstellung stimmt mit den Kristallstrukturdaten von Sugimoto et al. (1996)

überein, welche die Aminosäuren 105-108 und 111-113 in dieser Konformation sehen.

Um die stabilisierende Wirkung der C-terminalen Region für die Struktur von MIF zu untersuchen, wurden GdnHCl-induzierte Entfaltungsexperimente durchgeführt. Die beiden Deletionsmutanten weisen eine leicht, aber signifikant erniedrigte thermodynamische Stabilität auf. Der Mittelpunkt der Entfaltung liegt für wtMIF bei 1.8 M Gdn, bei MIF(1-109) bei 1.6 M und bei MIF(1-104) bei 1.5 M. Die freie Entfaltungsentnergie in Abwesenheit von Denaturand ist ebenfalls verringert. Sie beträgt für wtMIF $12.51 \text{ kJ mol}^{-1}$, MIF(1-109) 11.9 kJ mol^{-1} und MIF(1-104) 8.55 kJ mol^{-1} . Aufgrund der beobachteten Sekundärstrukturen der C-terminalen Region wäre eigentlich eine deutliche Destabilisierung der Proteinstruktur nach Deletion der Aminosäuren 110-114 zu erwarten gewesen. Diese tritt aber erst mit der Deletion der davor liegenden fünf Aminosäuren in MIF(1-104) auf. Dies könnte bedeuten, dass der β_6 -Strang nach Deletion des β_7 -Strangs durch das Eingehen anderer Wechselwirkungen restabilisiert würde. Erst die komplette Deletion des β_6/β_7 -Faltblattes würde dann zu einer Destabilisierung des Moleküls führen.

Zusammen mit den Röntgenstrukturdaten zeigen die Untersuchungen der C-terminalen Deletionsmutanten, dass die C-terminalen Aminosäuren von humanem MIF eine antiparallele β -Faltblattstruktur ausbilden, die zur Stabilisierung des Moleküls beiträgt.

4.2 Untersuchung der kanalbildenden Funktion von MIF

Das MIF-Trimer ist nach den Daten der Röntgenstrukturanalyse ein α/β -Protein mit sechs α -Helices, die drei β -Faltblätter umgeben (Sun et al., 1996a). Die β -Faltblätter bilden einen zentralen Kanal mit offenen solvenzzugänglichen Enden. Ein moleküldurchspannender Kanal findet sich sonst nur noch bei wenigen anderen Proteinen. Beispiele für diese Proteine sind groEL (Braig et al., 1994), Porin (Kleffel et al., 1985), Maltoporin (Stauffer et al., 1990), Toxin- γ (Bilwes et al., 1994) oder das 14-3-3-Protein (Xiao et al., 1995). Der Kanal im MIF-Trimer verläuft durch die Mitte des Proteins entlang der 3-fach-Symmetrieachse und besitzt an seiner engsten Stelle einen Durchmesser von 5 Å und an seiner weitesten einen Durchmesser von 15 Å. Entlang des Kanals finden sich überwiegend hydrophobe Aminosäuren. Das elektrostatische Potenzial entlang dieses Kanals ist überwiegend positiv. Hieraus ergab sich die Spekulation, dass der Kanal mit negativ geladenen Molekülen

interagieren können müsste und dass dies eine funktionelle Rolle für den Wirkmechanismus von MIF spielen könnte.

Zur Überprüfung dieser Spekulation wurde die potenzielle Kanalfunktion von MIF in einem System untersucht, das auf dem Farbstoffausstrom aus Liposomen basiert. Durch Dotierung der Liposomen mit dem Protein Bcl-2, dessen kanalbildende Funktion beschrieben wurde (Antonsson et al., 1997; Schendel et al., 1997), konnte ein Farbstoffausstrom aus dem Inneren der Liposomen nach außen nachgewiesen werden. Im Vergleich hierzu ergab eine Dotierung mit MIF keinerlei Farbstoffausstrom.

Da die zentralen β -Faltblätter von MIF, die laut Röntgenstrukturdaten den zentralen Kanal im MIF-Trimer ausbilden, relativ hydrophob sind, verhindert dies möglicherweise die Passage des relativ polaren Carboxyfluoresceins. Der potenzielle MIF-Kanal ist im Vergleich zu den Kanälen von Proteinen mit etablierten Kanalfunktionen relativ klein (5-15 Å im Gegensatz 20-50 Å) und lässt auch kleine Farbstoffe, wie Carboxyfluorescein, offenbar nicht passieren. Deshalb ist der MIF-Kanal vermutlich funktionell nicht relevant. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen zum Oligomerisierungsstatus von MIF (Abschnitt 4.3) unter physiologischen Bedingungen, die auch in den Liposomenversuchen vorlagen, dass MIF größtenteils als Monomer und Dimer vorliegt. Von ihren strukturellen Gegebenheiten her sind diese beiden Oligomerformen aber nicht zur Kanalbildung fähig.

4.3 Der Oligomerisierungsstatus von MIF

Über den genauen Wirkungsmechanismus von MIF ist noch wenig bekannt. Es ist nicht klar, ob die Monomer-, Dimer- oder Trimer-Form von MIF im Rahmen seiner zellulären Wirkung eine funktionale Rolle einnimmt. Die Daten der Röntgenstrukturanalysen, die MIF als nicht-kovalent assoziiertes Homotrimer zeigen, legen die Vermutung nahe, dass diese Form die biologisch aktive ist (Suzuki et al., 1994; Kato et al., 1996; Sun et al., 1996a). Ein Beispiel für ein Zytokin, bei dem es sich solchermaßen verhält, ist TNF- α . TNF- α liegt laut der Röntgenstrukturanalyse und auch nach Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen als nicht-kovalentes Trimer vor (Smith und Baglioni, 1987; Banner et al., 1993). Es aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden durch eine Rezeptortrimerisierung. Ein weiteres Beispiel für die Übereinstimmung der Oligomerisierung in der Röntgenstrukturanalyse und unter nativen Bedingungen ist Interferon- γ , das in beiden Fällen als Dimer vorliegt

(Grzesiek et al., 1992). Die Wirkung von Interferon- γ beruht auf der Induzierung der Dimerisierung seines Rezeptors (Walter et al., 1995).

Im Gegensatz hierzu sind auch Fälle bekannt, in denen die Röntgenstrukturanalysen im Widerspruch zu den unter physiologischen Bedingungen ermittelten Daten liegen. So liegt zum Beispiel das Zytokin IL-8 unter physiologischen Bedingungen als Monomer vor und ist auch in dieser Form biologisch aktiv (Burrows et al., 1994; Paolini et al., 1994; Rajarathnam et al., 1994; Rajarathnam et al., 1995). Nach Röntgenstruktur- und NMR-Analysen liegt es jedoch als Dimer vor (Cloure et al., 1990; Baldwin et al., 1991).

Für MIF liegen widersprüchliche Daten zum Oligomerisierungsgrad vor. Röntgenstrukturanalysen sehen MIF als Trimer (Kato et al., 1996; Sugimoto et al., 1996; Sun et al., 1996b). Dagegen liegt laut NMR-Analyse ein Dimer vor (Mühlhahn et al., 1996). Bei der analytischen Ultrazentrifugation von murinem MIF wurde das Vorliegen eines Dimers beobachtet (Nishihira et al., 1995). Mittels Gelfiltration wurde bei humanem MIF ein Dimer (Zeng et al., 1993) und bei bovinem MIF ein Monomer gefunden (Galat et al., 1994). SDS-PAGE von MIF, das chemisch quervernetzt wurde, erbrachte Hinweise auf das Vorliegen von Trimeren (Bendrat et al., 1997).

Da die Kenntnis des Oligomerisierungsstatus von MIF von essentieller Bedeutung für das Verständnis der molekularen Wirkmechanismen und potenzieller Rezeptorbindungsfunktionalitäten ist, wurde eine systematische Untersuchung der Oligomerisierung unter physiologischen Bedingungen durchgeführt.

Das MIF-Monomer enthält drei Cysteine, die durch die Ausbildung von Cysteinbrücken die Assoziation des Oligomers beeinflussen könnten. Durch vergleichende SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen war bekannt, dass die Assoziation der Untereinheiten nicht über kovalente intermolekulare Disulfidbrücken vermittelt wird (Bernhagen et al., 1994c). Eine native Gelfiltration zeigte, dass MIF unter nicht-denaturierenden Bedingungen als Dimer vorliegt. Wird MIF mit Acetonitril denaturiert und wieder der nativen Gelfiltration unterworfen, so eluiert es als Monomer. Bei der nativen Gelfiltration kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein mit der Säulenmatrix interagiert und es somit zur Beeinflussung der Assoziation des Proteins kommen kann. Um dieses potenzielle Problem zu umgehen, wurden im Weiteren die Proteine kovalent quervernetzt und dann unter denaturierenden Bedingungen analysiert.

Sowohl humanes als auch murines MIF wurden bei einer Konzentration von 1 μM mit Glutaraldehyd quervernetzt und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Es zeigte sich, dass MIF unter diesen Bedingungen als Mischung aus Monomer, Dimer und Trimer vorliegt. Die densitometrische Auswertung erbrachte, dass 44 Prozent des Proteins als Monomer, 33 Prozent als Dimer und 23 Prozent als Trimer vorliegen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Röntgenstrukturuntersuchungen, die das Vorliegen der Trimerform aufzeigen.

Ein mögliches Problem bei der Quervernetzung mit Glutaraldehyd ist dessen Neigung zur Autopolymerisierung, die zu artifiziellen Quervernetzungen führen kann. Deshalb wurden die Quervernetzungsversuche mit dem photoreaktiven *Crosslinker* BASED überprüft. Es wurde eine ähnliche Oligomerenverteilung wie bei der Glutaraldehyd-Vernetzung gefunden. MIF lag zu 59 Prozent als Monomer, 29 Prozent Dimer und 12 Prozent Trimer vor. Da die Ausbeute an vernetztem Protein bei photoreaktiven Reagenzien wie BASED erfahrungsgemäß relativ niedrig ist, kam die Verschiebung der Oligomerenverteilung zum Monomer nicht unerwartet (Mattson et al., 1993). BASED besitzt nichtsdestotrotz den Vorteil, dass es nicht nur die Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin quervernetzt, sondern die Proteine durch unspezifische Photoaktivierung verknüpft. Deshalb ist die Quervernetzung nicht von den Abständen der reaktiven Aminosäuren zueinander oder anderen sterischen Behinderungen abhängig.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede im Oligomerisierungsgrad zwischen den *Crosslinking*-Experimenten und den Röntgenstrukturanalysen könnte in den eingesetzten Konzentrationen zu finden sein. Während in den *Crosslinking*-Versuchen nahezu physiologische Konzentrationen von 1 μM verwendet wurden, wurde bei der Röntgenkristallanalyse eine Konzentration von über 1 mM verwendet. Bei solch hohen Konzentrationen könnte ein vorliegendes Gleichgewicht an Oligomeren zu den größeren Assoziationsformen verschoben werden und dadurch die Kristallisation in diesen Formen verursacht werden. Es ist bekannt, dass Serumkonzentrationen an MIF nach Immunstimulation in den unteren mikromolaren Bereich ansteigen können (Mikulowska et al., 1997; Bernhagen et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, dass MIF bei diesen Konzentrationen die volle biologische Aktivität aufweist (Calandra et al., 1994; Bernhagen et al., 1994c). Um den Einfluss der Konzentration auf die Oligomerisierung von MIF zu ermitteln, wurde MIF in einem möglichst großen Konzentrationsbereich mittels der *Crosslinking*-Methode untersucht. In einem Bereich von 0.1 bis 18 μM zeigt sich keine Abhängigkeit der Oligomerisierung von der Konzentration. Bei allen Konzentrationen findet sich das gleiche Verhältnis von

Monomer, Dimer und Trimer. Aufgrund von Gleichgewichtsregeln wären eigentlich konzentrationsabhängige Effekte zu erwarten gewesen. Da MIF aufgrund von Löslichkeitsproblemen und versuchstechnischen Gegebenheiten nicht bei wesentlich höheren oder niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden konnte, ist anzunehmen, dass diese konzentrationsabhängigen Effekte in diesen nicht untersuchten Bereichen auftreten würden.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse wurden durch denaturierende Gelfiltration des quervernetzten MIF bestätigt. Es wurden zwei Fraktionen, den monomeren und dimeren Formen entsprechend, nachgewiesen. Eine Trimer-Fraktion konnte nicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass trimeres MIF leichter als die Monomer- und Dimerform aggregiert und unspezifisch an die Gelmatrix bindet und deshalb selbst unter den denaturierenden Bedingungen nicht eluiert werden kann. Über die Möglichkeit eines solchen Verhaltens wurde schon bei amyloidogenen Proteinen berichtet (Westermarck et al., 1987; Kapurniotu et al., 1998).

Die *Crosslinking*-Untersuchung der verfügbaren MIF-Mutanten bestätigte die Ergebnisse von wtMIF. Bei den C-terminalen Deletionsmutanten MIF(1-109) und MIF(1-104) wurden keine wesentlichen Veränderungen der Oligomerenverteilung beobachtet. Bei einer postulierten Funktion des C-Terminus für die Stabilisierung des Trimers wären erhöhte Dimer- und Monomeranteile zu erwarten gewesen. Im Gegensatz hierzu liegen sogar leicht erhöhte Trimeranteile bei den C-terminalen Deletionsmutanten vor. Bei den Cystein-Austauschmutanten C80S und C56S liegen keine signifikanten Veränderungen der Oligomeranteile vor. Bei der Mutante C59S liegt der Anteil an Trimer nur bei 10 Prozent und der Dimeranteil bei 27 Prozent. Da eine intermolekulare Disulfidbrücke ausgeschlossen wurde, handelt es sich hierbei wohl um Konformationseffekte aufgrund des Aminosäureaustausches, die sich auf die Assoziierung auswirken.

Aufgrund der Daten der Quervernetzungsversuche wurde das mögliche dreidimensionale Arrangement von MIF-Untereinheiten zu einem Dimer untersucht (Abb. 14). In dem vorliegenden Modell bilden die hydrophoben Aminosäuren im zentralen viersträngigen β -Faltblatt des Monomers einen hydrophoben Bereich, der zur Interaktion mit der anderen Untereinheit führt und damit die Bildung eines stabilen Dimers ermöglicht. Grundlage für dieses Modell sind strukturelle Homologien der dreidimensionalen Struktur von MIF mit dem Enzym S-Adenosylmethioninsynthetase. Dieses Enzym besitzt eine Domäne, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem

MIF-Monomer aufweist und die über hydrophobe Wechselwirkungen der β -Faltblattstruktur zur Ausbildung der Oligomerstruktur beiträgt.

Insgesamt zeigen die *Crosslinking*-Untersuchungen und die Gelfiltrationsanalysen, dass MIF bei physiologischen Konzentrationen als Mischung aus Monomer, Dimer und Trimer vorliegt. Das Trimer, das nach den Röntgenstrukturanalysen die einzige oder zumindest vorherrschende Form sein sollte, hat überraschenderweise nur einen kleinen Anteil an der Oligomerenverteilung unter diesen Bedingungen. Dieses Ergebnis wird auch durch neuere Daten von Tomura et al. (1999) bestätigt, die mittels analytischer Ultrazentrifugation von MIF nachweisen, dass in Lösung das Monomer die hauptsächliche Assoziationsform von MIF ist.

4.4 Die immunologische und enzymatische Aktivität von MIF

Die molekularen Grundlagen der immunologischen Effekte von MIF waren zu Beginn dieser Arbeit noch vollständig ungeklärt. Auf der einen Seite standen Befunde zur Wirkung von MIF auf Immunzellen. Neben der namensgebenden Wirkung auf Makrophagen waren dies vor allem proinflammatorische Effekte auf T- und B-Zellen und auf Makrophagen. Hierbei stellt besonders die Fähigkeit von MIF als Glucocorticoidantagonist zu fungieren ein Alleinstellungsmerkmal unter den Zytokinen dar. Auf der anderen Seite zeigte sich im Verlauf dieser Arbeit, dass MIF enzymatische Funktionen besitzt. Zum einen eine Redoxaktivität und zum anderen eine Tautomeraseaktivität. Der Zusammenhang zwischen diesen enzymatischen Aktivitäten und den immunologischen Befunden wurde jedoch nie untersucht. Deshalb wurde eine vergleichende Untersuchung und Gegenüberstellung der enzymatischen und immunologischen Aktivitäten von MIF und der verfügbaren Mutanten durchgeführt.

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von MIF und der Mutanten wurden drei verschiedene Enzymassays eingesetzt. Zur Charakterisierung der Redoxaktivität wurden der Insulinreduktionstest, welcher typischerweise für Thioredoxin durchgeführt wird (Holmgren, 1979c) und der HED-Transhydrogenasetest, welcher typischerweise für Glutaredoxin verwendet wird (Holmgren, 1985), eingesetzt. Zur Bestimmung der Tautomeraseaktivität wurde der von Rosengren et al. (1996) etablierte Assay verwendet.

Die Analyse der Aktivitätsdaten aus Tabelle 5 zeigt, dass die C-terminalen Deletionsmutanten MIF(1-104) und MIF(1-109) in den redoxbasierten Enzymassays aktiv sind. Im HED-Redoxetest ist die Aktivität zwar reduziert, aber immer noch signifikant vor-

handen. Im Insulin-Redox-Test sind beide Mutanten voll aktiv. Die verringerte Aktivität im HED-Assay ist vermutlich auf kleine Konformationsänderungen in den Mutanten zurückzuführen, da sie im analogen Insulin-Reduktionsassay voll aktiv sind. Es ist jedoch auch nicht ganz auszuschließen, dass die C-terminalen Mutanten über veränderte Redoxpotenziale verfügen, die zu den unterschiedlichen Redoxaktivitäten führen. Der C-Terminus scheint jedoch für die Oxidoreduktaseaktivität von MIF keine Bedeutung zu besitzen. Obwohl beide Mutanten laut CD-Messungen und nach den *Crosslinking*-Experimenten strukturell weitgehend intakt sind, haben beide ihre enzymatische Tautomeraseaktivität vollständig verloren. Dies erscheint auf den ersten Blick überraschend, da die Tautomeraseaktivität am N-Terminus lokalisiert zu sein scheint (Stamps et al., 1998; Swope et al., 1998a). Aus den Röntgenstrukturdaten von MIF ergibt sich jedoch, dass sich der C-Terminus räumlich in der Nähe des N-terminalen Endes von MIF befindet. Von verschiedenen Autoren wurde deshalb vorgeschlagen, dass der C-Terminus zur Bildung einer Substratbindungstasche beitragen könnte und deshalb für die N-terminalen Enzymaktivitäten eine Rolle spielen könnte (Suzuki et al., 1996b; Sugimoto et al., 1999; Taylor et al., 1999). Die Aktivitätsdaten der beiden C-terminalen Mutanten scheinen diese Spekulation zu bestätigen.

Die Bedeutung des N-Terminus für die Tautomeraseaktivität wird durch die Austauschmutanten P1AMIF und die N-terminale Deletionsmutante MIF(2-114) bestätigt. Beide Mutanten sind in den Redoxassays aktiv, haben aber ihre Tautomeraseaktivität vollständig verloren. Die um vier Aminosäuren verkürzte Mutante MIF(4-114) ist überraschenderweise im HED-Redox-Test vollständig inaktiv, während sie im Insulin-Test voll aktiv ist. Somit scheinen die N-terminalen Aminosäuren und hier im Besonderen das N-terminale Prolin für die HED-Redoxaktivität von Bedeutung zu sein, während die Insulinreduktion völlig unabhängig von N-Terminus zu sein scheint. Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf der verschiedenen Größe der Substrate. Im Falle kleinmolekularer Substrate wie HED könnte somit spekuliert werden, dass diese unter Beteiligung des N-Terminus oder an diesem selbst gebunden werden und durch das CXXC-Zentrum reduziert werden.

Die Redoxaktivitäten von MIF wurden ursprünglich über das Vorhandensein des zentralen CXXC-Motivs gefunden. Die Mutanten C56SMIF und C59SMIF, bei denen jeweils eines der beiden Cysteine dieser CXXC-Region ausgetauscht ist, weisen stark reduzierte oder nahezu nicht mehr vorhandene Redoxaktivitäten auf. Die C56SMIF-Mutante zeigt jedoch in den Redoxassays eine signifikant vorhandene Teilaktivität. Innerhalb des CXXC-Motivs scheint somit das Cystein 59 für die enzym-

tische Redoxaktivität von MIF bedeutender zu sein. Für die redoxaktiven Enzyme Glutaredoxin und PDI wurde vorgeschlagen, dass bestimmte Redoxreaktionen über einen Monothiolmechanismus katalysiert sein könnten (Holmgren, 1985; Lundström-Ljung und Holmgren, 1995; Wunderlich et al., 1995; Ruoppolo et al., 1997). Für MIF könnte ein solcher Monothiolmechanismus zumindest teilweise eine Bedeutung haben (Kleemann et al., 1998a; Kleemann et al., 1998b). Beide CXXC-Mutanten sind im Tautomeraseassay erwartungsgemäß voll aktiv. Die CXXC-Region spielt daher wohl keine Rolle für die Tautomeraseaktivität von MIF.

In der Austauschmutante C80SMIF, in der das dritte Cystein in MIF, welches nicht Teil des CXXC-Motivs ist, ausgetauscht wurde, zeigt sich eine Redoxaktivität, die gegenüber dem Wildtyp nur leicht reduziert ist. Dieses Cystein spielt also erwartungsgemäß keine Rolle bei den untersuchten Redoxaktivitäten von MIF. Die Tautomeraseaktivität dieser Mutante ist zwar stark reduziert, aber immer noch signifikant vorhanden. Ein mechanistischer Zusammenhang dieses Cysteins mit der Tautomeraseaktivität ist noch völlig ungeklärt. Möglicherweise beruht diese Reduzierung der Aktivität auch auf Konformationseffekten.

Um die Bedeutung der verschiedenen Molekülregionen von MIF für die immunologische Aktivität zu untersuchen, mussten zuerst MIF-spezifische Assays entwickelt werden. Die Entwicklung von aussagekräftigen Bioassays für MIF war lange Zeit problematisch. Erst die Verfügbarkeit von rekombinantem MIF ermöglichte die Untersuchung der Wirkung von MIF auf Immunzellen und damit auch die Entwicklung von MIF-spezifischen Assays. Es stellte sich heraus, dass möglicherweise zwei verschiedenartige MIF-Aktivitäten zu existieren scheinen. Zum einen eine proinflammatorische Wirkung, wie zum Beispiel die Aktivierung der Ausschüttung von TNF- α und NO (Calandra et al., 1994; Bernhagen et al., 1994c; Calandra et al., 1995; Jüttner et al., 1998). Diese Effekte treten typischerweise bei MIF-Konzentrationen von 100 nM bis 10 μ M auf. Zum anderen wirkt MIF, zum Beispiel im Rahmen des Glucocorticoid-*Overriding* und der Insulin-Sekretion, regulatorisch (Calandra und Bucala, 1996; Waeber et al., 1997; Waeber et al., 1999). Diese Effekte treten typischerweise bei MIF-Konzentrationen in einem Bereich von 100 pM bis 100 nM auf.

Die immunologische Aktivität der MIF-Mutanten wurde im *Leishmania-Killing-Assay* und im Glucocorticoid-*Overriding-Assay* untersucht. Der *Leishmania-Killing-Assay* beruht auf der Aktivierung von Makrophagen, so dass es zu einer verstärkten Eliminierung des intrazellulären Parasiten *Leishmania major* kommt (Jüttner et al., 1998). Durch Versuche mit NO-Synthetase-Inhibitoren und Anti-TNF- α -Antikörpern

wurde gezeigt, dass diese leishmanizide Wirkung NO- und TNF- α -abhängig ist. Die physiologische Relevanz dieses Assays wird durch den Befund untermauert, dass in den Lymphknoten von Balb/c- und C57BL/6-Mäusen nach Leishmanieninfektion die Expression der MIF-mRNA induziert wird (Jüttner et al., 1998).

Als Ergänzung und Ersatz für den Leishmanientest sollte im Rahmen dieser Arbeit ein zweiter MIF-spezifischer Assay entwickelt werden. Zur Beurteilung der immunologischen Aktivität der MIF-Mutanten wurde deshalb der Glucocorticoid-*Overriding*-Assay verwendet. Versuche, die MIF-Ausschüttung durch Glucocorticoide zu hemmen, führten schon früh zu dem überraschenden Befund, dass MIF die Fähigkeit besitzt, die immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung der Glucocorticoide zu überschreiben. Dieser antagonistische Effekt wurde anhand der Ausschüttung der Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-8 aus LPS-stimulierten Makrophagen nachgewiesen (Calandra et al., 1995). Auf diesem Befund basierend wurde ein MIF-spezifischer *Overriding*-Assay entwickelt. In diesem Assay wird die immunsuppressive Wirkung des Glucocorticoids Dexamethason auf LPS-stimulierte Makrophagen durch MIF aufgehoben. Der in diesem Test beobachtete MIF-Effekt tritt schon bei sehr niedrigen Konzentrationen im nanomolaren Bereich auf. Es handelt sich also um einen Effekt, der bei für Zytokine typischen Konzentrationen auftritt. Die physiologische Bedeutung des Glucocorticoid-*Overriding* konnte im Mausmodell des septischen Schocks aufgezeigt werden (Calandra und Bucala, 1996).

Die C-terminalen Deletionsmutanten MIF(1-104) und MIF(1-109) sind sowohl im *Overriding*-Test als auch im *Leishmania-Killing*-Assay in ihrer Aktivität deutlich reduziert beziehungsweise komplett inaktiv. Da diese Mutanten im Insulin-Redox-assay nahezu voll aktiv sind, scheint der C-Terminus nicht für die Oxidoreduktaseaktivität, aber wohl für die immunologische Aktivität von MIF erforderlich zu sein.

Die N-terminalen Deletionsmutanten MIF(2-114) und MIF(4-114) sowie die Austauschmutante P1AMIF zeigen nahezu volle oder sogar erhöhte Aktivität im *Overriding*-Assay. Auch Bendrat et al. (1997) finden für die zu P1AMIF analoge Mutante P1SMIF eine volle Glucocorticoid-*Overriding*-Aktivität. In Übereinstimmung mit diesen Daten finden Hermanowski-Vosatka et al. (1999) für Mutanten, in denen das N-terminale Prolin gegen Serin oder Phenylalanin ausgetauscht ist, in einem Migrationsassay ebenfalls volle wildtypartige Aktivität. Diese beiden Mutanten weisen eine deutlich verringerte beziehungsweise keine Tautomeraseaktivität auf. Da auch P1AMIF und MIF(2-114) keine Tautomeraseaktivität mehr aufweisen, lässt sich wohl

sagen, dass die enzymatische Tautomeraseaktivität von MIF keine Rolle bei den Glucocorticoid- bzw. stressregulierten Immunfunktionen von MIF spielt.

Die physiologische Bedeutung der enzymatischen Tautomeraseaktivität von MIF bleibt damit immer noch ungeklärt. Als Beispiel für ein weiteres immunregulatorisches Protein, das sowohl enzymatische als auch biologische Aktivitäten aufweist, kann Cyclophilin, ein Cyclosporin A bindendes Protein, dienen. Neben seiner Rolle als Immunsuppressor besitzt es die Fähigkeit einer Peptidyl/Prolyl-Isomerase (Sherry et al., 1992) und reguliert über diese enzymatische Funktion vermutlich zelluläre Prozesse wie die Proteinfaltung (Fischer et al., 1998; Gothel und Marahiel, 1999). Es existieren Cyclosporin A-Analoga, die die enzymatische Aktivität von Cyclophilin inhibieren, die aber keine immunologische Aktivität besitzen. Auch hier konnte bisher noch kein Zusammenhang zwischen den biologischen und den enzymatischen Funktionen aufgezeigt werden.

Bei den Cystein-Austauschmutanten zeigt die Mutante C59S im Leishmanien-Assay praktisch keine Aktivität mehr. Ihre Aktivität im *Overriding*-Assay ist stark verringert. Die Mutante C56SMIF besitzt in beiden Assay zwar reduzierte, aber immer noch vorhandene Aktivitäten. Die Mutante C80SMIF ist in beiden Assay fast vollständig aktiv. Hierdurch wird eine Bedeutung der CXXC-Region und der damit verbundenen Oxidoreduktaseaktivität für die immunologischen Funktionen von MIF nahegelegt. Die partielle Aktivität von C56SMIF könnte auch hier durch das Vorhandensein von Monothiolmechanismen der Redoxkatalyse erklärt werden.

Insgesamt scheint die enzymatische Oxidoreduktase-Aktivität an den immunregulatorischen Effekten von MIF zumindest beteiligt zu sein. Die beobachteten Teilaktivitäten der Mutanten zeigen aber auch, dass möglicherweise weitere Mechanismen existieren.

4.5 MIF als Jab1-bindendes Protein

Seit der Entdeckung von MIF 1966 wurde weder ein Rezeptor noch ein Protein, das direkt *in vivo* mit MIF interagiert, gefunden. Da MIF in zahlreichen Untersuchungen als klassisches Zytokin definiert wurde, lag die Vermutung eines extrazellulären Bindungspartners für MIF nahe (Bernhagen et al., 1998). Da im Laufe der letzten Jahre jedoch zum einen trotz intensiver Suche kein solcher Bindungspartner gefunden wurde und es sich zum anderen herausstellte, dass MIF über enzymatische Funktionen verfügt, wurde auch die Möglichkeit einer intrazellulären Wirkung von MIF in

Betracht gezogen. Um solche intrazellulären Bindungspartner von MIF zu finden, wurde deshalb ein *Two-Hybrid-Screening* (Fields und Song, 1989) durchgeführt. Nach Nährstoffselektion und nach Austesten der β -Galaktosidaseaktivität konnten drei Klone isoliert werden. Einer dieser Klone enthielt fast die gesamte kodierende Sequenz von humanem Jab1. Die beiden anderen Klone enthielten die Sequenz von humanem MIF und bestätigten hierdurch, dass MIF zu Homo-Oligomerisierung fähig ist. Mittels Koimmunopräzipitationen und *Pull-Down-Experimenten* wurde *in vitro* nachgewiesen, dass rekombinantes humanes MIF tatsächlich mit rekombinantem Jab1 spezifisch interagiert (R. Kleemann, persönliche Mitteilung).

Jab1 ist ein 38 kDa großes Protein, das ursprünglich als Koaktivator der c-Jun und JunD Transkriptionsfaktoren entdeckt wurde (Claret et al., 1996). Jab1 gehört zur Familie der Mov34 Proteine (Asano et al., 1997; Hofmann und Bucher, 1998). Jab1 beeinflusst als Koaktivator die AP-1-abhängige Transkription (Claret et al., 1996). Mit AP-1 wird ein Transkriptionsfaktor bezeichnet, der aus Homo- oder Heterodimeren der c-Jun- (c-Jun, c-JunB und c-JunD) oder der c-Fos- (c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2) Familie zusammengesetzt ist (Angel und Karin, 1991; Kerppola und Curran, 1995). Die Expression der verschiedenen Untereinheiten von AP-1 wird im zeitlichen Verlauf des Zellzyklus und durch verschiedene Faktoren wie zellulären Stress, Strahlung, DNA-Beschädigungen oder Zytokine wie TNF- α und IFN- γ induziert und reguliert (Franza et al., 1988; Kyriakis, 1999). Die AP-1-Proteine binden an spezifische DNA-Abschnitte. Diese Sequenzen, die TREs (*tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) response elements*), finden sich in der regulatorischen Region von vielen Genen (Kerppola und Curran, 1995). Die Aktivierung von AP-1 durch c-Jun beinhaltet sowohl das Auftreten von erhöhten c-Jun-Leveln in der Zelle als auch die Phosphorylierung von Serinen in c-Jun durch JNK (*Jun N-terminal Kinase*) (Pulverer et al., 1991; Hibi et al., 1993; Treisman, 1995).

Um zu überprüfen, ob MIF durch die Bindung an Jab1 die AP-1-abhängige Transkription beeinflusst, wurde die AP-1-abhängige Transkription in 293T-Zellen bestimmt, die transient mit einem TRE-Luziferase-Reportergenkonstrukt transfiziert wurden. Rekombinantes, exogenes MIF hebt hierbei die durch kotransfiziertes Jab1 erhöhte AP-1-Reportergenaktivität fast vollständig auf (Abb. 16). Die zur Kontrolle des Zellstatus durchgeführten Westernblots auf das mittransfizierte EGFP zeigen, dass Einflüsse durch verschiedene Transfektionseffizienzen oder unterschiedliche Zellkonditionen auf die Reportergenaktivität auszuschließen sind. Im Westernblot war Jab1 nur in den Ansätzen nachzuweisen, die mit dem Jab1-Plasmid transfiziert wurden (Abb. 17). Die AP-1-Transkription wird unter anderem auch von Zytokinen

wie TNF- α induziert (Brenner et al., 1989). MIF ist in der Lage, diese Induktion schon ab einer Konzentration von 1 nM signifikant zu reduzieren (Abb. 18). Bei einer Konzentration von 1 μ M MIF ist die Induktion vollständig unterdrückt. Interessanterweise hat die Mutante C59SMIF, der die enzymatische Oxidoreduktaseaktivität fehlt, keinen inhibitorischen Effekt. Die enzymatische Redoxaktivität von MIF scheint nach diesen Daten für die Inhibierung der TNF-Induktion der AP-1-Transkription notwendig zu sein. Diese Daten befinden sich auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass zum einen Jab1 JNK aktiviert, und dass zum anderen MIF die Jab1- und TNF-vermittelte JNK-Aktivierung inhibiert (A. Hausser, persönliche Mitteilung).

Die Modifikation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Redox-Reaktionen ist schon in einigen anderen Fällen beschrieben. So verändert das Zytokin Thioredoxin, das ebenfalls über enzymatische Fähigkeiten verfügt, die DNA-Bindungsfähigkeit von NF- κ B *in vitro* (Hayashi et al., 1993). Hierbei spielen möglicherweise Cysteine in NF- κ B eine Rolle, welche die DNA-Bindung von NF- κ B beeinflussen könnten. In ähnlicher Weise wird die DNA-bindende Aktivität von AP-1 durch das DNA-Reparatur-enzym Redox Faktor 1 (Ref-1) beeinflusst (Xanthoudakis et al., 1992). Ref-1 seinerseits wird durch eine ganze Reihe von redoxaktiven Proteinen beeinflusst, unter denen sich auch Thioredoxin befindet (Sen und Packer, 1996; Hirota et al., 1997).

Neben Zytokinen induziert auch UV-Strahlung die AP-1-abhängige Transkription (Woodgett et al., 1994). Um den Einfluss von MIF auf diesen Induktionsweg zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit MIF vorinkubiert und anschließend mit UV-Strahlung behandelt. Schon ab einer Konzentration von 1 pM hebt MIF die UV-induzierte Aktivität des TRE-Reportergens nahezu vollständig auf. Bei einer MIF-Konzentration von 1 μ M ist diese Aufhebung vollständig. Es ist bekannt, dass die UV-Stimulation der AP-1-abhängigen Transkription auf mindestens zwei Wegen durch die Kinasen der JNK-Familie erfolgt. Zum einen werden Serine in der Aktivierungsdomäne von c-Jun phosphoryliert und zum anderen erhöht JNK die Expression der Fos-Proteine durch die Aktivierung von Elk-1 und SAP-1 (Hibi et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995; Janknecht und Hunter, 1997).

Über mögliche Zusammenhänge der MIF/Jab1-Interaktion mit den bekannten immunologischen Wirkungen von MIF kann zur Zeit nur spekuliert werden. So wird schon lange vermutet, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielen könnte (Lanahan et al., 1992; Wistow et al., 1993). Die Interaktion von MIF mit Jab1 könnte die molekulare Grundlage für diese Rolle darstellen. Jab1 wurde unter anderem in COP9-Signalsom-Komplexen, für die der Name *JAB1-containing*

Signalosome vorgeschlagen wurde, identifiziert (Seeger et al., 1998). MIF könnte die signalosom-spezifischen JNK und andere Kinasen in ihrer Aktivität beeinflussen. Interessanterweise wurden von Scheinman et al. (1995) die Existenz eines komplexen regulatorischen Netzwerks, in dem NF- κ B, AP-1 und Glucocorticoide eine Rolle bei der Modulation der Genexpression spielen, vorgeschlagen. Einige der Effekte von MIF, wie zum Beispiel das Glucocorticoid-*Overriding*, könnten im Rahmen dieses Netzwerks erklärt werden. Darüber hinaus wurde kürzlich von Mitchell et al. gefunden, dass MIF die Erk1/2-Kinaseaktivität in Fibroblasten aktiviert (Mitchell et al., 1999). Von Erk1/2 ist bekannt, dass sie über die Phosphorylierung von c-Jun zu einer Verringerung der AP-1-abhängigen Transkription führen (Karin, 1995).

Die Identifizierung von Jab1 als MIF-Bindungspartner zeigt eine mögliche molekulare Grundlage für die immunologischen Wirkungen von MIF auf. Durch die intrazelluläre, direkte Interaktion mit diesem Transkriptions-Koaktivator könnte MIF regulatorische Wege in der Zelle modulieren.

Literatur

- Abe R., Shimizu T., Ohkawara A. und Nishihira J. (2000). Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1500**, 1-9.
- Amiri P., Locksley R.M., Parslow T.G., Sadick M., Rector E., Ritter D. und McKerrow J.H. (1992). Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604-607.
- Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra R.J., Rahmsdorf H.J., Jonat C., Herrlich P. und Karin M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739.
- Angel P. und Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R. und Martinou J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Apte R.S., Sinha D., Mayhew E., Wistow G.J. und Niederkorn J.Y. (1998). Cutting Edge - Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Inhibiting Nk Cell Activity and Preserving Immune Privilege. *J. Immunol.* **160**, 5693-5696.
- Arcuri F., Cintonino M., Vatti R., Carducci A., Liberatori S. und Paulesu L. (1999). Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. *Biol. Reprod.* **60**, 1299-1303.
- Arenberg D.A., Kunkel S.L., Polverini P.J., Glass M., Burdick M.D. und Strieter R.M. (1996). Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 2792-2802.
- Asano K., Vornlocher H.P., Richter-Cook N.J., Merrick W.C., Hinnebusch A.G. und Hershey J.W. (1997). Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *J. Biol. Chem.* **272**, 27042-27052.
- Aslund F., Berndt K.D. und Holmgren A. (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* **272**, 30780-30786.

- Bacher M., Metz C.N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M., Gemsa D., Donnelly T. und Bucala R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7849-7854.
- Bacher M., Meinhardt A., Lan H.Y., Mu W., Metz C.N., Chesney J.A., Calandra T., Gemsa D., Donnelly T., Atkins R. und Bucala R. (1997). Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol.* **15**, 235-246.
- Baines M.G., Duclos A.J., Anteckla E. und Haddad E.K. (1997). Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**, 471-477.
- Bakhiet M., Olsson T., Mhlanga J., Buscher P., Lycke N., van der Meide P.H. und Kristensson K. (1996). Human and rodent interferon-gamma as a growth factor for *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1359-1364.
- Baldwin E.T., Weber I.T., St. Charles R., Xuan J.C., Appella E., Yamada M., Matsushima K., Edwards B.F., Clore G.M., Gronenborn A.M. und Wlodawer A. (1991). Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 502-506.
- Banner D.W., A D.A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H. und Lesslauer W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.
- Bendrat K., Alabed Y., Callaway D.J.E., Peng T., Calandra T., Metz C.N. und Bucala R. (1997). Biochemical and nutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* **36**, 15356-15362.
- Bernhagen J., Calandra T., Mitchell R.A., Martin S.B., Tracey K.J., Voelter W., Manogue K.R., Cerami A. und Bucala R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756-759.
- Bernhagen J. (1994a). Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF): Entdeckung, Klonierung, Aufreinigung und Charakterisierung eines neuen, neuroendokrinen Zytokins. Doktorarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Bernhagen J., Calandra T., Cerami A. und Bucala R. (1994b). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a neuroendocrine mediator of endotoxemia. *Trends Microbiol.* **2**, 198-201.
- Bernhagen J., Mitchell R.A., Calandra T., Voelter W., Cerami A. und Bucala R. (1994c). Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration Inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* **33**, 14144-14155.

- Bernhagen J., Calandra T. und Bucala R. (1995). The emerging role of MIF in septic shock and infection. *Biotherapy* **8**, 123-127.
- Bernhagen J., Bacher M., Calandra T., Metz C.N., Doty S.B., Donnelly T. und Bucala R. (1996). An essential role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* **183**, 277-282.
- Bernhagen J., Calandra T. und Bucala R. (1998). Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J. Mol. Med.* **76**, 151-161.
- Bernhagen J., Sappeler G., Demirdelen B., Melms A. und Vujovic G. (1999). Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Multiple Sclerosis (MS). Beim DGfI Spring Meeting, Stuttgart, Germany
- Bilwes A., Rees B., Moras D., Menez R. und Menez A. (1994). X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.* **239**, 122-136.
- Blocki F.A., Ellis L.B. und Wackett L.B. (1993). MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs. *Protein Sci.* **2**, 2095-2102.
- Bloom B. und Bennett B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82.
- Bozza M., Satoskar A.R., Lin G., Lu B., Humbles A.A., Gerard C. und 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. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-256.
- Brahms S. und Brahms J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **138**, 149-178.
- Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A.L. und Sigler P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586.
- Brenner D.A., O'Hara M., Angel P., Chojkier M. und Karin M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* **337**, 661-663.
- Burrows S.D., Doyle M.L., Murphy K.P., Franklin S.G., White J.R., Brooks I., McNulty D.E., Scott M.O., Knutson J.R., Porter D. und et al. (1994). Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry* **33**, 12741-12745.

- Calandra T., Bernhagen J., Mitchell R.A. und 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., Bernhagen J., Metz C.N., Spiegel L.A., Bacher M., Donnelly T., Cerami A. und Bucala R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68-71.
- Calandra T. und Bucala R. (1996). Macrophage migration inhibitory factor - a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J. Inflamm.* **47**, 39-51.
- Calandra T., Spiegel L.A., Metz C.N. und 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.
- Calandra T., Echtenacher B., Roy D.L., Pugin J., Metz C.N., L. H., Heumann D., D. M., Bucala R. und Glauser M.P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* **6**, 164-170.
- Chen H.X., Centola M., Altschul S.F. und Metzger H. (1998). Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1657-1668.
- Chesney J., Metz C., Bacher M., Peng T., Meinhardt A. und 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.
- Claret F.X., Hibi M., Dhut S., Toda T. und Karin M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* **383**, 453-457.
- Clore G.M., Appella E., Yamada M., Matsushima K. und Gronenborn A.M. (1990). Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* **29**, 1689-1696.
- David J.R., Al-Askari S., Lawrence H.S. und Thomas L. (1964). Antigens can stimulate sensitized lymphocytes in culture to produce macrophage migration inhibitory factors. *J. Immunol.* **93**, 264-273.
- 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.
- David J.R. (1993). Corrections, Immunology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 12056.

- Donnelly S.C., Haslett C., Reid P.T., Grant I.S., Wallace W.A.H., Metz C.N., Bruce L.J. und Bucala R. (1997). Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat. Med.* **3**, 320-323.
- Esumi N., Budarf M., Ciccarelli L., Sellinger B., Kozak C.A. und Wistow G. (1998). Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. *Mamm. Genome* **9**, 753-757.
- Fields S. und Song O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fischer G., Tradler T. und Zarnt T. (1998). The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* **426**, 17-20.
- Franza B.R., Jr., Rauscher F.J.d., Josephs S.F. und Curran T. (1988). The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* **239**, 1150-1153.
- Fu Z., Hu Y., Markham G.D. und Takusagawa F. (1996). Flexible loop in the structure of S-adenosylmethionine synthetase crystallized in the tetragonal modification. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **13**, 727-739.
- Galat A., Riviere S., Bouet F. und Menez A. (1994). A diversified family of 12-kDa proteins with a high amino acid sequence similarity to macrophage migration-inhibitory factor (MIF). *Eur. J. Biochem.* **224**, 417-421.
- George M. und Vaughan J.H. (1962). Migration of mononuclear cells in capillary tubes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 514-521.
- Gibrat J.F., Madej T. und Bryant S.H. (1996). Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 377-385.
- Gilbert H.F. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* **251**, 8-28.
- Gothel S.F. und Marahiel M.A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423-436.
- Grzesiek S., Dobeli H., Gentz R., Garotta G., Labhardt A.M. und Bax A. (1992). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry* **31**, 8180-8190.
- Hajipour G., Johnson W., Dauben P.D., Stolowich N.J. und Whitman C.P. (1993). Chemical and enzymatic ketonization of 5-(carboxymethyl)-2-hydroxymuconate. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3533-3542.
- Hayashi T., Ueno Y. und Okamoto T. (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11380-11388.

- Hermanowski-Vosatka A., Mundt S.S., Ayala J.M., Goyal S., Hanlon W.A., Czerwinski R.M., Wright S.D. und Whitman C.P. (1999). Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry* **38**, 12841-128419.
- Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A. und Karin M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**, 2135-2148.
- Hirota K., Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K. und Yodoi J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3633-3638.
- Hofmann K. und Bucher P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 204-205.
- Holmgren A. (1979a). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides - Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3664-3671.
- Holmgren A. (1979b). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides - Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **254**, 3672-3678.
- Holmgren A. (1979c). Thioredoxin catalyses the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydroipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**, 9627-9632.
- Holmgren A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 237-271.
- Holmgren A. (1985). Glutaredoxin from *Escherichia coli* and calf thymus. *Methods Enzymol.* **113**, 525-528.
- Hudson J.D., Shoaibi M.A., Maestro R., Carnero A., Hannon G.J. und Beach D.H. (1999). A Proinflammatory Cytokine Inhibits p53 Tumor Suppressor Activity. *J. Exp. Med.* **190**, 1375-1382.
- Hunt J.S. und Robertson S.A. (1996). Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J. Reprod. Immunol.* **32**, 1-25.
- Ikigai H., Akatsuka A., Tsujiyama H., Nakae T. und Shimamura T. (1996). Mechanism of membrane damage by El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* **64**, 2968-2973.
- Janknecht R. und Hunter T. (1997). Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *Embo J.* **16**, 1620-1627.
- Johannes F.J., Horn J., Link G., Haas E., Siemienski K., Wajant H. und Pfizenmaier K. (1998). Protein kinase C μ downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB-dependent protective genes. *Eur. J. Biochem.* **257**, 47-54.

- Jüttner S., Bernhagen J., Metz C., Röllinghoff M., Bucala R. und Gessner A. (1998). Macrophage migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J. Immunol.* **161**, 2383-2390.
- Kapurniotu A., Bernhagen J., Greenfield N., Al-Abed Y., Teichberg S., Frank R.W., Voelter W. und Bucala R. (1998). Contribution of advanced glycosylation to the amyloidogenicity of islet amyloid polypeptide. *Eur. J. Biochem.* **251**, 208-216.
- Karin M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.
- Kato Y., Muto T., Tomura T., Tsumura H., Watarai H., Mikayama T., Ishizaka K. und 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.
- Kerppola T. und Curran T. (1995). Transcription. Zen and the art of Fos and Jun. *Nature* **373**, 199-200.
- Kitaichi N., Matsuda A., Kotake S., Namba K., Tagawa Y., Sasamoto Y., Ogasawara K., Iwabuchi K., Ono K., Matsuda H. und Nishihira J. (2000). Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis with anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies. *Curr. Eye Res.* **20**, 109-114.
- Kleemann R., Kapurniotu A., Frank R.W., Gessner A., Mischke R., Flieger O., Jüttner S., Brunner H. und 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., Mischke R., Kapurniotu A., Brunner H. und J. B. (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.
- Kleemann R., Kapurniotu A., Mischke R., Held J. und Bernhagen J. (1999). Characterization of catalytic center mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison with C81S MIF. *Eur. J. Biochem.* **261**, 753-766.
- Kleffel B., Garavito R.M., Baumeister W. und Rosenbusch J.P. (1985). Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *E. coli* outer membranes. *EMBO J.* **4**, 1589-1592.
- Knox W.E. (1955). p-Hydroxyphenylpyruvate enol-keto tautomerase. *Methods Enzymol.* **2**, 289-292.
- Koradi R., Billeter M. und Wuthrich K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55, 29-32.

- Kraulis P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
- Kyriakis J.M. (1999). Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr.* **7**, 217-231.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lan H.Y., Mu W., Yang N., Meinhardt A., Nikolic-Paterson D.J., Ng Y.Y., Bacher M., Atkins R.C. und 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.
- Lan H.Y., Bacher M., Yang N., Mu W., Nikolic-Paterson D.J., Metz C.N., Meinhardt A., Bucala R. und Atkins R.C. (1997a). 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., Yang N.S., Metz C., Mu W., Song Q., Nikolicpaterson D.J., Bacher M., Bucala R. und Atkins R.C. (1997b). TNF- α up-regulates renal MIF expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Mol. Med.* **3**, 136-144.
- Lanahan A., Williams J.B., Sanders L.K. und Nathans D. (1992). Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3919-3929.
- Leech M., Metz C., Santos L., Peng T., Holdsworth S.R., Bucala R. und Morand E.F. (1998). Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Evolution of Rat Adjuvant Arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 910-917.
- Leech M., Metz C., Hall P., Hutchinson P., Gianis K., Smith M., Weedon H., Holdsworth S.R., Bucala R. und Morand E.F. (1999). Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis - Evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* **42**, 1601-1608.
- Liu Y.C., Nakano T., Elly C. und Ishizaka K. (1994). Requirement of posttranslational modifications for the generation of biologic activity of glycosylation-inhibiting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11227-11231.
- Lundström-Ljung J. und Holmgren A. (1995). Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.* **270**, 7822-7828.
- Luo Y., Umegaki H., Wang X., Abe R. und Roth G.S. (1998). Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 3756-3764.
- MacMicking J., Xie Q.W. und Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-350.

- Madej T., Gibrat J.F. und Bryant S.H. (1995). Threading a database of protein cores. *Proteins* **23**, 356-369.
- Makita H., Nishimura M., Miyamoto K., Nakano T., Tanino Y., Hirokawa J., Nishihira J. und Kawakami Y. (1998). Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 573-579.
- Matsuda A., Kotake S., Tagawa Y., Matsuda H. und Nishihira J. (1996). Detection and immunolocalization of macrophage migration inhibitory factor in rat iris and ciliary epithelium. *Immunol. Lett.* **53**, 1-5.
- Matsuda A., Tagawa Y., Matsuda H. und Nishihira J. (1996). Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Lett.* **385**, 225-228.
- Matsuda A., Tagawa Y., Yoshida K., Matsuda H. und Nishihira J. (1997). Expression of macrophage migration inhibitory factor in rat retina and its immunohistochemical localization. *J. Neuroimmunol.* **77**, 85-90.
- Matsunaga J., Sinha D., Pannell L., Santis C., Solano F., Wistow G.J. und Hearing V.J. (1999a). Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J. Biol. Chem.* **274**, 3268-3271.
- Matsunaga J., Sinha D., Solano F., Santis C., Wistow G. und Hearing V. (1999b). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) - its role in catecholamine metabolism. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **45**, 1035-1040.
- Mattson G., Conklin E., Desai S., Nielander G., Savage M.D. und Morgensen S. (1993). A practical approach to crosslinking. *Mol. Biol. Rep.* **17**, 167-183.
- McInnes A. und Rennick D.M. (1988). Interleukin-4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.* **167**, 598-611.
- Meinhardt A., Bacher M., McFarlane J.R., Metz C.N., Seitz J., Hedger M.P., deKretser D.M. und Bucala R. (1996). Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* **137**, 5090-5095.
- Meinhardt A., Bacher M., Metz C., Bucala R., Wreford N., Lan H., Atkins R. und Hedger M. (1998). Local Regulation of Macrophage Subsets in the Adult Rat Testis: Examination of the Roles of the Seminiferous Tubules, Testosterone, and Macrophage-Migration Inhibitory Factor. *Biol. Reprod.* **59**, 371-378.
- Merritt E.A. und Bacon D.J. (1997). Raster3D Photorealistic Molecular Graphics. *Methods Enzymol.* **277**, 505-524.

- Mikayama T., Nakano T., Gomi H., Nakagawa Y., Liu Y.-C., Sato M., Iwamatsu A., Ishii Y., Weiser W.Y. und Ishizaka K. (1993). Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding glycosylation-inhibiting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10056-10060.
- Mikulowska A., Metz C.N., Bucala R. und 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., Jüttner S., Kleemann R., Brunner H. und Bernhagen J. (1997). Structure activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus. *FEBS Lett.* **414**, 226-232.
- Mitamura Y., Takeuchi S., Matsuda A., Tagawa Y., Mizue Y. und Nishihira J. (1999). Macrophage migration inhibitory factor levels in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **128**, 763-765.
- Mitchell R.A., Metz C.N., Peng T. und 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**, 18100-18106.
- Mozetic-Francky B., Cotic V., Ritonja A., Zerovnik E. und Francky A. (1997). High-yield expression and purification of recombinant human macrophage migration inhibitory factor. *Protein Expr. Purif.* **9**, 115-124.
- Mühlhahn P., Bernhagen J., Czisch M., Georgescu J., Renner C., Ross A., Bucala R. und 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. und David J.R. (1971). Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.* **133**, 1356-1376.
- Nathan C.F., Remold H.G. und David J.R. (1973). Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage function. *J. Exp. Med.* **137**, 275-288.
- Nishihira J., Kuriyama T., Sakai M., Nishi S., Ohki S. und Hikichi K. (1995). The structure and physicochemical properties of rat liver macrophage migration inhibitory factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 159-162.
- Nishino T., Bernhagen J., Shiiki H., Calandra T., Dohi K. und 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.
- Offen D., Ziv I., Gorodin S., Barzilai A., Malik Z. und Melamed E. (1995). Dopamine-induced programmed cell death in mouse thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1268**, 171-177.

- Offen D., Ziv I., Sternin H., Melamed E. und Hochman A. (1996). Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **141**, 32-39.
- Offen D., Hochman A., Gorodin S., Ziv I., Shirvan A., Barzilai A. und Melamed E. (1999). Oxidative stress and neuroprotection in Parkinson's disease: implications from studies on dopamine-induced apoptosis. *Adv. Neurol.* **80**, 265-269.
- Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T., Connolly R.J. und Dinarello C.A. (1988). Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.* **81**, 1162-1172.
- Onodera S., Suzuki K., Matsuno T., Kaneda K., Takagi M. und Nishihira J. (1997). Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* **92**, 131-137.
- Pace C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Paolini J.F., Willard D., Conslor T., Luther M. und Krangel M.S. (1994). The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J. Immunol.* **153**, 2704-2717.
- Pastrana D.V., Raghavan N., Fitzgerald P., Eisinger S.W., Metz C., Bucala R., Schleimer R.P., Bickel C. und Scott A.L. (1998). Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect. Immun.* **66**, 5955-5963.
- Pennock J.L., Behnke J.M., Bickle Q.D., Devaney E., Grecis R.K., Isaac R.E., Joshua G.W.P., Selkirk M.E., Zhang Y. und Meyer D.J. (1998). Rapid purification and characterization of L-dopachrome-methyl ester tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. *Biochem. J.* **335**, 495-498.
- Perczel A., Park K. und Fasman G.D. (1992a). Deconvolution of the circular dichroism spectra of proteins: the circular dichroism spectra of the antiparallel β -sheet in proteins. *Proteins* **13**, 57-69.
- Perczel A., Park K. und Fasman G.D. (1992b). Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal. Biochem.* **203**, 83-93.
- Provencher S.W. und Glöckner J. (1981). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.

- Puig A., Lyles M.M., Noiva R. und 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.
- Pulverer B.J., Kyriakis J.M., Avruch J., Nikolakaki E. und Woodgett J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-4.
- Rajaratnam K., Sykes B.D., Kay C.M., Dewald B., Geiser T., Baggiolini M. und Clark-Lewis I. (1994). Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* **264**, 90-92.
- Rajaratnam K., Clark-Lewis I. und Sykes B.D. (1995). ¹H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8. *Biochemistry* **34**, 12983-12990.
- Rich A.R. und Lewis M.R. (1932). Migration of neutrophils and macrophages. *Bull. John Hopkins Hosp.* **50**, 115-131.
- Rosengren E., Bucala R., Åman P., Jacobsson L., Odh G., Metz C.N. und Rorsman H. (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol. Med.* **2**, 143-149.
- Rosengren E., Aman P., Thelin S., Hansson C., Ahlfors S., Björk P., Jacobsson L. und Rorsman H. (1997). The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett.* **417**, 85-88.
- Rossi A.G., Haslett C., Hirani N., Greening A.P., Rahman I., Metz C.N., Bucala R. und Donnelly S.C. (1998). Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J. Clin. Invest.* **101**, 2869-2874.
- Ruoppolo M., Lundström-Ljung J., Talamo F., Pucci P. und Marino G. (1997). Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathion-dependent folding of ribonuclease A. *Biochemistry* **36**, 12259-12267.
- Sakaue S., Nishihira J., Hirokawa J., Yoshimura H., Honda T., Aoki K., Tagami S. und Kawakami Y. (1999). Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression by Glucose and Insulin in Adipocytes In Vitro. *Mol. Med.* **5**, 361-371.
- Scheinman R.I., Gualberto A., Jewell C.M., Cidlowski J.A. und Baldwin A.S., Jr. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 943-953.
- Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M. und Reed J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5113-5118.
- Schmidt-Supprian M. (1998). Protein C structure and anti-inflammatory mechanisms. Diplomarbeit, Universität Tübingen.

- Seeger M., Kraft R., Ferrell K., Bech-Otschir D., Dumdey R., Schade R., Gordon C., Naumann M. und Dubiel W. (1998). A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *Faseb J.* **12**, 469-478.
- Sen C.K. und Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* **10**, 709-720.
- Sherry B., Yarlett N., Strupp A. und Cerami A. (1992). Identification of cyclophilin as a pro-inflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 3511-3515.
- Shimizu T., Abe R., Ohkawara A., Mizue Y. und Nishihira J. (1997). Macrophage Migration Inhibitory Factor Is an Essential Immunoregulatory Cytokine in Atopic Dermatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 173-178.
- Shimizu T., Abe R., Ohkawara A. und Nishihira J. (1999). Ultraviolet B radiation upregulates the production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 210-215.
- Siedler F., Rudolph-Böhner S., Doi M., Musiol H.J. und Moroder L. (1993). Redox potentials of active-site bis(cysteiny) fragments of thiol-protein oxidoreductases. *Biochemistry* **32**, 7488-7495.
- Siedler F., Quarzago D., Rudolph-Bohner S. und Moroder L. (1994). Redox-active bis-cysteiny peptides. II. Comparative study on the sequence-dependent tendency for disulfide loop formation. *Biopolymers* **34**, 1563-1572.
- Smith R.A. und Baglioni C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* **262**, 6951-6954.
- Sreerama N. und Woody R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32-44.
- Sreerama N. und Woody R.W. (1994). Poly(pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroism analysis. *Biochemistry* **33**, 10022-10025.
- Stamps S.L., Fitzgerald M.C. und Whitman C.P. (1998). Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* **37**, 10195-10202.
- Stauffer K.A., Page M.G., Hardmeyer A., Keller T.A. und Pauptit R.A. (1990). Crystallization and preliminary X-ray characterization of maltoporin from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **211**, 297-299.
- Stein B., Rahmsdorf H.J., Steffen A., Litfin M. und Herrlich P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5169-5181.

- Subramanya H.S., Roper D.I., Dauter Z., Dodson E.J., Davies G.J., Wilson K.S. und Wigley D.B. (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., Toshifumi M., Mikayama T. und Ishizaka K. (1997). High-affinity binding of bioactive glycosylation-inhibiting factor to antigen-primed T cells and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5278-5283.
- Sugie K., Tomura T., Takakura K., Kawano T., Taniguchi M., Grey H.M. und Ishizaka K. (1999). Target cells for an immunosuppressive cytokine, glycosylation-inhibiting factor. *Int. Immunol.* **11**, 1149-1156.
- Sugimoto H., Suzuki M., Nakagawa A., Tanaka I., Fujinaga M. und Nishihira J. (1995). Crystallization of rat liver macrophage migration inhibitory factor for MAD analysis. *J. Struct. Biol.* **115**, 331-334.
- Sugimoto H., Suzuki M., Nakagawa A., Tanaka I. und Nishihira J. (1996). Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.* **389**, 145-148.
- Sugimoto H., Taniguchi M., Nakagawa A., Tanaka I., Suzuki M. und Nishihira J. (1999). Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 angstrom resolution. *Biochemistry* **38**, 3268-3279.
- Sun H.W., Bernhagen J., Bucala R. und Lolis E. (1996a). Crystal structure at 2.6 Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5191-5196.
- Sun H.W., Swope M.D., Cinquina C., Bedarkar S., Bernhagen J., Bucala R. und Lolis E. (1996b). The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng.* **9**, 631-635.
- Suzuki M., Murata E., Tanaka I., Nishihira J. und Sakai M. (1994). Crystallization and a preliminary X-ray diffraction study of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocytes. *J. Mol. Biol.* **235**, 1141-1143.
- Suzuki H., Kanagawa H. und 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. und Sakai M. (1996b). Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nature Struct. Biol.* **3**, 259-266.
- Swope M.D., Sun H.W., Blake P.R. und Lolis E. (1998a). Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J.* **1**, 3534-3541.

- Swope M.D., Sun H.W., Klockow B., Blake P. und Lolis E. (1998b). Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and S-hexylglutathione. *J. Biol. Chem.* **273**, 14877-14884.
- Swope M.D. und Lolis E. (1999). Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme? *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 1-32.
- Takahashi A., Iwabuchi K., Suzuki M., Ogasawara K., Nishihira J. und Onoe K. (1999). Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol. Immunol.* **43**, 61-67.
- Takahashi N. und Creighton T.E. (1996). On the reactivity and ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **35**, 8342-8353.
- Takusagawa F., Kamitori S., Misaki S. und Markham G.D. (1996). Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.* **271**, 136-147.
- Taniguchi Y., Yorioka N., Yamashita K., Masaki T. und Yamakido M. (1998). Macrophage migration inhibitory factor in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **54**, 2245-2246.
- Taylor A.B., Johnson W.H., Jr., Czerwinski R.M., Li H.S., Hackert M.L. und Whitman C.P. (1999). Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor complexed with (E)-2-fluoro-p-hydroxycinnamate at 1.8 Å resolution: implications for enzymatic catalysis and inhibition. *Biochemistry* **38**, 7444-7452.
- Thurman G.B., Braude I.A., Gray P.W., Oldham R.K. und Stevenson H.C. (1985). MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J. Immunol.* **134**, 305-309.
- Tomura T., Watarai H., Honma N., Sato M., Iwamatsu A., Kato Y., Kuroki R., Nakano T., Mikayama T. und Ishizaka K. (1999). Immunosuppressive activities of recombinant glycosylation-inhibiting factor mutants. *J. Immunol.* **162**, 195-202.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tracey K.J., Fong Y., Hesse D.G., Manogue K.R., Lee A.T., Kuo G.C., Lowry S.F. und Cerami A. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* **330**, 662-664.
- Tracey K.J. (1992). TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. *Clin. Nutr.* **11**, 1-11.
- Treisman R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *Embo J.* **14**, 4905-4913.

- Veenstra R.D., Wang H.Z., Beyer E.C., Ramanan S.V. und Brink P.R. (1994). Connexin37 forms high conductance gap junction channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities. *Biophys. J.* **66**, 1915-1928.
- Venyaminov S.Y., Baikalov I.A., Shen Z.M., Wu C.C. und Yang J.T. (1993). Circular dichroism analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.* **214**, 17-24.
- Vieth M., Will A., Schröppel K., Röllinghoff M. und Gessner A. (1994). Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scan. J. Immunol.* **40**, 403-409.
- Vriend G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52-56.
- Wada S., Fujimoto S., Mizue Y. und Nishihira J. (1997). Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary - presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. *Biochemistry & Molecular Biology International* **41**, 805-814.
- Wada S., Kudo T., Kudo M., Sakuragi N., Hareyama H., Nishihira J. und Fujimoto S. (1999). Induction of macrophage migration inhibitory factor in human ovary by human chorionic gonadotrophin. *Hum. Reprod.* **14**, 395-399.
- 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. und Bucala R. (1997). Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4782-4787.
- Waeber G., Calandra T., Bonny C. und 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.
- Waelti E.R., Inaebnit S.P., Rast H.P., Hunziker T., Limat A., Braathen L.R. und Wiesmann U. (1992). Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 805-808.
- Walter M.R., Windsor W.T., Nagabhushan T.L., Lundell D.J., Lunn C.A., Zauodny P.J. und Narula S.K. (1995). Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* **376**, 230-235.
- Weiser W.Y., Greineder D.K., Remold H.G. und David J.R. (1981). Studies on human migration inhibitory factor: characterization of three molecular species. *J. Immunol.* **126**, 1958-1962.

- Weiser W.Y., Remold H.G., Lutz L.H. und David J.R. (1984). Dissociation of Human Interferon-Gamma-like Activity from Migration-Inhibitor Factor. *Cell. Immunol.* **88**, 109-122.
- Weiser W.Y., David J.R. und Remold H.G. (1985). Antigen-dependent heterogeneity of human migration inhibitory factor. *Cell. Immunol.* **93**, 532-540.
- Weiser W.Y., Temple D.M., Witek-Gianotti J.S., Remold H.G., Clark S.C. und David J.R. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding a human macrophage migration inhibition factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7522-7526.
- Weiser W.Y., Pozzi L.M., Titus R.G. und David J.R. (1992). Recombinant human migration inhibitory factor has adjuvant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8049-8052.
- Weiser W.Y., Pozzi L.M., Titus R.G. und David J.R. (1997). Recombinant human migration inhibitory factor has adjuvant activity (Retraction). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 351.
- Weitzman S.A. und Gordon L.I. (1990). Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* **76**, 655-663.
- Westermarck P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D.W., O'Brien T.D. und Johnson K.H. (1987). Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3881-3885.
- Whitman C.P., Hajipour G., Watson R.J., Johnson W.H., Bembenek M.E. und Stolowich N.J. (1992). Stereospecific ketonization of 2-hydroxymuconate by 4-oxalocrotonate tautomerase and 5-(carboxymethyl)-2-hydroxymuconate Isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10104-10110.
- Whitmarsh A.J., Shore P., Sharrocks A.D. und Davis R.J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**, 403-407.
- Wistow G.J., Shaughnessy M.P., Lee D.C., Hodin J. und Zelenka P.S. (1993). A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1271-1280.
- Wolfenden R., Andersson L., Cullis P. und Soutgate C. (1981). Affinities of amino acid side chains for solvent water. *Biochemistry* **20**, 849-855.
- Woodgett J.R., Pulverer B.J., Plyte S., Hughes K. und Nikolakaki E. (1994). Nuclear onco-protein targets of signal transduction pathways. *Pigment Cell. Res.* **7**, 96-100.
- Wunderlich M., Otto A., Maskos K., Mucke M., Seckler R. und Glockshuber R. (1995). Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* **247**, 28-33.

- Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y.C. und Curran T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J.* **11**, 3323-3335.
- Xiao B., Smerdon S.J., Jones D.H., Dodson G.G., Soneji Y., Aitken A. und Gamblin S.J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-191.
- Xu D.M., McSorley S.J., Tetley L., Chatfield S., Dougan G., Chan W.L., Satoskar A., David J.R. und Liew F.Y. (1998). Protective Effect On Leishmania Major Infection of Migration Inhibitory Factor, TNF-Alpha, and IFN-Gamma Administered Orally Via Attenuated Salmonella Typhimurium. *J. Immunol.* **160**, 1285-1289.
- Yang J.T., Wu C.S. und Martinez H.M. (1974). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* **130**, 208-269.
- Zapun A., Bardwell J.C.A. und Creighton T.E. (1993). The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* **32**, 5083-5092.
- Zeng F.Y., Weiser W.Y., Kratzin H., Stahl B., Karas M. und Gabius H.J. (1993). The major binding-protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage-migration inhibitory factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 74-80.
- Zhang M., Aman P., Grubb A., Panagopoulos I., Hindemith A., Rosengren E. und Rorsman H. (1995). Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. *FEBS Lett.* **373**, 203-206.
- Zschäbitz A., Gabius H.J., Zeng F.Y., Kunt T., Martens K.D., Koepf H., Fassbender H.G. und Stofft E. (1999). Detection of sarcolectin-specific receptors like the cytokine macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid nodules. *Histol. Histopathol.* **14**, 771-777.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Mischke R., Gessner A., Kapurniotu A., Jüttner S., Kleemann R., Brunner H. und Bernhagen J. (1997). Structure activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus. *FEBS Lett.* **414**, 226-232.

Kleemann R., Kapurniotu A., Frank R.W., Gessner A., Mischke R., Flieger O., Jüttner S., Brunner H. und Bernhagen J. (1998). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a thiol-protein oxidoreductase. *J. Mol. Biol.* **280**, 85-102.

Mischke R., Kleemann R., Brunner H. und Bernhagen J. (1998). Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* **427**, 85-90.

Kleemann R., Mischke R., Kapurniotu A., Brunner H. und Bernhagen J. (1998). 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.

Kleemann R., Kapurniotu A., Mischke R., Held J. und Bernhagen J. (1999). Characterization of catalytic center mutants of makrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison with C81S MIF. *Eur. J. Biochem.* **261**, 753-766.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.