

Die Rolle des Macrophage Migration Inhibitory Factor
im myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden:
Interaktion mit der Nitrit-Signaltransduktion

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Julia Sobierajski
aus
Geilenkirchen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Tienush Rassaf

Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat. Jürgen Bernhagen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2011

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Der Macrophage Migration Inhibitory Factor	1
1.1.1	Historisches	1
1.1.2	Struktur	1
1.1.3	Die Rezeptoren von MIF und aktivierte Signalwege	3
1.1.4	Die Rolle von MIF im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen.....	4
1.1.5	MIF während der myokardialen Ischämie/Reperfusion	5
1.2	Der Stickstoffmonoxid- und Nitrit-Stoffwechsel	6
1.2.1	Stickstoffmonoxid	6
1.2.2	Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid <i>in vivo</i>	6
1.2.3	S-Nitrosothiole	8
1.3	Der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden.....	9
1.3.1	Myokardiale Ischämie	9
1.3.2	Das myokardiale Reperfusionssyndrom	10
1.3.3	NO- und Nitrit-medierte Kardioprotektion während der Ischämie/Reperfusion	12
1.4	Zielsetzung	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien, Lösungen, Gase	15
2.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	16
2.3	Geräte	17
2.4	Software.....	18
2.5	Herstellung einer desoxygenierten Myoglobin-Lösung	18
2.6	Macrophage migration Inhibitory Factor.....	19
2.7	Bestimmung von S-Nitrosoverbindungen mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion.....	19
2.7.1	Prinzip der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion.....	19
2.7.2	Aufbau der reduktiven Chemilumineszenzdetektion	20
2.7.3	Untergruppen der Nitrosoverbindungen.....	20
2.7.4	Durchführung der Messung	21
2.8	Versuchstiere	21
2.9	<i>Ex vivo</i> Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion.....	22
2.9.1	Das isolierte perfundierte Herz nach Oscar Langendorff	22

2.9.2	Präparation der Herzen.....	23
2.9.3	Retrograde Perfusion.....	23
2.9.4	<i>Ex vivo</i> Protokoll der myokardialen Ischämie/Reperfusion	24
2.9.5	Färbung zur Charakterisierung der Area at Risk und des Infarktareals	24
2.9.6	Infarktgrößenmessung	26
2.10	<i>In vivo</i> Modell der myokardialen Ischämie/ Reperfusion	27
2.10.1	Operation	27
2.10.2	<i>In vivo</i> Protokoll der myokardialen Ischämie/Reperfusion.....	28
2.11	Charakterisierung des Effekts der Ischämie/Reperfusion anhand von Markern für oxidative Zellschädigung.....	28
2.11.1	Messung der Wasserstoffperoxid-Konzentration	28
2.11.2	Bestimmung der Aconitase-Aktivität	29
3.	Ergebnisse	31
3.1	S-Nitrosierung des Macrophage Migration Inhibitory Factor	31
3.1.1	S-Nitrosierung von MIF	31
3.1.2	Bestimmung von S-Nitrosoverbindungen.....	31
3.1.3	Berechnung der S-Nitrosierung	33
3.1.4	Kontrollen.....	33
3.1.5	Ergebnis der S-Nitrosierung von MIF.....	34
3.1.6	Identifikation der S-nitrosierten Cysteine	35
3.1.7	S-Nitrosierung mittels NO-Donoren	37
3.2	Ermittlung der maximal kardioprotektiven Nitritdosis <i>ex vivo</i>	37
3.3	Der Effekt der Inhibition von MIF in einem <i>in vivo</i> I/R Modell.....	39
3.3.1	Reduktion des myokardialen I/R-Schadens durch Nitrit.....	41
3.3.2	Effekt der Inhibition von MIF mittels anti-MIF-Antikörper	42
3.4	Mechanismus der Kardioprotektion: Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies	45
3.4.1	Bestimmung der Peroxidase-Aktivität von MIF bzw. MIF-SNO.....	45
3.4.2	Interaktion von MIF bzw. MIF-SNO mit der Wasserstoffperoxid- Konzentration <i>in vitro</i>	45
3.4.3	Die Aconitase-Aktivität als Parameter für oxidative Schädigung der Mitochondrien	47

4.	Diskussion.....	50
4.1	S-Nitrosierung des Cysteins 81 des Macrophage Migration Inhibitory Factor mittels der Nitritreduktasefunktion desoxygenierten Myoglobins	50
4.2	Die maximal kardioprotektive Nitrit-Dosis während der I/R	51
4.3	Verlust der Nitrit-medierten Kardioprotektion durch die Neutralisation von MIF	52
4.4	Mechanismus der Kardioprotektivität von MIF und Nitrit: Reduktion der oxidativen Proteinschädigung durch eine verringerte Radikalbildung	53
4.4.1	Peroxidase-Funktion und Scavenging von Wasserstoffperoxid	53
4.4.2	Interaktion mit der Aconitase-Aktivität.....	55
4.5	Ausblick	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis.....	58
7.	Danksagung	70
8.	Erklärung zur Datenaufbewahrung	71
9.	Lebenslauf.....	72

Liste der Abkürzungen

AAR	Area at Risk (ischämisches Gewebe)
Abb.	Abbildung
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
C57S	Cystein-57-Serin-Mutante
C60S	Cystein-60-Serin-Mutante
C81S	Cystein-81-Serin-Mutante
CALC	Cys57-Ala-Leu-Cys60
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsmarker)
CLD	Chemilumineszenzdetektion
CXCR	CXR-Rezeptor
desoxyHb	desoxygeniertes Hämoglobin
desoxyMb	desoxygeniertes Myoglobin
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (Elektronen-spinresonanz)
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
GPCR	G Protein-Coupled Receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GSNO	S-Nitrosoglutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HRP	Horse Reddish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Januskinase
LCA	Left Coronary Artery (A. coronaria sinistra, linke Koronararterie)
LDL	Low-Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linker Ventrikel

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
Mb	Myoglobin
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MIF-SNO	S-Nitroso-Macrophage Migration Inhibitory Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethyl-Maledine
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz)
$\text{NO}^{\cdot}$	Stickstoffmonoxid*
NO^{-}	Nitrosylanion
NO^{+}	Nitrosoniumion
NO_2^{-}	Nitrit
NO_3^{-}	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O_2^{-}	Superoxidanion
ONOO^{-}	Peroxynitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCI	Percutaneous Coronary Intervention (Perkutane Koronarintervention)
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
rMIF	rekombinanter Macrophage Migration Inhibitory Factor
RNNO	Nitrosamine
RSNO	S-Nitrosothiole
RXNO	Nitrosospezies
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)

SERCA2a	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a (Ca ²⁺ -ATPase-2a im sarkoplasmatischen Retikulum)
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
TNF α	Tumor Necrosis Factor α (Tumornekrosefaktor α)
TPOR	Thiolprotein-Oxidoreduktasen
TPx	Thioredoxin-Peroxidase
Trx	Thioredoxin
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
XOR	Xanthin-Oxidoreduktase

(*Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

1. Einleitung

1.1 Der Macrophage Migration Inhibitory Factor

1.1.1 Historisches

Der Macrophage Migration Inhibitory Factor wurde 1966 als eines der ersten Zytokine entdeckt. Die Bezeichnung „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ – kurz MIF – lässt sich darauf zurückführen, dass MIF als ein aus T-Zellen freigesetztes Zytokin angesehen wurde, dessen Ziel die Hemmung der zufälligen Migration von Makrophagen zu sein schien^{1,2}. Mittlerweile wurde erkannt, dass MIF gleichzeitig eine zielgerichtete Chemotaxis einleitet³. Außerdem wurde gezeigt, dass MIF weitere Funktionen der Makrophagen wie die Oberflächenadhäsion und Phagozytose aktiviert⁴.

Nach der Identifikation von MIF als Hormon der Adenohypophyse 1993 durch Bernhagen et al. konnte das Protein zum ersten Mal rekombinant hergestellt werden⁵. Makrophagen selbst wurden als Quelle von MIF identifiziert. Gleichzeitig wurde auch die Sekretion aus intrazellulären Speichern als Antwort auf pro-inflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- α und IFN- γ beschrieben⁶.

Im Jahr 1999 wurde eine MIF-defiziente Maus generiert, die sich phänotypisch normal entwickelte, erste *in vivo*-Untersuchungen ermöglichte und so die Rolle von MIF in verschiedenen pathophysiologischen Prozessen erkennen ließ⁷.

Es wurde festgestellt, dass MIF ubiquitär exprimiert wird, sowohl in Zellen des Immunsystems (T-Zellen und Makrophagen⁸) als auch in Zellen anderer Gewebe (Endothelzellen, glattmuskuläre Zellen⁸ und Kardiomyozyten⁹).

MIF stellt sich bis heute als ein Zytokin mit vielen unterschiedlichen Funktionen dar, das eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und Progression verschiedener Krankheitsbilder, wie z.B. der Atherosklerose und dem Myokardinfarkt, spielt¹⁰.

1.1.2 Struktur

MIF ist ein Protein, das aus 114 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 12,5 kDa besitzt.

Die Struktur von MIF wurde mittels Röntgenstrukturanalysen¹¹ und *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) Spektroskopie¹² aufgeklärt. Die Sekundärstruktur

1. Einleitung

des humanen MIF-Monomers wird durch zwei antiparallele α -Helices und sechs β -Stränge, von denen vier ein β -Faltblatt ergeben, gebildet. Während Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass MIF als Homotrimer (s. Abb. 1) vorliegt, das durch Wasserstoffbrücken und einen hydrophoben Kern stabilisiert wird, weisen NMR-Untersuchungen darauf hin, dass MIF als Dimer vorliegt.



Abb. 1: Dreidimensionale Struktur des MIF-Homotrimers

Es scheint bisher, dass MIF keine posttranslationalen Modifikationen erfährt und ohne N-terminale Signalsequenz translatiert wird, so dass ein spezieller intrazellulärer Signalweg zur Sekretion wahrscheinlich ist¹³.

Analysen der Aminosäuresequenz haben gezeigt, dass MIF eine konservierte Sequenz besitzt, die aus den Resten Cys57-Ala-Leu-Cys60 (CALC) besteht. Die beiden Cysteine (C57 und C60) in diesem Motiv gehen eine intramolekulare Disulfidbrückenbindung ein. Ähnlich wie andere Proteine, die ein solches CXXC-Motiv besitzen (Thioredoxin, Glutaredoxin oder die Protein-Disulfidisomerase), weist MIF eine Oxidoreduktase-Aktivität auf und gehört somit in die Familie der Thiolprotein-Oxidoreduktasen (TPOR)¹⁴. In Distanz zu diesem CALC-Motiv befindet sich an Position 81 das dritte Cystein von MIF, das keinen Einfluss auf die Aktivität als Oxidoreduktase besitzt¹⁵, dem aber eine Rolle in der Interaktion mit p53 zugesprochen wird¹⁶.

1. Einleitung

1.1.3 Die Rezeptoren von MIF und aktivierte Signalwege

Nachdem entdeckt wurde, dass MIF die Phosphorylierung und Aktivierung der *Extracellular-Signal-Regulated Kinases* (ERK1/2) Untergruppe der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) induziert, wurde nach einem spezifischen Oberflächenrezeptor für MIF gesucht. In Klonierungsversuchen konnte CD74, die invariante Kette des *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II), als Interaktionspartner identifiziert werden¹⁷. Wie MIF liegt auch CD74 als Homotrimer vor¹⁸. Da CD74 in der cytoplasmatischen Domäne kein Motiv für die Aktivierung von *second-messengern* besitzt, wurde die Existenz eines Interaktionspartners vermutet. So konnte man CD44 identifizieren¹⁹. Während CD74 die Bindung von MIF an die Zelloberfläche vermittelt, wird CD44 für die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges benötigt. Die Bindung von MIF an CD74 induziert die Phosphorylierung der intrazytoplasmatischen Domänen von CD74 und CD44, so dass die Src-Tyrosinkinase aktiviert wird und konsekutiv die Phosphorylierung der ERK1/2 möglich ist. Über diesen Rezeptorkomplex kann MIF über ERK1/2 auch die Aktivität von Jab1 und p53 regulieren. Damit steht dieser Signalweg sowohl für die Regulation des Wachstums und der Apoptose als auch für die Kontrolle des Zellzyklus²⁰.

Da nicht alle Zielzellen von MIF über CD74 verfügen (z.B. neutrophile Granulozyten), wurde nach weiteren MIF-Rezeptoren gesucht. In verschiedenen Rezeptorbindungsstudien identifizierte man MIF als *non-cognate* Ligand der Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4²¹. Über diese Rezeptoren vermittelt MIF die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen und die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Weiterhin wurde eine Kolo-kalisation von CD74 und CXCR2 festgestellt, die zu einer Verstärkung des MIF-Signals und zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) führt, welche den Calcium-Influx in die Zelle steigert¹⁰. In Zellen ohne CD74 zeigt MIF daher geringere Rekrutierungsfähigkeiten. Über die Bindung an die Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 vermittelt MIF somit die Migration und Chemotaxis verschiedener Zellen, die im Rahmen der Inflammation von Bedeutung sind.

Des Weiteren kann MIF über CXCR2 protektive Effekte auf residente Kardiomyozyten während der I/R ausüben und so den Myokardschaden reduzieren²².

1. Einleitung

1.1.4 Die Rolle von MIF im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen

MIF spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen. So kann man den Einfluss von MIF auf die Atherosklerose, die Aneurysmabildung, die Neoangiogenese, die myokardialen Dysfunktion und die myokardiale I/R nachweisen¹⁰.

Die endotheliale Dysfunktion gilt als Frühereignis in der Entstehung der Atherosklerose. Jeder Schritt der Pathogenese entspricht einer Stufe eines chronischen Inflamationsprozesses. Durch die erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle kommt es zur Migration von Leukozyten und mononukleären Zellen in die Subintima. Die Ablagerung mononukleärer Zellen ist das erste morphologische Kennzeichen einer Inflammation^{10,23}. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Chemokine eine wichtige Rolle in der Progression der Atherosklerose spielen²⁴. Dabei kann der Einfluss, den MIF auf die Atherosklerose ausübt, weiter differenziert und bezüglich einer therapeutischen Möglichkeit diskutiert werden²⁵. Während der Progression der Pathogenese der Atherosklerose kommt es zur Verdickung der Arterienintima²⁶. In Korrelation dazu steigt die Expression von MIF an⁸. Als Stimuli hierfür entdeckte man verschiedene pro-atherogene Faktoren (*Low-Density Lipoprotein* (LDL), CD40 Ligand und Angiotensin II), die die Expression von MIF sowohl in Zellen der glatten Muskulatur, als auch in Endothelzellen, mononukleären Zellen und Makrophagen induzieren^{27,28,29}. Mittels einer Blockade von MIF in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MIF zu einer Verlangsamung des Atheroskleroseprozesses führt, was durch eine verminderte Rekrutierung von Makrophagen und Expression inflammatorischer Mediatoren erklärt werden kann²⁴.

Das Aortenaneurysma gilt als eine der Folgen der Atherosklerose. Ähnlich wie in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques konnte die Steigerung der Expression von MIF auch in stabilen und rupturierten Aortenaneurysmen gezeigt werden¹⁰. Die Konzentration von MIF im Serum scheint mit der Größe des Aneurysmas anzusteigen^{10,30,31}.

Nach einem Myokardinfarkt ist die Neoangiogenese ein wichtiger Prozess der Wiederherstellung der Perfusion. In Studien zum Wachstum von Tumoren konnte MIF eine pro-angiogene Rolle zugesprochen werden^{32,33,34,35}. MIF fördert in *in vitro*-Untersuchungen die Neoangiogenese über seine Rezeptoren

1. Einleitung

CXCR2 und CXCR4³⁶. In Tierversuchen wurde zudem nachgewiesen, dass die Neovaskularisation im I/R- oder Hind Limb-Modell durch embryonale endotheliale Progenitorzellen vor allem über die Expression von MIF vermittelt wird^{10,37}.

Die Kardiomyopathie als Konsequenz des septischen Schocks ist hauptsächlich für die hohe Mortalität der Sepsis-Patienten verantwortlich. Es wurde erkannt, dass die Neutralisierung von MIF durch anti-MIF-Antikörper die Überlebensrate der Sepsis-Patienten stark verbessert, indem es zu einem signifikanten Anstieg der Überlebensfaktoren (z.B. Bcl-2, Bax, phospho-Akt), zu einem gesteigerten Überleben der Kardiomyozyten und zu einer verbesserten Pumpfunktion führt^{38,39}. Vor kurzem konnte ein MIF-Haplotyp identifiziert werden, der zu einem erhöhten Mortalitätsrisiko der Sepsis beiträgt⁴⁰. Daher wird MIF eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sepsis zugesprochen und gerät zunehmend in den Fokus der experimentellen Therapie der Sepsis⁴¹.

1.1.5 MIF während der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Die Steigerung der MIF-Expression konnte auch in Kardiomyozyten und Makrophagen nach akuter myokardialer Ischämie in einem Rattenmodell nachgewiesen werden⁹. In einer klinischen Studie an Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, war ebenfalls eine erhöhte MIF-Konzentration im Serum detektierbar⁴².

Als Induktoren der MIF-Sekretion wurden sowohl Hypoxie als auch oxidativer Stress - ein wichtiger pathophysiologischer Parameter des Ischämie-/Reperfusionsschadens - identifiziert^{10,42}.

In einer Untersuchung von Miller et al. konnte die Rolle von MIF während der Ischämie/Reperfusion (I/R) weiter geklärt werden. In einem Mausmodell der myokardialen I/R konnte gezeigt werden, dass das Infarktareal MIF-defizienter Mäuse signifikant größer ist als das der Mäuse der Kontrollgruppe⁴³. MIF wird nach der Ischämie aus dem Herzen frei gesetzt und aktiviert über CD74 die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK). Die AMPK gilt als wichtige Kinase in der Pathophysiologie der I/R, da sie über verschiedene Signalwege die ATP-Produktion sowie den Energieverbrauch limitieren kann und somit den zellulären Energiehaushalt reguliert. Im Herzen stimuliert die AMPK die Aktivität der 6-Phosphofructo-2-Kinase und somit die Glykolyse⁴⁴, steigert die GLUT4-

1. Einleitung

Translokation⁴⁵ sowie die Aufnahme von Glukose⁴⁶ in die Zelle und reduziert somit den I/R-Schaden und die Apoptose⁴⁷.

1.2 Der Stickstoffmonoxid- und Nitrit-Stoffwechsel

1.2.1 Stickstoffmonoxid

Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet. Die NOS wandeln die Aminosäure L-Arginin mittels verschiedener Kofaktoren in Stickstoffmonoxid und Citrullin um⁴⁸. L-Arginin wird sowohl aus der Nahrung als auch aus dem Harnstoffzyklus gewonnen. Für die Aktivität der NOS ist die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs als Kofaktor Voraussetzung⁴⁹. Man unterscheidet verschiedene Isoformen der NOS: neben den konstitutiv aktiven Formen der neuronalen und endothelialen NOS sowie einer induzierbaren NOS wird die Aktivität einer NOS in Erythrozyten diskutiert^{50,51}.

Das NO-Radikal kann entweder mit molekularem Sauerstoff zum Nitrosylanion (NO^-) reduziert oder zum Nitrosoniumion (NO^+) oxidiert werden oder zu höheren Stickoxiden (NO_2 oder N_2O_3) weiter reagieren. Diese Stickoxide können mit Thiolen Nitrosothiole (RSNO) oder mit Aminen Nitrosamine (RNNO) bilden. Außerdem können sie auch zu Nitrit (NO_2^-) oder Nitrat (NO_3^-) hydrolysieren⁵². Nitrit bildet dabei das Hauptoxidaionsprodukt und wird dann zu Nitrat weiter oxidiert. Man kann daher bei nüchternen Probanden die Konzentration des Nitrits im Plasma als Maß für die Aktivität der NOS ansehen⁵³.

Weiterhin kann NO durch die Reaktion mit oxygenierten Hämproteinen zu Nitrat oxidiert werden. Dabei reagiert NO mit Oxyhämoglobin (oxyHb) oder Oxy-myoglobin (oxyMb) unter Bildung von Methämoglobin bzw. -myoglobin zu Nitrat. Das Methämoglobin bzw. -myoglobin wird anschließend durch die Methämoglobin(-myoglobin)reduktase wieder in den sauerstoffbindungsfähigen Zustand überführt⁵².

1.2.2 Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid *in vivo*

Nitrit wurde lange Zeit als inertes Oxidaionsprodukt des Stickstoffmonoxidstoffwechsels angesehen. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass mehrere unterschiedliche Systeme existieren, in denen Nitrit zu Stickstoffmonoxid umgewandelt wird.

1. Einleitung

Es existieren verschiedene Mechanismen zur Reduktion von Nitrit zu NO. Die Reduktion von Nitrit zu NO kann durch die Xanthin-Oxidase^{54,55}, welche vor allem im Endothel von Koronargefäßen lokalisiert ist^{56,57}, und die Cytochrom c-Oxidase⁵⁸ erfolgen. Bei der azidischen Disproportionierung reagiert Nitrit bei niedrigem pH-Wert zu salpetriger Säure, die dann wiederum zu NO und anderen Stickoxiden zerfällt. Dieser Mechanismus ist vor allem im Magen präsent. Im Magen herrschen mit einem pH-Wert von ca. 2 ideale Bedingungen für diese Reaktion, die dort der Abtötung luminaler Bakterien und der Aufrechterhaltung der Schleimproduktion dient^{59,60}.

Zu den weiteren Mechanismen der Nitritreduktion zählt die Nitritreduktase-Funktion von Hämproteinen. Es wurde bereits beschrieben, dass desoxygeniertes Hämoglobin (desoxyHb) in Regionen mit niedriger Sauerstoffsättigung Nitrit zu NO reduziert und somit eine Art Recycling-Mechanismus darstellt^{61,62}. Diese bereits 1937 von Brooks⁶³ und 1981 von Doyle et al.⁶⁴ charakterisierte Reaktion legte nahe, dass auch das Muskelprotein Myoglobin unter Hypoxie Nitrit zu NO reduziert. So konnte 2007 eine Reduktaseaktivität für desoxygeniertes Myoglobin (desoxyMb) nachgewiesen werden^{65,66}. Gleichzeitig wurde deutlich, dass dieses mittels desoxyMb generierte NO eine funktionelle Relevanz besitzt: Unter hypoxischen Bedingungen wird der myokardiale Energiestatus herabgesetzt, so dass weniger Sauerstoff verbraucht wird und die kardiale Funktion herunterreguliert wird^{65,66}. Damit spielt Myoglobin eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von NO während der Hypoxie. In Abhängigkeit vom Sauerstoff-Partialdruck wandelt sich die Funktion des Myoglobins von einem „NO-Fänger“ unter Normoxie zu einem „NO-Bildner“ unter Hypoxie (s. Abb. 2).

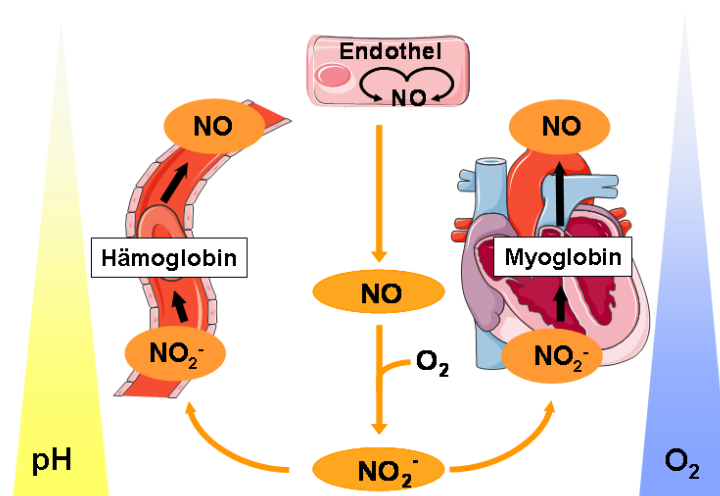


Abb. 2: Reduktion von Nitrit zu NO mittels der Nitritreduktasefunktionen von desoxyHb und desoxyMb unter hypoxischen Bedingungen.

1. Einleitung

Hendgen-Cotta et al. beschrieben diesen Mechanismus der Nitritreduktion via desoxyMb als den für den kardioprotektiven Effekt von Nitrit entscheidenden Mechanismus während der Ischämie/Reperfusion⁶⁷.

1.2.3 S-Nitrosothiole

S-Nitrosothiole (RSNO) sind Produkte der Reaktion zwischen Stickstoffmonoxid und den SH-Gruppen der Cysteinen. RSNO entstehen, wenn Nitrosoniumionen (NO^+) oder Peroxynitrit (ONOO^-) vorliegen oder unter anaeroben Bedingungen ein direkter Kontakt zwischen den Thiolen der Proteine und NO in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors stattfindet⁶⁸. Auch eine Transnitrosierungsreaktion durch andere RSNO ist möglich⁶⁹.

Es wird vermutet, dass die RSNO eine Transportform für NO darstellen, die die Modulation verschiedener zellulärer Signalwege durch NO über weite Strecken nicht nur parakrin, sondern auch endokrin ermöglicht. Den S-Nitrosothiolen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, wie die Kontrolle der Sauerstoffversorgung des Gewebes, die Regulation von Transkriptionsfaktoren, Enzymen, Membranrezeptoren und Ionenkanälen. Demnach ist die S-Nitrosierung eine Reaktion, die ubiquitär in allen Geweben anzutreffen und nicht rein auf die Zirkulation beschränkt ist⁷⁰.

In Studien zur I/R wurde demonstriert, dass die Konzentration an RSNO durch oxidativen Stress ansteigt. Dabei wurde hauptsächlich S-nitrosiertes Albumin identifiziert, so dass dieses als eine Transportform für NO angesehen wird⁷¹. Während der Hypoxie kommt es vor allem in den ersten fünf Minuten in allen Organen zu einem starken Abfall der Nitrit-Konzentration während die Konzentration an RSNO konsekutiv ansteigt⁷⁰. Die Generation von RSNO führte in *in vivo*-Untersuchungen zu einer lang andauernden Dilatation der Arterien, so dass auch hier geschlussfolgert werden kann, dass RSNO in der Zirkulation des Menschen als Transportform für NO fungieren⁷².

In einer *in vivo*-Studie zur myokardialen I/R konnte ein weiterer Effekt der S-Nitrosierung demonstriert werden. Während der Reperfusion kommt es zu einer S-Nitrosierung der Thiole des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, so dass der I/R-Schaden durch die verringerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies reduziert wird⁷³. In einem tierexperimentellen Ansatz zu den Auswirkungen nitrosativen Stresses konnten verschiedene S-nitrosierte Proteine aus dem Myokard bestimmt werden. Dabei handelte es sich vor allem um

1. Einleitung

Peroxiredoxine, denen hauptsächlich eine Rolle als Peroxidase zugeschrieben wird und die in die Wasserstoffperoxid-vermittelte Signaltransduktion involviert sind⁷⁴. Ein Protein der Peroxiredoxin-Familie, PAG, wurde bereits als Interaktionspartner von MIF identifiziert⁷⁵. Ebenso wie MIF besitzen auch die Peroxiredoxine eine Oxidoreduktase-Aktivität und weisen darüber hinaus weitere strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu MIF auf⁷⁶.

1.3 Der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden

Der Myokardinfarkt als Konsequenz der koronaren Herzkrankheit (KHK) ist weltweit die führende Todesursache. Jährlich sterben daran 7,2 Millionen Menschen (WHO 2004).

Der Myokardinfarkt ist gekennzeichnet durch eine Ischämie des myokardialen Gewebes aufgrund der Okklusion einer Koronararterie. Die frühe Reperfusion des ischämischen Areals mittels Thrombolyse-therapie oder mittels Perkutaner Koronarintervention (*Percutaneous Coronary Intervention*, PCI) ist die Therapie der Wahl⁷⁷. Dabei kann die Reperfusion des ischämischen Myokards jedoch zu einer weiteren Gewebsschädigung führen, so dass die positiven Effekte der Reperfusionstherapie verringert werden. Dies wurde 1960 von Jennings et al. erstmals als myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschaden beschrieben⁷⁸.

Trotz des steigenden Interesses an der Erforschung dieses Phänomens findet der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) aufgrund fehlender Interventionsmaßnahmen in den heutigen Empfehlungen zur Therapie des akuten Myokardinfarkts keinerlei Beachtung. Der myokardiale I/R-Schaden stellt daher einen sehr wichtigen Bereich medizinischer Forschung dar.

1.3.1 Myokardiale Ischämie

Die Unterbrechung der Blutzufuhr durch die Okklusion einer oder mehrerer Koronararterien führt durch ein Ungleichgewicht von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf zu einer Unterversorgung myokardialen Gewebes, der so genannten myokardialen Ischämie. Es kommt dabei zur Akkumulation von toxischen Metaboliten und zu einem verringerten Angebot an anabolen Substraten⁷⁹. Der Sauerstoffmangel führt zu einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung und zu einem raschen Abbau energiereicher Phosphate wie Adenosin-triphosphat (ATP) und Kreatinphosphat sowie der Glykogenreserven mit conse-

1. Einleitung

kutivem Sistieren der mechanischen Kontraktion⁷⁹. Gleichzeitig bedingt die Hypoxie eine Umschaltung von aerober zu anaerober Glykolyse mit nachfolgender Laktatproduktion. Aus der Laktatproduktion und der ATP-Hydrolyse resultiert eine fortschreitende Abnahme des pH-Wertes, so dass der Na^+/H^+ -Antiporter aktiviert wird⁸⁰. Der Mangel an energiereichen Phosphaten begründet die verringerte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase sowie der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums. Daraus resultiert ein vermindertes Membranpotential, eine mitochondriale Kalziumeinlagerung und eine zytosolische Natrium- und Kalziumanreicherung. Ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kann verschiedene Enzyme (Phospholipasen, Proteasen und Nukleasen) aktivieren, die dann über den Abbau ihrer Substratmoleküle zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und zu strukturellen Schäden beitragen^{81,82}. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine Zellschwellung mit Trennung der Plasmamembran vom Fibrillennetzwerk, eine Schwellung der Mitochondrien sowie eine Aggregation des Kernchromatins. Durch den Abbau von AMP kommt es zu einer Akkumulation von Adenosin und Inosin sowie einem konsekutiven Verlust der bei Reoxygenierung für die ATP-Produktion benötigten Purinnukleotide bei verlängerter Ischämie^{83,84}. Der progressive Abbau zu Hypoxanthin und Xanthin in den Endothelzellen führt bei Reoxygenierung zur Bildung von Superoxidanionen⁸⁵. Die als Konsequenz sichtbaren pathomorphologischen Veränderungen wie Zell- und Mitochondrienschwellung sind bei kürzerer Ischämie reversibel. Bei verlängerter schwerer Ischämie kommt es zu irreversiblen Schäden u.a. in Form sarkolemmaler Membranrupturen^{86,87}.

1.3.2 Das myokardiale Reperfusionssyndrom

Die Reperfusion eines ischämischen Areals kann dazu führen, dass bisher intakte Kardiomyozyten durch die Reperfusion sterben. Es wird angenommen, dass die Reperfusion selbst für 50% der endgültigen Infarktgröße verantwortlich ist⁸⁸.

Die histologische Charakterisierung des Reperfusionssyndrom ist gekennzeichnet durch die Bildung von Kontraktionsbandnekrosen, Zellschwellung, Kalzifizierung der Mitochondrien sowie Rupturen sarkolemmaler Membranen⁷⁸. Der myokardiale Schaden durch die Reperfusion kann in vier Gruppen eingeteilt werden⁸⁸: Zunächst wurde das myokardiale „*stunning*“, die nach der Reperfu-

1. Einleitung

sion trotz des Fehlens irreversibler Schädigungen und trotz des fast normalen koronaren Flusses verbleibende mechanische Dysfunktion des Myokards, beschrieben⁸⁹. Weiterhin existiert das „*no-reflow phenomenon*“, das Unvermögen, eine vorher ischämische Region wegen der Zellschwellung zu reperfundieren als Faktor der kardialen Dysfunktion nach der Reperfusion⁹⁰. Als dritter Faktor gilt das Auftreten von Arrhythmien, die jedoch effektiv behandelt werden können⁹¹. Als letzter Faktor wird der letale Reperfusionsschaden diskutiert. Er gilt als unabhängiger Mediator des Unterganges von Kardiomyozyten und wird vor allem durch drei Faktoren vermittelt: durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, den Anstieg der Calcium-Konzentration und die Verstärkung des Inflamationsprozesses⁸⁸.

Eine geringe Konzentration freier Radikale ist für die zelluläre Homöostase, Mitose, Differenzierung und Signaltransduktion erforderlich⁹². Eine stark erhöhte Radikalbildung triggert jedoch die Schädigungen durch die Reperfusion. Die unter physiologischen Bedingungen zur Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies existierenden enzymatischen Entgiftungssysteme sind wegen des Energiesubstratmangels nach der Hypoxie nicht voll funktionsfähig. Zudem ist ihre Kapazität durch die erhöhte Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen überschritten⁹³.

Der plötzliche Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt zu einer weiteren Schädigung der sarkolemmalen Membran und zu einer Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums, so dass es zum Tod von Kardiomyozyten kommen kann⁹⁴.

Inflammatorische Prozesse rücken bei der Betrachtung von Myokardschäden aufgrund von Ischämie und Reperfusion zunehmend in den Fokus. Durch eine signifikante Ischämie kommt es zur Einleitung eines Inflamationsprozesses, der als Voraussetzung für die Heilung und Bildung einer Narbe im Myokard gilt. Die Reperfusion verstärkt und beschleunigt diese Inflammation^{95,96}. Zu Beginn führen die Schäden am Sarkolemm zur Aktivierung der Komplement-Kaskade⁹⁷, wodurch ein Reiz zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen entsteht. Die rekrutierten Monozyten differenzieren mit ihrer Migration in das myokardiale Gewebe zu Makrophagen, welche wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren frei setzen⁹⁸. Die durch den Komplement-Faktor C5a angeregte Degranulation von Mastzellen⁹⁷ führt wie die nekrotischen Kardiomyozyten zur Freisetzung von *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α ,

1. Einleitung

so dass eine Zytokinkaskade in Gang gesetzt wird^{99,100}. Interleukin (IL)-8/ und *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1/CCL2, die vor allem im Rahmen der Reperfusion induziert werden, sind hauptsächlich für die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten verantwortlich. Neutrophile Granulozyten migrieren innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Ischämie in die Infarktzone und innerhalb von 24 Stunden in das myokardiale Gewebe.

Zur Gegenregulation der Inflammation dient das aus T-Helferzellen und Monozyten frei gesetzte IL-10. IL-10 unterdrückt die Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- α , IL-6 und IL-8 und gilt als Regulator der Funktion der Makrophagen¹⁰¹.

1.3.3 NO- und Nitrit-medierte Kardioprotektion während der Ischämie/Reperfusion

Durch viele verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Stickstoffmonoxid den myokardialen, zerebralen und hepatischen I/R-Schaden reduziert^{57,92,102,103}. Sowohl die Überexpression der eNOS¹⁰⁴ und die Gabe von NO-Donoren¹⁰⁵ als auch die NO-Gas-Therapie haben sich als kardioprotektiv erwiesen¹⁰⁶. Dieser Effekt kann durch einige der zahlreichen Funktionen des Stickstoffmonoxids zumindest teilweise erklärt werden. NO agiert als Vasodilatator im Myokard, so dass das infarzierte Areal schnell wieder perfundiert werden kann. Außerdem kommt es durch die NO-vermittelte Hemmung der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Aggregation von Thrombozyten zu einer verringerten Okklusionsrate der Koronargefäße. Weiterhin wird der durch die Mitochondrien verursachte Schaden durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette verringert. Der NO-medierte Effekt wird durch die Hemmung der Apoptose komplettiert¹⁰⁶. Dieser kardioprotektive Effekt kann nur dann durch NO vermittelt werden, wenn die NO-Konzentration im physiologischen (nanomolaren) Bereich liegt. Eine darüber hinaus gehende NO-Konzentration führt zu gegenteiligen Effekten und fördert die Nekrose und die Apoptose¹⁰⁷.

Viele verschiedene Studien haben versucht, die zytoprotektiven Signalwege des Stickstoffmonoxids aufzuklären. Dabei scheint die Aktivierung mehrere unterschiedlicher Signalwege, die Kardioprotektion vermitteln, und die Interaktion mit verschiedenen Transportern und Kanälen für die Kardioprotektion verantwortlich zu sein¹⁰⁶. Zu den aktivierten Signalwegen zählt die

1. Einleitung

Proteinkinase C (PKC), der ERK1/2-Signalweg und die Interaktion mit den Januskinasen (JAKs)¹⁰⁷.

Weiterhin führt die Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu kardioprotektiven Effekten. Stickstoffmonoxid vermittelt dies durch den Anstieg der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase-2a im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA2a) bei gleichzeitige Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch eine S-Nitrosylierung dieser. Die Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration verringert den in der Reperfusion durch Ca^{2+} vermittelten Schaden^{108,109,110}. Eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) führt zur Aktivierung ATP-abhängiger K^{+} -Kanäle der Mitochondrien (mito K_{ATP} Kanäle), so dass mehr K^{+} in die Mitochondrien transportiert werden kann¹¹¹. Weiterhin wirkt die S-Nitrosierung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zytoprotektiv, da es zu einer verringerten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt¹¹².

Während der Ischämie verfügen die betroffenen Zellen nur über geringe Mengen Sauerstoff. Da Sauerstoff jedoch Kofaktor der NOS ist, scheint das während der I/R gebildete NO nicht aus der enzymatischen Umwandlung durch die NOS hervorzugehen.

Es konnte gezeigt werden, dass auch die Applikation von Nitrit während der I/R zu einer Verringerung des Infarktareals führt^{57,102}. Aufgrund dessen wurde die Reduktion von Nitrit als Quelle für das kardioprotektive Stickstoffmonoxid durch die azidische Disproportionierung, die XOR, das Cytochrom C und die verschiedenen Hämproteine diskutiert (s.o.). Direkte Wirkungen von Nitrit konnten jedoch ebenso nachgewiesen werden¹¹³.

Nitrit repräsentiert einen großen zirkulierenden bioaktiven NO-Pool¹¹⁴. Gleichzeitig ist Nitrit auch in mikromolarer Konzentration im Myokard präsent¹¹⁵. Der Nitritgehalt des Myokards, welcher in direkter Abhängigkeit zur Aktivität der NO-Synthase steht, korreliert mit dem O_2 -Gehalt des Gewebes und nimmt bei Sauerstoffmangel ab⁷⁰. In neuen Studien konnte dies durch das sauerstoffspeichernde Muskelprotein Myoglobin erklärt werden. Myoglobin ist hauptsächlich für die Reduktion des Nitrts zu NO verantwortlich, wenn es wie in der Ischämie und Hypoxie in seiner desoxygenierten Form (desoxyMb) vorliegt⁶⁵. In einem *in vivo* I/R-Modell mit Myoglobin-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die durch desoxyMb vermittelte Reduktion von Nitrit zu NO den Hauptmechanismus der Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung des Nitrts darstellt⁶⁷. Ein Teil der zytoprotektiven Effekte kann durch die Wirkung von NO auf den Kom-

1. Einleitung

plex I der Atmungskette erklärt werden. Die Applikation von Nitrit und die anschließende Reduktion zu NO führt zur S-Nitrosierung des Komplex I und damit zur Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, der mitochondrialen Permeabilitätstransition und der Freisetzung von Cytochrom c⁷³.

In welchem Zusammenhang die antioxidative Wirkung von MIF und der protektive Einfluss von Nitrit beim myokardialen I/R-Schaden zueinander stehen, ist nicht bekannt.

1.4 Zielsetzung

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Nitritdosis einen zytoprotektiven Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden ausübt. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch die Reduktion des Nitrits zu NO durch die Nitritreduktasefunktion des desoxygenierten Myoglobins vermittelt.

Es konnte auch gezeigt werden, dass das Zytokin MIF während der I/R eine kardioprotektive Wirkung besitzt.

Während der I/R kommt es zum Anstieg der Konzentration an S-Nitrosothiolen. Gleichzeitig wurde die funktionelle Bedeutung der S-Nitrosothiole anhand der S-Nitrosierung des Komplex I der Atmungskette verdeutlicht.

Da MIF drei Cysteine besitzt, besteht die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation durch NO in Form einer S-Nitrosierung der Cysteine.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob es eine Interaktion zwischen Nitrit und MIF gibt. Des Weiteren sollen die Effekte eines möglichen Zusammenwirkens von Nitrit und MIF auf den I/R-Schaden und die Regulation von oxidativem Stress geprüft werden.

So soll geprüft werden, ob die zytoprotektiven Effekte des Nitrits mit den Signalwegen von MIF interagieren. Hierzu wurden *ex vivo* und *in vivo* Tierversuchsmodelle sowie biochemische Analysen und *in vitro* Untersuchungen gewählt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Gase

Amplex® Red Hydrogen Peroxide Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Antifoam SE15	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-MIF-Antikörper	UK Aachen, Institut für Biochemie (Univ.-Prof. Dr.rer. nat. J. Bernhagen)
Argon	Linde, Unterschleißheim
Roti Nanoquant Protein Assay	Bio-Rad, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbogen (95% O ₂ /5% CO ₂)	Linde, Unterschleißheim
Evans-Blue (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Helium	Linde, Unterschleißheim
Isocitratdehydrogenase	Sigma Aldrich, Steinheim
Isofluran (C ₃ H ₂ ClF ₅ O)	Forene®, Abbott, Wiesbaden
Jod (I ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumiodid (KI)	Merck, Darmstadt
Ketamin (C ₁₃ H ₁₆ ClNO)	Ketanest®, Pfizer Pharma, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF)	UK Aachen, Institut für Biochemie (Univ.-Prof. Dr.rer. nat. J. Bernhagen)
Macrophage migration Inhibitory Factor-Mutanten	UK Aachen, Institut für Biochemie (Univ.-Prof. Dr.rer. nat. J. Bernhagen)
Myoglobin (Pferdeherzmuskel)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NADP	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Material und Methoden

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrat (NaNO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Serag-Wiessner, Naila
Pyruvat	Boehringer, Ingelheim
Sephadex G-25m	Sigma-Aldrich, Steinheim
S-Nitrosoglutathion (GSNO)	Alexis, Lörrach
S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP)	Alexis, Lörrach
Stickstoff, flüssig	RWTH Aachen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl pH7,4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Urethan (C ₃ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser, bidest.	Millipore
Xylazin (C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S)	Rompun®, Medistar, Holzwickede

2.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Aortenkanüle	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Dreiwegehahn	Braun, Melsungen, Schweiz
Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Futter	Harlan Teklad Europe, Borchen
Glasfritte	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Glaserzkammer	Verhees, Neuss
Glaspistille	Schütt, Göttingen
Glas-Reaktionsgefäß	Verhees, Neuss
Nadel mit 6-0-Prolene	Serag-Wiessner, Naila

2. Material und Methoden

Nadel mit 7-0 Seide	Serag-Wiessner, Naila
Rasierklinge	Wilkinson, Solingen
Schläuche	Tygon®, Ismatec, Wert- heim-Mondfeld
Seide 5-0	Serag-Wiessner, Naila
Silikonschläuche	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Spritze, gasdicht	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Thoraxspanner	FST, Heidelberg

2.3 Geräte

Beatmungsgerät, Uno Micro-Ventilator 01	Uno, Zewenaar, Nieder- lande
(Küvetten-)Spektrophotometer	Beckman Coulter, Krefeld
(Küvetten-)Spektrophotometer, temperierbar	Amersham Biosciences, New Jersey, USA
(Platten-)Spektrophotometer	BMG Labtech, Offenburg
CLD Analysator	Typ CLD 88 NO, Ecophysics, Schweiz
Druckwandler	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Durchflussmesser	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Homogenisator	Schütt, Göttingen
HSE Stimulator P	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Infusionspumpe	Predictor Infors, Basel, Schweiz
Kamera	Hitachi, Duisburg
Langendorff-Anlage	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mikroskop (MZ 95)	Leica, Wetzlar
pH-Meter	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Rollerpumpe

Isma Tec, Wertheim-
Mondfeld

2.4 Software

Chromstar Version 6.2

Software für Chromato-
graphie und Prozessana-
lytik GmbH, Weyhe-
Leeste

Diskus - Software zur Plani-
metrierung histologischer
Schnitte

Technisches Büro Hilgers,
Königswinter

Microsoft Office 2003

Microsoft Windows XP

Origin 7G

OriginLabCorporation,
USA

2.5 Herstellung einer desoxygenierten Myoglobin-Lösung

Zur Herstellung einer 1mM Myoglobin-Lösung⁶⁵ wurde aus Pferdeherzmuskel isoliertes Myoglobin, das durch das Fehlen von freien Cysteinen selbst keine S-Nitrosoverbindung eingehen kann, verwendet. Das Myoglobin wurde hierzu vorsichtig im Dunkeln bei 4°C durch Rotation in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls im Dunkeln bei 4°C.

Zu der Lösung wurde eine Spatelspitze Natriumddithionit hinzu gegeben, um diese zu desoxygenieren. Im Anschluss daran wurde die Lösung 15 min mit 100% O₂ begast.

Dann erfolgte die Entsalzung der Lösung mittels Sephadex G25m. Das so gewonnene Eluat wurde mit einem Chelatbildner versetzt (0,1 M EDTA) und anschließend wiederum 15 min mit 100% O₂ oxygeniert. Die komplette Oxygenierung des Myoglobins erlaubte dann die photometrische Bestimmung der Konzentration bei $\lambda = 542 \text{ nm}$ ($\epsilon_{542} = 13,9 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$).

2. Material und Methoden

Der myokardialen Myoglobinkonzentration entsprechend wurde die Myoglobininlösung mittels PBS auf 200 μ M verdünnt.

Die Myoglobininlösung wurde zur Verminderung der Schaumbildung mit einer geringen Menge Antifoam SE 15 versetzt und bei 37°C für 15 min mit 100% Argon begast. Die komplette Desoxygenierung wurde durch den Farbumschlag von rot nach braun deutlich.

2.6 Macrophage migration Inhibitory Factor

Die in dieser Arbeit verwendeten MIF-Lösungen, MIF-Mutanten C57S, C60S und C81S¹⁴ und der anti-MIF-Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsklinikum Aachen, bereitgestellt^{6,14,116,117}.

Die Aufbewahrung der Proteine erfolgte in 20 mM Natriumphosphatpuffer. Für die in verschiedenen Versuchen benötigten Konzentrationen wurden MIF bzw. die MIF-Mutanten in PBS verdünnt.

2.7 Bestimmung von S-Nitrosoverbindungen mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion

2.7.1 Prinzip der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion

Die Methode der Chemilumineszenzdetektion (CLD) beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Gasphasen-Chemilumineszenz von NO mit Ozon freigesetzt und via Chemilumineszenzdetektion registriert werden.

Mittels Chemilumineszenz kann freies NO unmittelbar gemessen werden. Es ist auch möglich, die Speicherformen und Abbauprodukte des NO (Nitrit, Nitrosamine, Nitrosothiole, restliche Nitrosospezies) zu quantifizieren, sobald man das NO aus der jeweiligen Bindung freisetzt¹¹⁸.

2.7.2 Aufbau der reduktiven Chemilumineszenzdetektion

Dem Chemilumineszenz-Detektor wird ein Glas-Reaktionsgefäß direkt vorgeschaltet. Die Reduktionslösung wird von Helium durchströmt, welches als inertes Trägergas fungiert. In der Reduktionslösung findet die Reduktion von Nitrit und von Nitrosospezies statt, so dass NO freigesetzt wird. Das frei werdende NO gelangt über eine mit 1 M NaOH gefüllte Waschflasche zum Chemilumineszenzdetektor (s. Abb. 3). Die Reduktionslösung, bestehend aus 45 mM Kaliumjodid/10 mM Jod in Essigsäure⁶⁸, ermöglicht die Messung von Nitrit und Nitrosospezies (RXNO), worunter Nitrosothiole (RSNO) und Nitrosamine (RNNO) zu zählen sind.

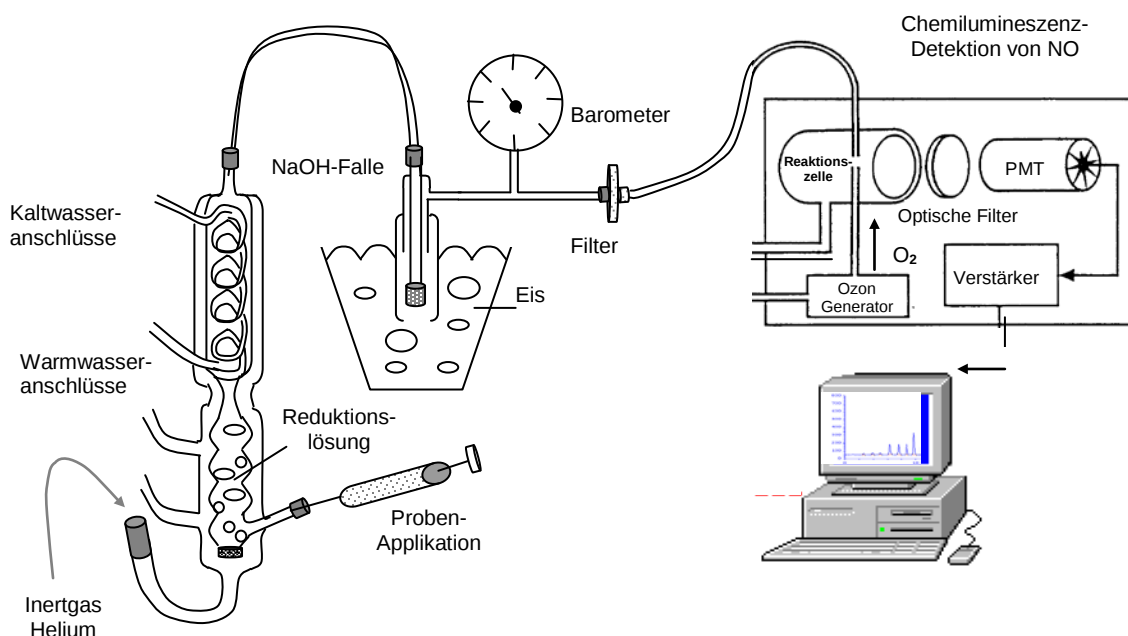


Abb. 3: Aufbau der Anlage zur reduktiven Gasphasen-Chemilumineszenz

2.7.3 Untergruppen der Nitrosoverbindungen

RXNO: Um alle Nitrosospezies (RXNO = RSNO+RNNO) zu detektieren, ist die Vorinkubation der Probe mit 0,5%iger Sulfanilamidlösung in 25%iger Salzsäure nötig, um freies Nitrit abzufangen. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein stabiles Diazoniumsalz, das nicht mehr reduziert wird¹¹⁹.

RNNO: Wird eine Probe mit Quecksilberchlorid (0,2%) inkubiert, werden RSNO über NO⁺ zu Nitrit (NO₂⁻) reduziert. Wird diese Probe anschließend wiederum mit Sulfanilamid inkubiert, enthält die Probe weder RSNO noch Nitrit, sondern nur noch Stickstoff-gebundene Nitrosierungsprodukte (RNNO = Nitrosamine).

2. Material und Methoden

RSNO: Die Schwefel-gebundenen Nitrosierungsprodukte (RSNO = Nitrosothiole) werden anhand der Differenz zwischen den gemessenen RXNO und RNNO errechnet (s. Abb. 4).

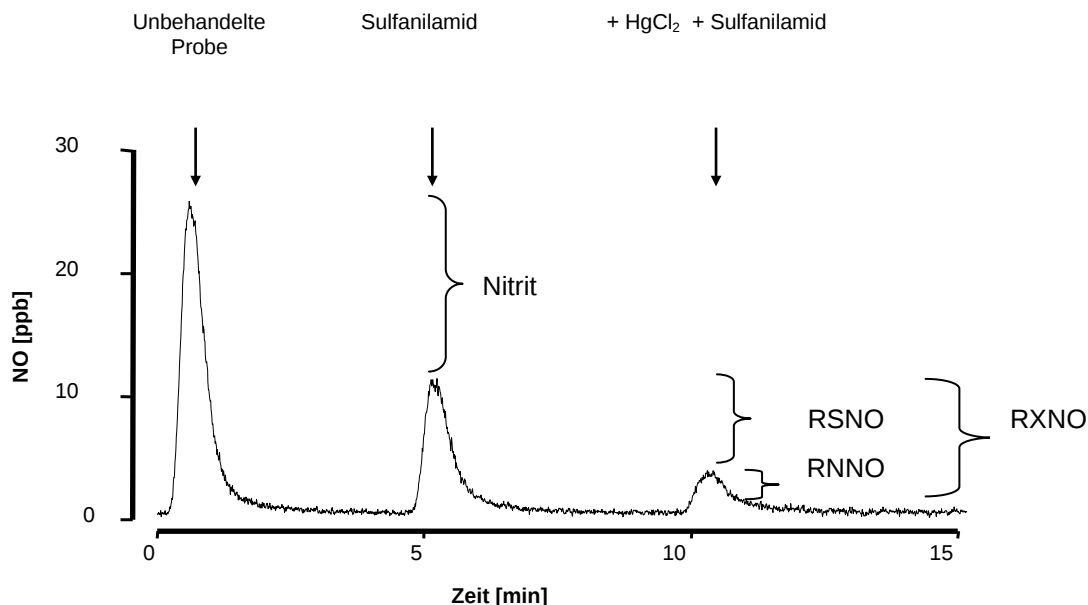


Abb. 4: Messsignal bei der Applikation einer Probe zur Bestimmung von Nitrit, RSNO und RXNO.

2.7.4 Durchführung der Messung

Vor Beginn der Messung wurde der untere Teil des Reaktionsgefäßes auf 60°C erwärmt, der obere Teil auf ca. 4°C gekühlt. Nach Einfüllen der Reduktionslösung wurde zunächst eine Eichreihe unterschiedlicher Nitritkonzentrationen (0 nM – 50 nM – 100 nM – 150 nM – 200 nM) gemessen, um eine Eichung vornehmen zu können.

2.8 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wildtypmäuse des Stammes C57BL/6 (MIF^{+/+}-Mäuse) verwendet.

Die Versuchstiere im Alter von 12 ± 2 Wochen wiesen ein mittleres Körpergewicht von 23 ± 1 g mit einem durchschnittlichen Herzgewicht von 168 ± 23 mg auf.

2.9 *Ex vivo* Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion

2.9.1 Das isolierte perfundierte Herz nach Oscar Langendorff

Die Grundlage des isolierten perfundierten Herzmodells bildet die 1895/1897 von Oscar Langendorff entwickelte Methode, die der *ex vivo* Untersuchung von hämodynamischen Parametern dient¹²⁰.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, eine zur Erhaltung der Herztätigkeit geeignete, mit Sauerstoff angereicherte Flüssigkeit durch eine in der Aorta ascendens platzierte Metallkanüle retrograd zu perfundieren.

Der retrograd gerichtete Perfusionsfluss bewirkt den Schluss der Aortenklappe und damit die Perfusion der Koronargefäße.

Um den linksventrikulären Druck und die Vorlast zu bestimmen, wird ein flüssigkeitsgefülltes Ballonkathetersystem über den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingebracht und über einen Druckwandler abgeleitet.

Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurden die isolierten Herzen mithilfe eines externen Schrittmachers auf eine Herzfrequenz von 600 Schlägen pro Minute rhythmisiert.

Die Applikation von exogenen Substanzen erfolgte mittels einer Infusionspumpe über einen seitlichen Zugang. Dieser befindet sich zur Vermeidung einer Kontamination des gesamten Systems oberhalb der Aortenkanüle (s. Abb. 5).

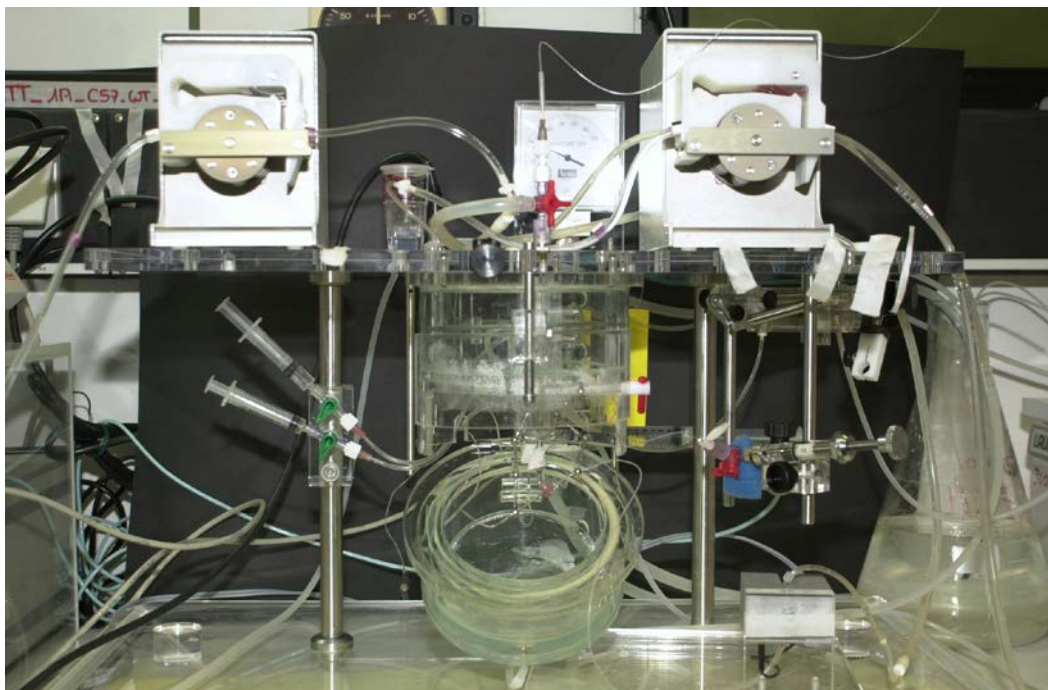


Abb. 5: Aufbau der Langendorff-Apparatur (modifiziert nach Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus).

2.9.2 Präparation der Herzen

Vor der Tötung der Mäuse wurde die Narkose mittels einer intraperitonealen Urethan-Injektion (1200 mg/kg Körpergewicht) eingeleitet. Die Mäuse wurden mittels Heparin intraperitoneal (1000 IE/kg Körpergewicht) antikoaguliert. Anschließend erfolgte die zervikale Dislokation.

Zur Präparation des Herzens wurde der Brustkorb unterhalb des Sternums eröffnet, danach erfolgte die Durchtrennung der Rippen nach axial.

Nach der Durchtrennung von Aorta und Vena cava inferior konnte das Herz einschließlich des Aortenbogens und der Lungen angehoben und nach Durchtrennung von Vena cava superior und Trachea entnommen werden.

Herz und Lungen wurden sofort in eiskalten Krebs-Henseleit-Puffer (s. Kapitel 2.9.3) aufgenommen. In einer Präparierschale unter dem Mikroskop konnte das Herz vollständig präpariert werden. Dabei erfolgt die Entfernung der Lungen, des restlichen Ösophagus, des Thymus und des Perikards.

Die Aorta ascendens wurde distal des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Anschließend wurde die Aorta ascendens auf eine Aortenkanüle geschoben und dort mit 5-0 Seide verknotet. Über die Aortenkanüle konnte das isolierte Herz an die Langendorff-Apparatur angeschlossen werden, so dass die retrograde Perfusion gestartet werden konnte.

2.9.3 Retrograde Perfusion

Die Perfusion der isolierten Herzen erfolgte mit einem modifizierten Ansatz der von Krebs und Henseleit entwickelten salinen Lösung⁶⁷. Die Lösung bestand aus 116 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,1 mM MgSO₄, 24,9 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 8,3 mM Glukose und 2 mM Pyruvat. Um Kalziumpräzipitation zu verhindern, wurde das CaCl₂ erst nach einer zehnminütigen Begasung mit Carbogen zugesetzt. Zur Vermeidung einer Fremdkörperembolie wurde die Lösung vor der Perfusion gefiltert (Porengröße ≤ 5 µm). Vor der Perfusion der Herzen wurde die Lösung auf ca. 37°C erwärmt und währenddessen permanent mit Carbogen begast.

Die Perfusion erfolgte retrograd über die Aortenkanüle mit einem dem mittleren Blutdruck entsprechenden Druck von 100 mmHg (druckkonstante Perfusion).

Die retrograde Perfusion diente dabei einerseits der Entfernung von Blutresten, andererseits der Aufrechterhaltung des myokardialen Stoffwechsels.

2.9.4 *Ex vivo* Protokoll der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Nach Rhythmisierung des Herzens auf ca. 600 Schläge pro Minute und dem Einführen des Ballons über das linke Atrium in den linken Ventrikel folgte eine 20-minütige Einschlag- und Äquilibrationsphase des Herzens. Während dieser Phase wurde vorbereitend bereits die linke Koronararterie mit einer 7-0 Nadel-Seidenfaden-Kombination unterbunden und ein lockerer Knoten gefasst, in den unmittelbar vor der Ischämie ein 5 mm langer Silikonschlauch eingelegt wurde. Durch Zuziehen des Knotens wurde die Ischämie induziert, wobei durch Abfall der Flussrate die richtige Platzierung der Ligation kontrolliert werden konnte. Nach 30 min wurde die Ischämie beendet, indem der Knoten wieder gelöst wurde. Im Falle einer videoplanimetrischen Infarktgrößenbestimmung wurde der Faden für die anschließende Färbung belassen. Nach 180 min Reperfusion (oder 5 min Reperfusion für die biochemischen Analysen (s. Kapitel 2.11)) konnte das Herz von der Langendorff-Apparatur entfernt und die weitere Behandlung des Herzens begonnen werden (s. Abb. 6).

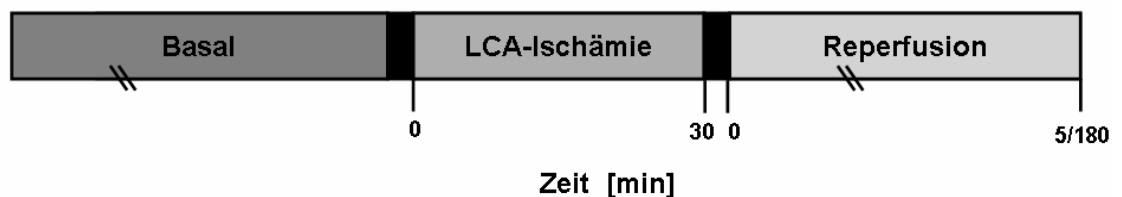


Abb. 6: Methodik des *ex vivo* Modells zur I/R. Nach einer 30minütigen Ischämiezeit wurden die Herzen entweder 180 min oder 5 min reperfundiert.

Für die biochemischen Assays zur Detektion der Aconitase-Aktivität und der Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde die Reperfusion nach 5 min beendet.

2.9.5 Färbung zur Charakterisierung der Area at Risk und des Infarkt-areals

Durch die Ligation der linken Koronararterie entsteht im Myokard ischämisches Gewebe.

Dabei sind histologisch drei Regionen zu unterscheiden, die die von der Ischämie verschieden stark betroffenen Areale repräsentieren:

Vitales Gewebe:

Myokard, das nicht von der
Ischämie betroffen ist

2. Material und Methoden

Ischämisches Gewebe (Area at Risk (AAR)): Myokard, das durch die Ligation der linken Koronararterie temporär nicht mehr versorgt wird

Infarziertes Gewebe: nekrotisches Myokard

Die Unterscheidung dieser drei Regionen erfolgt durch zwei unterschiedliche Färbungen.

Zunächst wurde die Ligation der linken Koronararterie wieder hergestellt. Dies war möglich, da bei Beendigung der Ischämie lediglich der Knoten gelöst, der Faden jedoch belassen wurde. Dann wurde 1 ml des Farbstoffes Evans-Blue (1 ml einer 1%igen Lösung) über die Aortenkanüle appliziert. Durch die erneute Ligation wurde so nur das vitale Gewebe gefärbt. Das Herz wurde danach in Frischhaltefolie gewickelt und bei -20°C für 1 h gelagert.

Mit einer Rasierklinge wurden - am Apex beginnend - 1 mm dicke Querschnitte des Herzens gefertigt. Das Gewicht jeder Scheibe wurde erfasst.

Zur Differenzierung der AAR vom infarzierten Gewebe innerhalb der AAR wurden die Herzschnitte für 5 min in einer 37°C warmen 1%igen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung inkubiert¹²¹. TTC ist ein Redox-Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen mittels oxidativer Phosphorylierung in rotes, unlösliches 1,3,5-Triphenylformazan umgewandelt wird. Da so nur Gewebe gefärbt werden kann, das über funktionsfähige mitochondriale Enzyme verfügt, dient diese Färbung der Unterscheidung von ischämischem und infarziertem Gewebe.

Nach der Färbung stellt sich also das vitale Gewebe blau, das ischämische Gewebe rot und das infarzierte Gewebe ungefärbt (weiß) dar (s. Abb. 7).

2. Material und Methoden

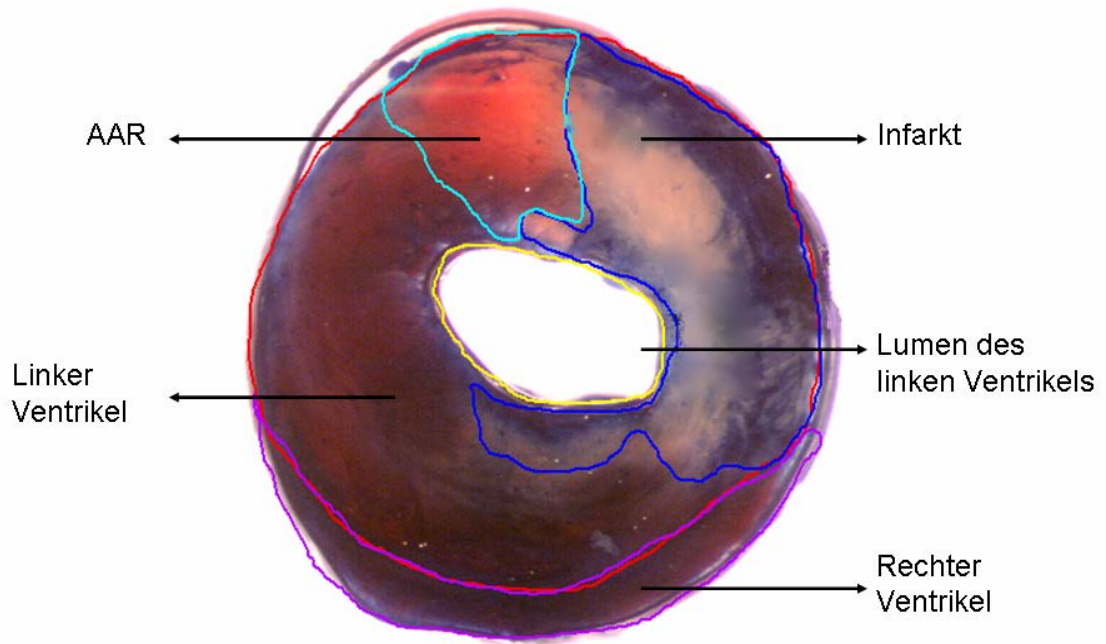


Abb. 7: Bild eines Herzschnittes nach beiden Färbeschritten. Vitales Gewebe stellt sich blau, ischämisches Gewebe rot und infarziertes Gewebe weiß dar. Zur Messung der Infarktgröße werden die Herzschnitte videoplanimetrisch analysiert, so dass die Fläche des linken Ventrikels, der AAR und des Infarktes bestimmt werden kann.

2.9.6 Infarktgrößenmessung

Die Herzschnitte wurden nach der Färbung photographiert und mittels einer Bildverarbeitungssoftware (Diskus) ausgewertet. Zur Auswertung wurden die Flächen des linken Ventrikels (LV), der Area at Risk (AAR) und des Infarkts (I) bestimmt.

Das Verhältnis des Infarktgebietes zur AAR unter Berücksichtigung des Gewichtes der Schnitte (G) wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\begin{array}{c}
 \frac{I}{AAR} = \frac{\frac{I_1}{LV_1} \times G_1 + \frac{I_2}{LV_2} \times G_2 + \frac{I_3}{LV_3} \times G_3 + \frac{I_4}{LV_4} \times G_4}{\frac{AAR_1}{LV_1} \times G_1 + \frac{AAR_2}{LV_2} \times G_2 + \frac{AAR_3}{LV_3} \times G_3 + \frac{AAR_4}{LV_4} \times G_4} \times 100\%
 \end{array}$$

2.10 *In vivo* Modell der myokardialen Ischämie/ Reperfusion

2.10.1 Operation

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin anästhesiert und mit 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin relaxiert. Anschließend erfolgte die orale Intubation der Mäuse mittels einer Venenverweilkanüle.

Die Narkose wurde während der Operation mit einem Gemisch aus 33% Sauerstoff / 2% Isofluran über ein Beatmungsgerät aufrechterhalten. Die Beatmung erfolgte mit einer Atemfrequenz von 140 Atemzügen/min und einem Atemzugvolumen von ca. 2 ml.

Nach der Hautdesinfektion mit Betaisodona wurde ein Hautschnitt über dem vierten Interkostalraum gesetzt. Im Anschluss daran wurde die oberflächliche Muskulatur bis zu den Rippen inzidiert. Durch die Durchtrennung der Interkostalmuskulatur und die stumpfe Präparation der Pleura wurde der Thorax zwischen der vierten und fünften Rippe eröffnet. Nach dem Einsetzen der Thoraxspanner wurde das Perikard eröffnet.

Daran anschließend wurde die linke Koronararterie lokalisiert und mit 7-0 Seide vorbereitend unterstochen. In die entstehende Schlaufe wurde ein dünner Silikonschlauch eingelegt, so dass der Knoten ohne direkte Gewebsverletzung für die entsprechende Zeit zugezogen und wieder gelöst werden konnte.

Die Ischämie wurde durch Zuziehen des Knotens initiiert.

Während der andauernden Ischämie der linken Koronararterie wurde der Thorax lediglich provisorisch verschlossen und mit feuchter Gaze bedeckt, um das Austrocknen zu vermeiden.

Zur Einleitung der Reperfusion wurde der Knoten wieder gelöst, der Faden dabei jedoch belassen.

Im Anschluss an das Lösen der Ligation wurde der Thorax mit resorbierbarem Nahtmaterial dreischichtig (Thorax, Interkostalmuskulatur, Haut) verschlossen.

Nach Ausleiten der Narkose wurden die Mäuse extubiert und anschließend noch ca. 10 min mit einer speziellen Maske mit Raumluft beatmet. Die

2. Material und Methoden

postoperative Analgesie erfolgte mit 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan alle 12 Stunden nach der Operation.

2.10.2 *In vivo* Protokoll der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Grundsätzlich wurde die Ischämie der linken Koronararterie für 30 min aufrechterhalten, gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion¹⁰² (s. Abb. 8).

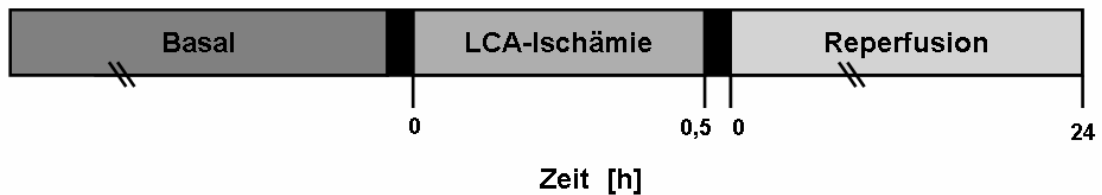


Abb. 8: Protokoll des *in vivo* Modells zur myokardialen I/R.

Die Herzexplantation, die Färbung zur Charakterisierung der AAR und des Infarktareals sowie die Messung der Infarktgröße erfolgten ebenso wie bei dem *ex vivo* Modell der I/R (s. Kapitel 2.9).

2.11 Charakterisierung des Effekts der Ischämie/Reperfusion anhand von Markern für oxidative Zellschädigung

2.11.1 Messung der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Die Messung der Wasserstoffperoxid(H_2O_2)-Konzentration erfolgt mittels des Amplex Red[®] Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assays nach Angaben des Herstellers. Die Oxidation des Farbstoffes Amplex Red[®] zum rot fluoreszierenden Produkt Resorufin durch H_2O_2 wurde spektrophotometrisch bei einer Anregung von $\lambda = 560$ nm und einer Fluoreszenzemission von $\lambda = 590$ nm gemessen. Der Assay beruht auf der Oxidation des für H_2O_2 spezifischen, nicht fluoreszierenden Farbstoffes A6550 (N-acetyl-3,7-dihydrophenoxazin, Amplex Red[®]) zum rot fluoreszierenden Resorufin. Diese Oxidation wird durch eine Peroxidase, z.B. die Meerrettichperoxidase (Horsereddish-peroxidase (HRP)) vermittelt (s. Abb. 9).

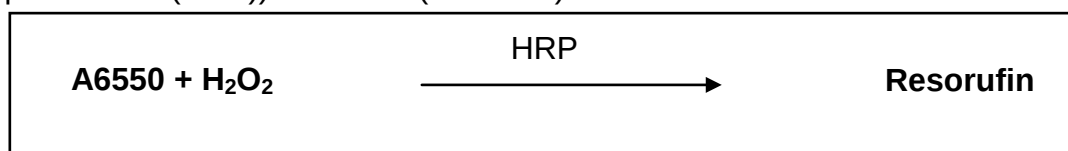


Abb. 9: Schema der Funktionsweise des Amplex Red[®] Assays

2.11.2 Bestimmung der Aconitase-Aktivität

Physiologie der Aconitase

Die Aconitase ist ein Enzym des Citratzyklus und daher mitochondrial lokalisiert. Sie isomerisiert Citrat zu Isocitrat über cis-Aconitat. Das so entstehende Isocitrat wird durch die Isocitratdehydrogenase zu α -Ketoglutarat reduziert. Durch diese Reduktion wird gleichzeitig NAD zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidiert (s. Abb. 10).

Die Eisen-Schwefel-Cluster $[4\text{Fe-4S}]$ der Aconitase sind funktionell wichtig für deren Aktivität. Eines dieser Eisenionen ist nicht protein-, sondern hydrogengebunden, dort binden die Substrate der Aconitase. Fehlt dieses Eisenion, wird die Aconitase inaktiviert.

Die Aconitase ist sensitiv gegenüber oxidativem Stress. Eine Oxidation des $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster zu einem $[3\text{Fe-4S}]$ -Cluster kann durch Superoxide (O_2^-), Wasserstoffperoxide (H_2O_2) und andere oxidative Spezies wie beispielsweise Peroxynitrit (ONOO^-) erfolgen und geht mit einer Inaktivierung der Aconitase einher¹²².

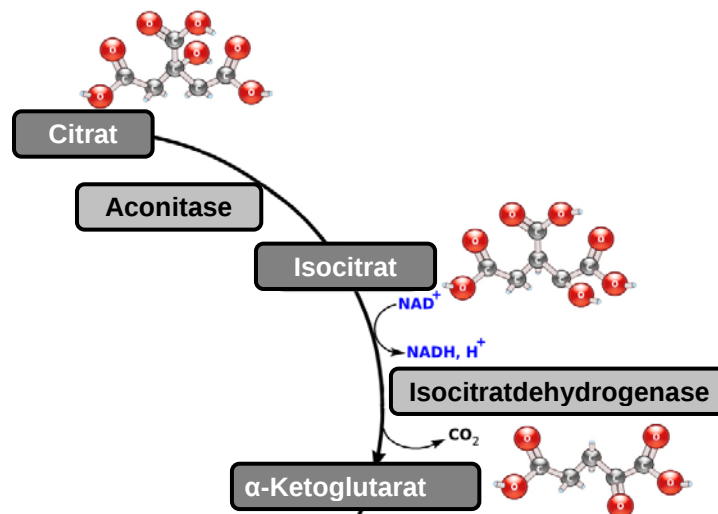


Abb. 10: Physiologische Funktion der Aconitase: Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat.

Probenvorbereitung

Für die Messung der Aconitase-Aktivität im Rahmen der myokardialen Ischämie/Reperfusion wurden Mäuseherzen verwendet, die nach dem ex vivo Protokoll (s.o.) vorbereitet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden^{67,123}.

2. Material und Methoden

Zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden die Herzen aufgetaut. Nach dem Zerkleinern wurden sie mit einem Homogenisator (Schütt, Göttingen) unter Zugabe von NaCl homogenisiert. Die Homogenate wurden entsprechend verdünnt und in den unten beschriebenen Assay eingesetzt.

Messung der Aconitase-Aktivität

Zur Messung der Aconitase-Aktivität in myokardialen Gewebe wurde dem Homogenat 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 30 mM Natriumcitrat, 0,2 mM NADP und 2 mU Isocitratdehydrogenase hinzugefügt. Nach einer lichtgeschützten Inkubation von ca. 5 min bei 37°C wurde die Bildung von NADH mit einem Spektrophotometer (Amersham Biosciences, USA) bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ für 15 min bei 37°C verfolgt.

3. Ergebnisse

3.1 S-Nitrosierung des Macrophage Migration Inhibitory Factor

Die Eigenschaft des desoxygenierten Myoglobins (desoxyMb), Nitrit zu NO zu reduzieren, konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden⁶⁵.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Nitrit durch desoxyMb auch bei der Vermittlung des zytoprotektiven Effekts während des I/R-Schadens eine entscheidende Rolle spielt⁶⁷.

Der Mechanismus der Myoglobin-medierten Bildung von Nitrit wurde hier genutzt, um die Cysteingruppen von MIF zu S-nitrosieren.

3.1.1 S-Nitrosierung von MIF

Zur S-Nitrosierung von MIF wurde zu der desoxygenierten Myoglobininlösung ca. 400 nM rekombinantes MIF (rMIF) hinzugefügt, anschließend wurde 25 µM Nitrit appliziert. Das entstandene Gemisch wurde für 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Die entstehende Verbindung aus S-nitrosiertem rMIF wird weiterhin als MIF-SNO bezeichnet.

3.1.2 Bestimmung von S-Nitrosoverbindungen

Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe des Gemisches entnommen und für die Bestimmung der Nitrosospezies vorbereitet. Zur Detektion aller Nitrosospezies (RXNO) wurde eine Probe mit Sulfanilamid inkubiert, zur Detektion der Nitrosamine (RNNO) wurde eine Probe sowohl mit Quecksilberchlorid als auch mit Sulfanilamid behandelt (s. Abb. 11).

Die Bestimmung der Nitrosospezies erfolgte mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (s.o.). Die Konzentration der S-Nitrosothiole (RSNO), die durch S-nitrosiertes MIF gebildet werden, ergibt sich aus der Differenz aus RXNO und RNNO.

3. Ergebnisse

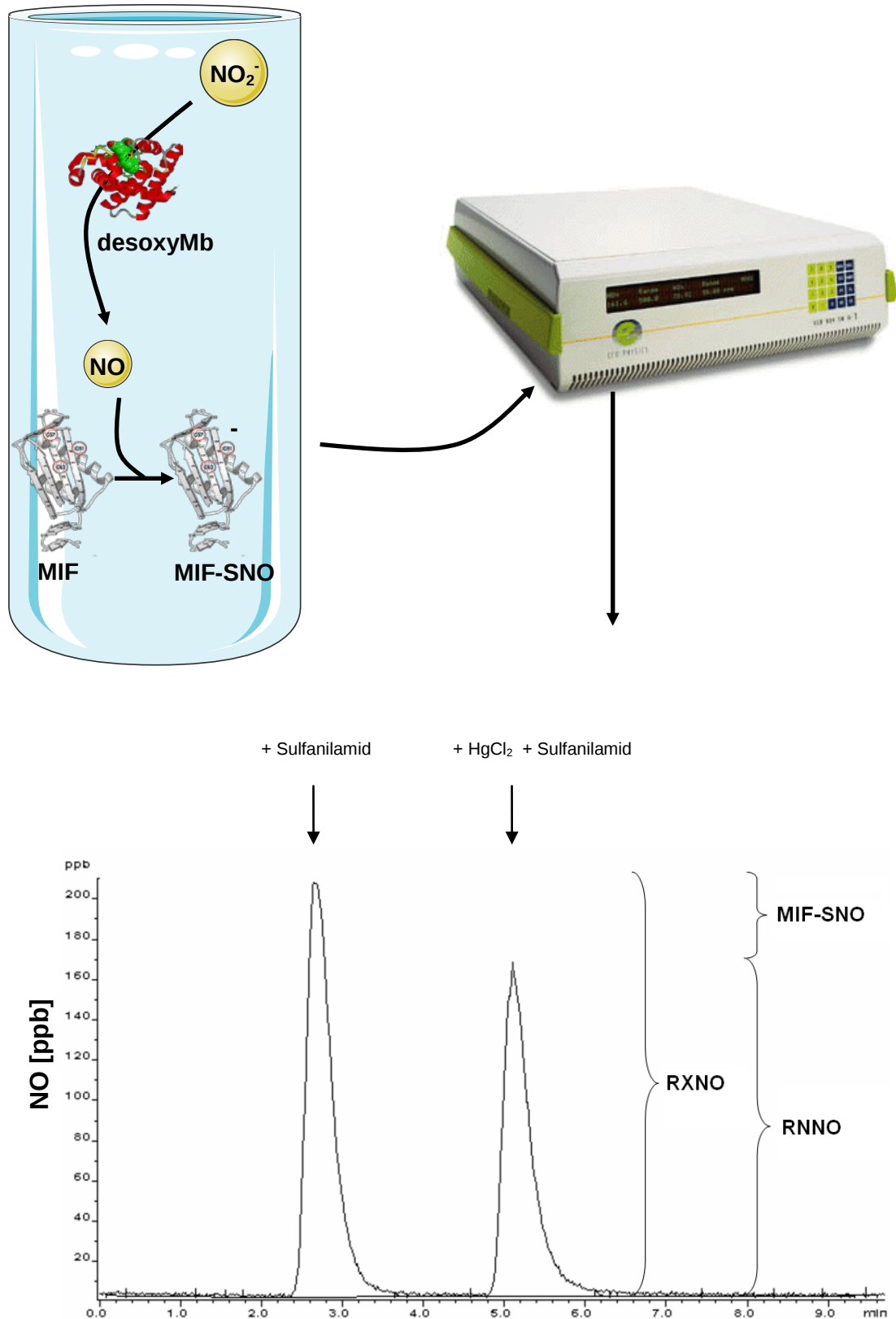


Abb. 11: Versuchsansatz zum Nachweis der S-Nitrosierung von MIF. Nach der Inkubation von desoxyMb mit Nitrit wird dieses zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert und kann nach Zugabe von MIF dessen SH-Gruppen S-nitrosieren. Dies führt zur Bildung von MIF-SNO. Die Detektion erfolgt mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz.

3. Ergebnisse

3.1.3 Berechnung der S-Nitrosierung

Um die Konzentration der S-nitrosierten Cysteine zu bestimmen, wurde die Konzentration der gemessenen RSNO durch die Konzentration des MIF dividiert. So erhielt man die Einheit nmol SNO/nmol MIF (s. Abb. 12 oben).

Den prozentualen Anteil der S-nitrosierten Cysteine konnte man durch den Bezug der RSNO-Konzentration auf die Konzentration der vorliegenden SH-Gruppen ermitteln (s. Abb. 12 unten).

$$\text{MIF-SNO [nmol SNO/nmol MIF]} = \frac{\text{RSNO-Konzentration [nM]}}{\text{MIF-Konzentration [nM]}}$$
$$\% \text{ S-Nitrosierung} = \frac{\text{RSNO-Konzentration [nM]}}{3 \times \text{MIF-Konzentration [nM]}} \times 100\%$$

Abb. 12: Formeln zur Berechnung der MIF-SNO-Konzentration und des prozentualen Anteils der S-nitrosierten Cysteine

3.1.4 Kontrollen

Als Kontrollen für das Vorliegen der S-Nitrosierung von MIF dienten zwei verschiedene Ansätze.

Um nachzuweisen, dass die S-Nitrosierung eine Reduktion des Nitrits zu NO erfordert, wurde ein Ansatz etabliert, in dem lediglich Nitrit und MIF inkubiert wurden.

Um sicherzustellen, dass MIF eine Nitrosierung einer SH-Gruppe (S-Nitrosierung) erfährt (im Gegensatz zur N-Nitrosierung), wurden die SH-Gruppen des MIF vor der Nitrosierung mittels 100 mM NEM für 20 min bei 4°C alkylisiert, so dass dort kein NO mehr binden und damit auch keine S-Nitrosierung stattfinden konnte.

In beiden Kontrollen wurde jeweils das vorherige Protokoll beibehalten.

3. Ergebnisse

3.1.5 Ergebnis der S-Nitrosierung von MIF

Die in dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau gemessene Konzentration an S-Nitrosothiolen beträgt, bezogen auf die MIF-Konzentration, $1,4 \pm 0,4$ nmol SNO/nmol MIF. Dies entspricht einer S-Nitrosierung von $47 \pm 15\%$ (s. Abb. 13).

Bedingt durch das Vorhandensein dreier Cysteine pro Molekül MIF bedeutet dies, dass ein oder zwei SH-Gruppen des Proteins S-nitrosiert werden.

Anhand der durchgeführten Kontrollen konnte eindeutig eine Beteiligung der SH-Gruppen und somit das Vorliegen einer S-Nitrosierung bewiesen werden (s. Abb. 13).

Die vorangehende irreversible Alkylierung aller SH-Gruppen durch NEM führte dazu, dass keine S-Nitrosothiole detektiert werden konnten. So konnte gezeigt werden, dass das Stickstoffmonoxid definitiv an den SH-Gruppen des Proteins bindet.

Auch die alleinige Inkubation von Nitrit und MIF führte nicht zur Detektion von S-Nitrosothiolen. Die Reduktion des Nitrits zu Stickstoffmonoxid durch die Reduktasefunktion des desoxyMb ist also Voraussetzung für die S-Nitrosierung von MIF.

3. Ergebnisse

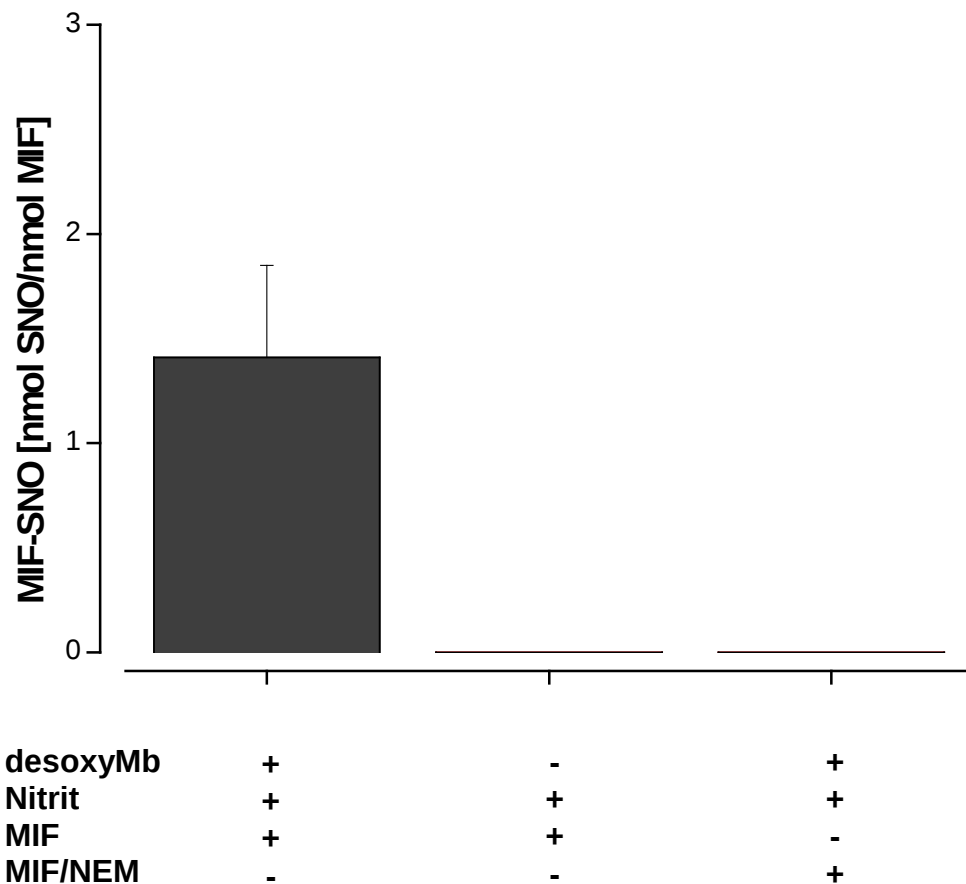


Abb. 13: Nach Inkubation von MIF mit Nitrit und desoxygeniertem Myoglobin können $1,4 \pm 0,4$ nmol SNO/nmol MIF detektiert werden. Die Kontrollen ohne desoxyMb oder mit alkylisiertem MIF zeigen keine Detektion von S-Nitrosothiolen (gemittelte Werte ($MW \pm SD$) aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten).

3.1.6 Identifikation der S-nitrosierten Cysteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich MIF erfolgreich S-nitrosieren lässt, stellte sich die Frage, an welchen Cysteinen die S-Nitrosierung von MIF stattfindet.

Um die Cysteine zu identifizieren, die die S-Nitrosierung vermitteln, wurde der oben aufgeführte Versuchsansatz mit Cystein-Serin-Mutanten des rMIF durchgeführt. In diesen Mutanten ist jeweils eines der drei Cysteine durch die Aminosäure Serin ersetzt, so dass dort wegen des Fehlens einer SH-Gruppe keine S-Nitrosierung stattfinden kann.

Die bereits etablierten Mutanten C57S, C60S und C81S wurden dabei in den selben Versuchsansatz eingebracht wie das eigentliche MIF-Protein.

3. Ergebnisse

Durch das Ausschlussprinzip konnte somit auf das für die Bindung von NO verantwortliche Cystein geschlossen werden (s. Abb. 14).

Die Mutante C57S zeigt mit $1,3 \pm 0,6$ nmol SNO/nmol MIF eine S-Nitrosierung von ca. einer SH-Gruppe (S-Nitrosierung ca. 55%). Ebenso zeigte die Mutante C60S mit $0,9 \pm 0,4$ nmol SNO/nmol MIF eine S-Nitrosierung von ca. 45% der Cysteine und damit die Besetzung einer SH-Gruppe.

Beide Mutanten zeigten damit dem MIF-Protein vergleichbare Ergebnisse.

Bei der Untersuchung der Mutante C81S konnten keine S-Nitrosothiole detektiert werden.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nur in Anwesenheit des Cysteins 81 eine S-Nitrosierung stattfinden kann.

Das Cystein 81 spielt somit eine entscheidende Rolle für die S-Nitrosierung.

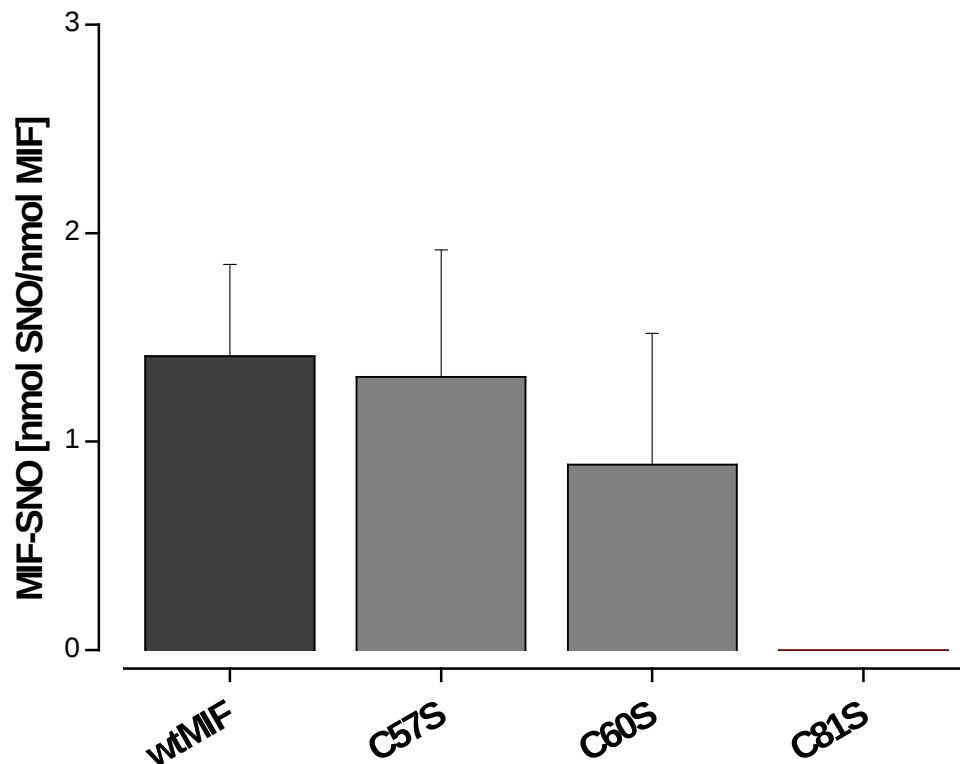


Abb. 14: Die Cystein/Serin-Mutanten C57S und C60S zeigen mit $1,3 \pm 0,6$ nmol SNO/nmol MIF bzw. $0,9 \pm 0,4$ nmol SNO/nmol MIF dem wildtypischen MIF vergleichbare Werte bei der Detektion von MIF-SNO. Im Gegensatz dazu kann die Mutante C81S nicht S-nitrosiert werden (gemittelte Werte (Mittelwert $\pm$ SD) aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten).

3. Ergebnisse

3.1.7 S-Nitrosierung mittels NO-Donoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine S-Nitrosierung von MIF erreichbar ist, wurde diese in anderen Versuchsansätzen mit den NO-Donoren S-Nitrosoglutathion (GSNO) oder S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) durchgeführt. Dazu wurde jeweils 10 µg rMIF mit 1,5 mM GSNO oder 1,5 mM SNAP für 60 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert.

Vor der Detektion des gebildeten MIF-SNO mittels Chemilumineszenz erfolgte im Anschluss an die Inkubationszeit eine Separation des MIF-SNO von den Resten des NO-Donors durch Proteinfällung oder Säulenaufreinigung mittels Sephadex G25m Säulen.

3.2 Ermittlung der maximal kardioprotektiven Nitritdosis *ex vivo*

In Analogie zu den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Duranski wurde zunächst die kardioprotektive Nitritdosis in einem *ex vivo* Ansatz ermittelt¹⁰².

Zur Identifikation der maximal kardioprotektiven Nitritdosis wurden zwei verschiedene Konzentrationen getestet:

Applikation von 0,5 µM Nitrit über 35 min 48 nmol Nitrit

Applikation von 1 µM Nitrit über 35 min 96 nmol Nitrit

Als Kontrolle diente die Applikation von 0,5 µM Nitrat über 35 min.

Nach der Äquilibrierungsphase und Erreichen der adäquaten Herzfrequenz wurde fünf Minuten vor Beginn der Ischämie die Applikation von Nitrit bzw. Nitrat als Kontrolle über eine Spritzenpumpe begonnen.

Die Nitrit- bzw. Nitratapplikation wurde erst nach der Ischämie, also mit Beginn der Reperfusion, gestoppt (s. Abb. 15).

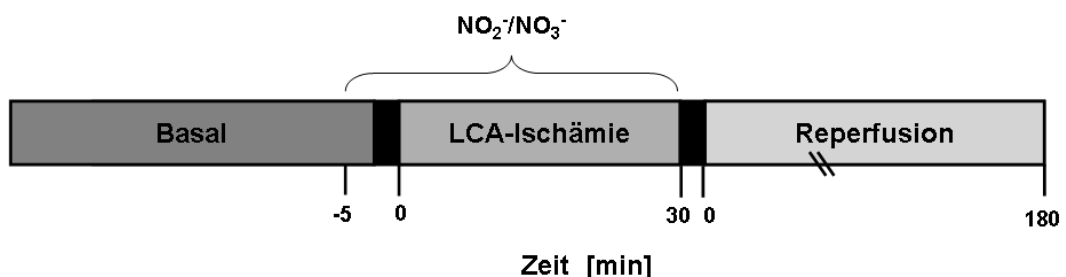


Abb. 15: Protokoll des *ex vivo* Modells zur myokardialen I/R.

3. Ergebnisse

Durch die sich anschließende videoplanimetrische Messung der Infarktgrößen konnte die kardioprotektive Nitritkonzentration ermittelt werden.

Die Applikation von 48 nmol Nitrit führte mit einem Infarkt/AAR von $18 \pm 5\%$ zu einer signifikant kleineren Infarktgröße als die Applikation von 96 nmol Nitrit (Infarkt/AAR $37 \pm 6\%$ ($p < 0,02$)).

Somit zeigte die Dosis von 96 nmol Nitrit sogar ein größeres infarziertes Areal als die Nitrat-Kontrolle mit 26% Infarkt/AAR (s. Abb. 16).

Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Applikation von 48 nmol Nitrit die kardioprotektive Dosis im Vergleich zur Applikation von Nitrat und zu höheren Dosen Nitrit darstellt. Damit konnten bereits vorliegende Ergebnisse verifiziert werden¹⁰².

Diese Dosis wurde somit Grundlage für alle weiteren Versuche, sowohl *ex* als auch *in vivo*.

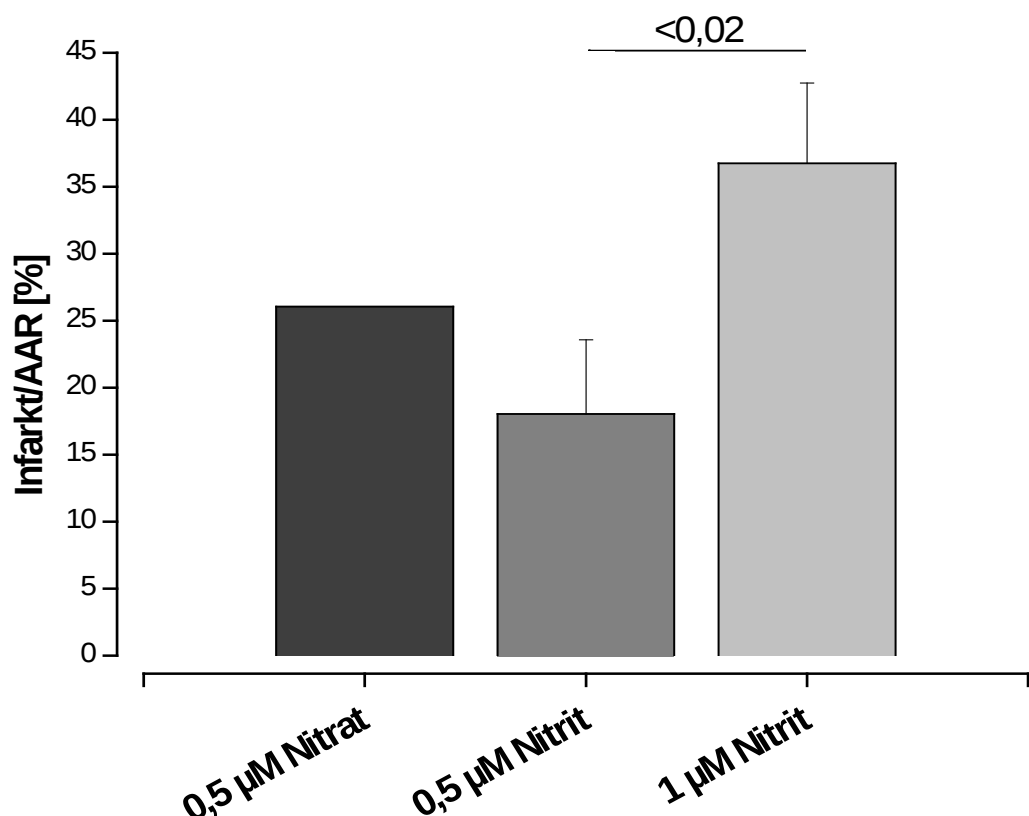


Abb. 16: Mit einem Infarkt/AAR von $18 \pm 6\%$ führt die Applikation von 48 nmol Nitrit zu einem signifikant kleineren infarzierten Infarktareal als die Applikation von 96 nmol Nitrit mit Infarkt/AAR = $37 \pm 6\%$. Damit zeigt nur die Applikation der geringeren Nitritdosis eine kardioprotektive Wirkung im Vgl. zur Kontrolle ($p < 0,02$; gemittelte Werte (Mittelwert $\pm$ SD) aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten) und die Applikation von Nitrat ($n = 1$).

3. Ergebnisse

Zur Objektivierung der Methode und als Qualitätskontrolle diente der Vergleich der AAR bezogen auf den linken Ventrikel (AAR/LV). In allen drei Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Größe der AAR/LV festgestellt ($p > 0,05$) (s. Abb. 17).

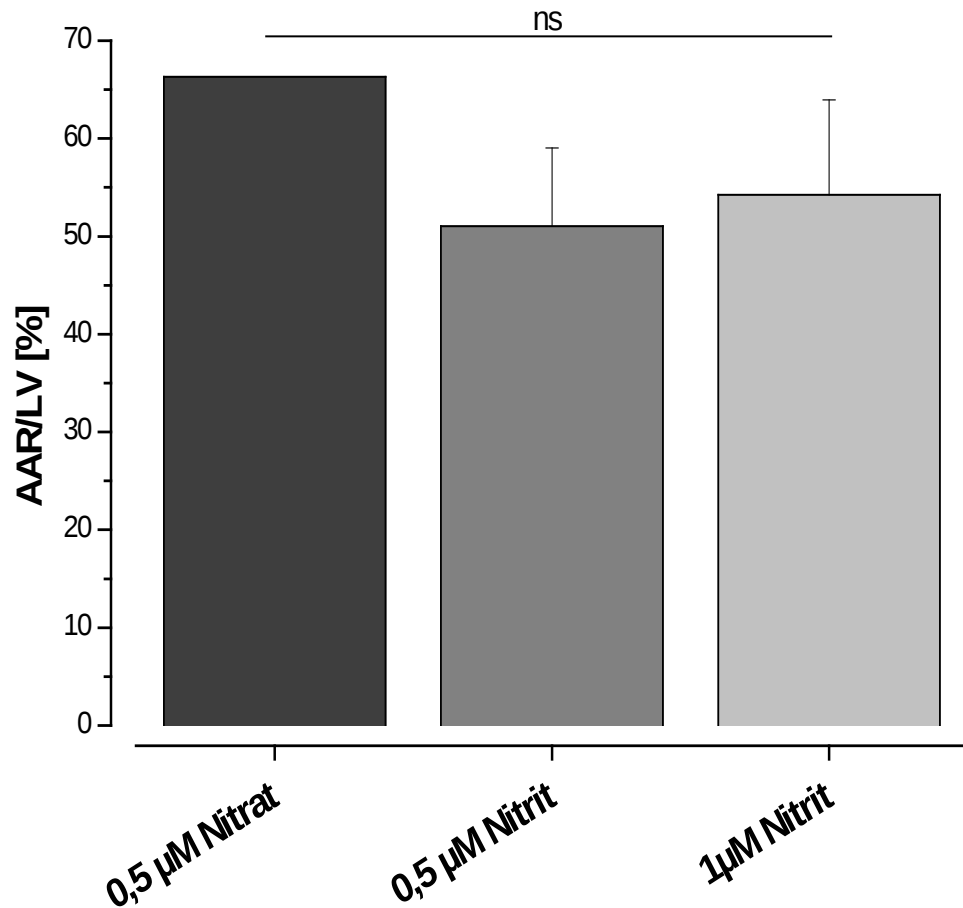


Abb. 17: Zur Überprüfung der Methode diente der Vergleich der AAR/LV. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der drei Gruppen ($p > 0,05$; gemittelte Werte (Mittelwert $\pm$ SD) aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten).

3.3 Der Effekt der Inhibition von MIF in einem *in vivo* I/R Modell

In den ersten *in vivo* Versuchen zur I/R wurden C57BL/6 Mäuse verwendet. Während der Operation wurde den Mäusen zunächst lediglich Nitrat oder Nitrit verabreicht.

3. Ergebnisse

Anschließend folgten Gruppen, die zusätzlich den anti-MIF-Antikörper bzw. die Isotypenkontrolle mit IgG1 präoperativ erhielten (s. Abb. 18 und Tab. 1). Der anti-MIF-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper (IIID9), der gegen humanes MIF gerichtet ist.

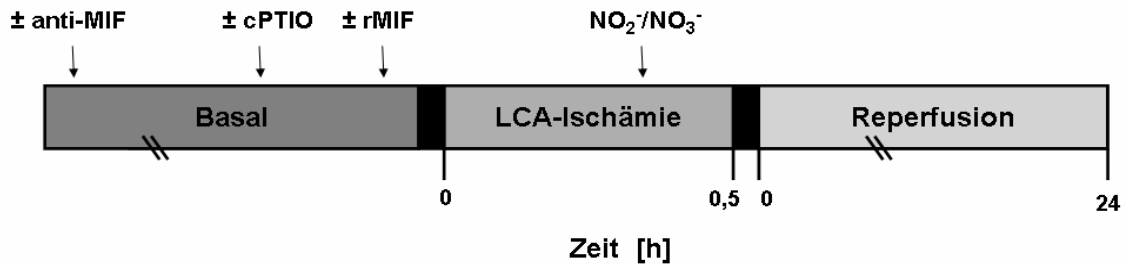


Abb. 18: Protokoll der I/R-Operationen (*in vivo* Methodik).

Tab. 1: Übersicht über die zu verschiedenen Zeitpunkten verabreichten Substanzen vor oder während der Operation zum *in vivo* Modell.

	Applikations-zeitpunkt	Applikations-art	Volu-men	Konzen-tration
anti-MIF-AK	16 h präoperativ	intraperitoneal	200 μl	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
cPTIO	30 min vor Ischämie	intravenös	50 μl	1 mg/kg KG
rMIF	5 min vor Ischämie	intraventrikulär	50 μl	0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	5 min vor Reperfusion	intraventrikulär	50 μl	0,5 μM

Insgesamt wurden so Mäuse für fünf verschiedene Gruppen operiert (s. Tab. 2):

Tab. 2: Behandlung der Mäuse prä- bzw. intraoperativ und Anzahl der durchgeführten Operationen (n-Zahl).

	Nitrat	Nitrit	anti-MIF-AK	IgG1	n-Zahl
1.)	X	-	-	-	8
2.)	-	X	-	-	7
3.)	X	-	X	-	5
4.)	-	X	X	-	8
5.)	-	X	-	X	6

3. Ergebnisse

3.3.1 Reduktion des myokardialen I/R-Schadens durch Nitrit

Zunächst wurde den Mäusen analog zu Kapitel 3.3 48 nmol Nitrat oder 48 nmol Nitrit intraventrikulär appliziert.

Wie bereits von der Arbeitsgruppe Duranski¹⁰² gezeigt wurde, konnte auch in dieser Arbeit der kardioprotektive Effekt von Nitrit verifiziert werden:

Die Applikation von Nitrit reduzierte die Infarktgröße/AAR von $30 \pm 3\%$ auf $13 \pm 4\%$ ($p < 0,001$) (s. Abb. 19).

Diese Verringerung entspricht einer Verkleinerung der Infarktgröße um ca. 58% und bestätigt damit die Ergebnisse anderer Arbeiten^{73,102}.

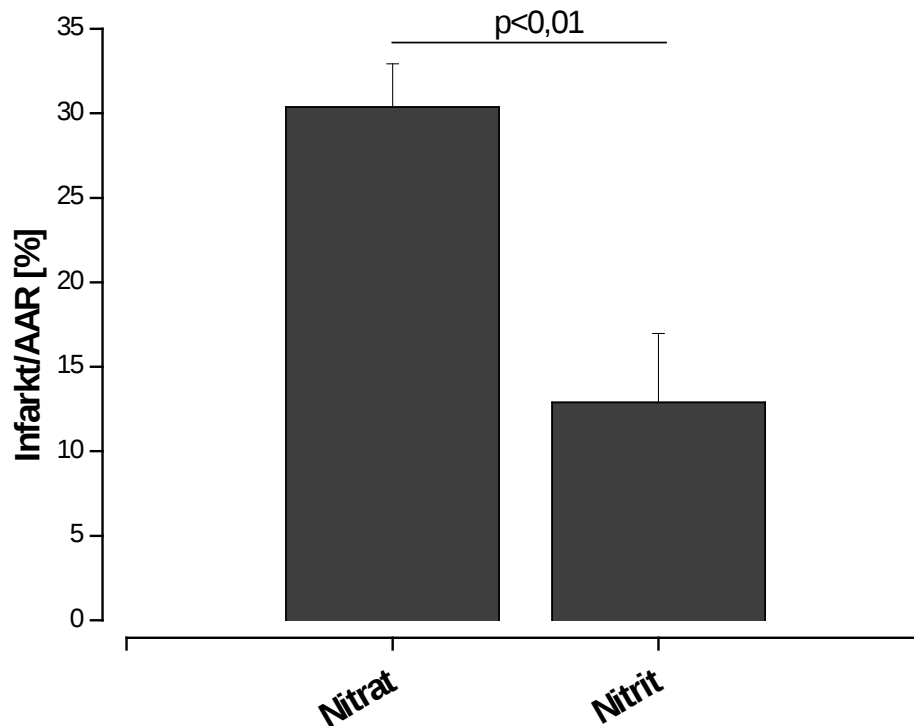


Abb. 19: Die Applikation von Nitrit limitiert den I/R-Schaden signifikant ($p < 0,001$; Mittelwerte (MW $\pm$ SD) aus $n = 8$ Experimenten).

3. Ergebnisse

3.3.2 Effekt der Inhibition von MIF mittels anti-MIF-Antikörper

Im nächsten Schritt wurde MIF durch die intraperitoneale Applikation von 200 µg eines monoklonalen anti-MIF-Antikörpers neutralisiert¹²⁴. Die Operation wurde 16 h nach der Applikation durchgeführt. Analog zu dem bisherigen Vorgehen wurde der Kontrollgruppe 48 nmol Nitrat und der Vergleichsgruppe 48 nmol Nitrit intraventrikulär verabreicht.

Nach der videoplanimetrischen Analyse der Infarktgebiete zeigte sich, dass der Effekt, den Nitrit nachweislich auf den ischämischen Bereich auswirkt, nach der Anwendung des MIF-Antikörpers nicht mehr nachweisbar war (s. Abb. 20): Der Infarkt/AAR der Gruppe mit Applikation von Nitrat und anti-MIF war mit $25 \pm 6\%$ der der Gruppe mit alleiniger Nitrat-Applikation vergleichbar ($30 \pm 2\%$).

Jedoch zeigte sich, dass beim Einsatz von anti-MIF die Applikation von Nitrit im Vergleich zur Nitratkontrollgruppe zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße/AAR führte ($25 \pm 6\%$ versus $25 \pm 7\%$, $p < 0,05$).

Dies spricht dafür, dass die kardioprotektive Wirkung von Nitrit in Anwesenheit eines funktionsuntüchtigen MIF aufgehoben ist.

Als Isotyp-Kontrolle für den Antikörper diente ein Ansatz, in dem statt des anti-MIF-Antikörpers IgG1 intraperitoneal injiziert wurde. Das Ergebnis der Infarktgrößenbestimmung ergab eine Infarktgröße/AAR von $12 \pm 5\%$ (s. Abb. 20).

Dieses Ergebnis ist nicht signifikant verschieden von der Gruppe mit alleiniger Nitrit-Applikation ($p > 0,05$).

3. Ergebnisse

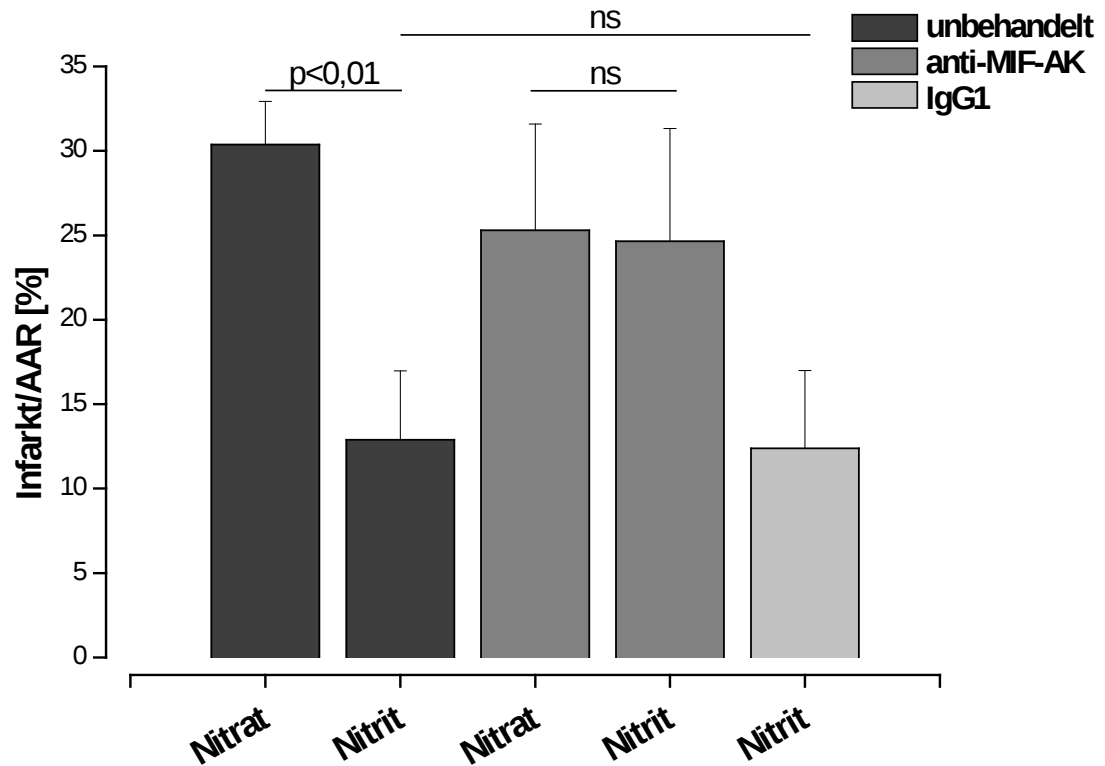


Abb. 20: Die Applikation von Nitrit vermindert den myokardialen I/R-Schaden (linke beiden Säulen; $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu hebt die Applikation des anti-MIF-Antikörpers diese kardioprotektive Wirkung des Nitrats auf (mittlere beiden Säulen; $p > 0,05$). Die Applikation von IgG1 (rechte Säule) dient als Isotyp-Kontrolle für den anti-MIF-Antikörper und zeigt ein ähnlich großes Infarktareal wie die lediglich mit Nitrit behandelten Mäuse (nicht signifikant ($p > 0,05$)); Mittelwerte ($MW \pm SD$) aus $n = 8$ Experimenten).

3. Ergebnisse

In allen untersuchten Gruppen waren die AAR/LV untereinander nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$, s. Abb. 21).

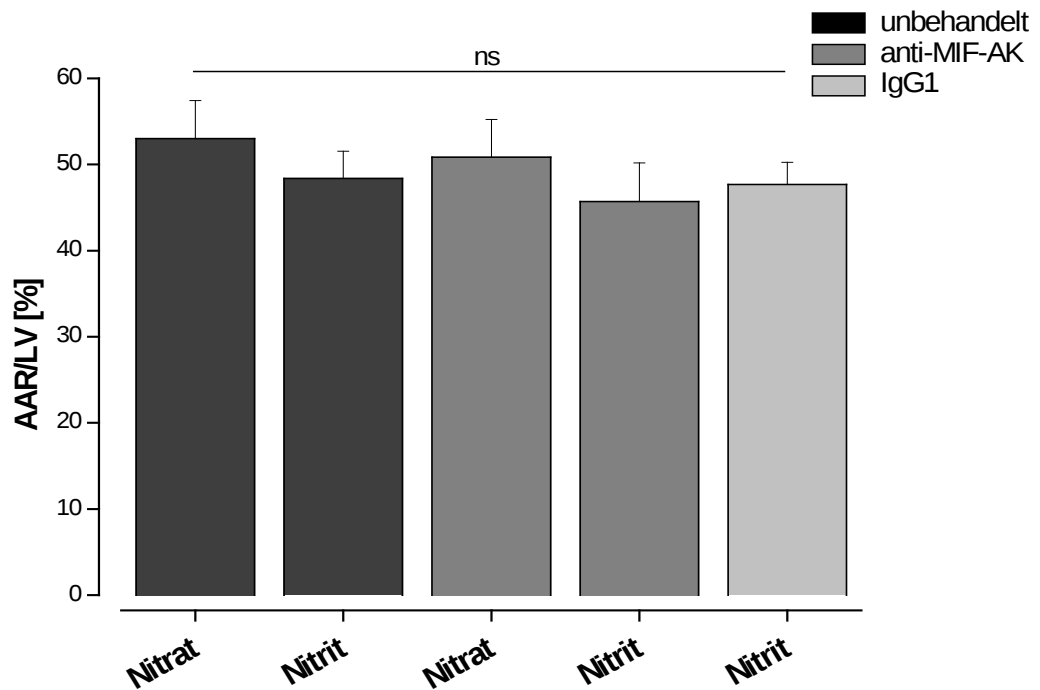


Abb. 21: Der Vergleich der AAR/LV zeigt in allen fünf Gruppen kein signifikant unterschiedliches Ergebnis ($p > 0,05$; Mittelwerte (MW $\pm$ SD) aus $n = 8$ bzw. $n = 6$ voneinander unabhängigen Experimenten), so dass die oben gezeigten Ergebnisse unabhängig von der Methode sind.

3. Ergebnisse

3.4 Mechanismus der Kardioprotektion: Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies

Durch die Ischämie kommt es zu einer funktionellen Schädigung der Mitochondrien, die sich in einer Verringerung der ATP-Synthese und Defekte der mitochondrialen Enzyme äußert. Durch die sich anschließende Reperfusion werden an den Mitochondrien reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert, die eine weitere Schädigung der mitochondrialen Enzyme induzieren.

3.4.1 Bestimmung der Peroxidase-Aktivität von MIF bzw. MIF-SNO

Um MIF oder MIF-SNO auf das Vorhandensein einer Peroxidaseaktivität zu untersuchen, wurde die Messung der H_2O_2 -Konzentration nach einem leicht modifizierten Protokoll des Amplex Red[®] Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit durchgeführt (s. Abb. 22).

Durch den alleinigen Einsatz von MIF bzw. MIF-SNO anstelle der HRP – und ohne Zugabe einer zusätzlichen Peroxidase – wiese eine Oxidation des A6550 zu Resorufin auf eine eigene Peroxidaseaktivität von MIF/MIF-SNO hin.



Abb. 22: Modifikation des Amplex Red[®] Assays zur Detektion einer Peroxidase-Aktivität

In den verschiedenen Ansätzen zu diesem Versuch konnte weder mit MIF noch mit MIF-SNO die Bildung des Resorufins beobachtet werden.

Somit kann für MIF und MIF-SNO in diesem Assay keine Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden.

3.4.2 Interaktion von MIF bzw. MIF-SNO mit der Wasserstoffperoxid-Konzentration in vitro

Durch eine weitere Modifikation des Amplex Red[®] Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assays war es möglich, MIF bzw. MIF-SNO auf eine po-

3. Ergebnisse

tentielle Interaktion mit H_2O_2 /Scavenger-Funktion hin zu untersuchen (s. Abb. 23).

Dazu wurde MIF bzw. MIF-SNO dem Assay-Ansatz hinzugefügt und die Fluoreszenz gemessen. Eine Abnahme der Fluoreszenz entspräche dabei der verringerten H_2O_2 -Konzentration und damit dem Vorliegen eines Scavenging-Effektes. Sollten die Proteine einen Scavenging-Effekt besitzen und die H_2O_2 -Konzentration in der Probe verringern, sollte dies durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität detektiert werden können.

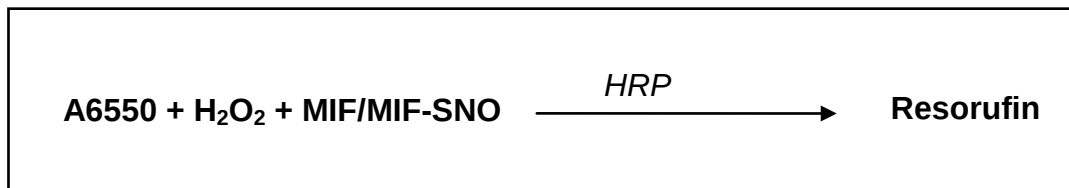


Abb. 23: Modifikation des Amplex Red[®] Assays zur Detektion einer Scavenger-Funktion

Zu einer definierten H_2O_2 -Konzentration (8 μM) wurde 8 μM MIF hinzugefügt, wobei die Abnahme der H_2O_2 -Konzentration um $6 \pm 0,02\%$ auf ca. 7,52 μM beobachtet werden konnte.

Dies spricht dafür, dass MIF in der Lage ist, H_2O_2 abzufangen – zu scavengen (s. Abb. 24).

Diesem Versuch entsprechend wurde anschließend 8 μM S-nitrosiertes MIF (MIF-SNO) eingesetzt.

Die vorangehende S-Nitrosierung des Proteins bewirkte eine Steigerung des Scavenging-Effekts. MIF-SNO war in der Lage, die H_2O_2 -Konzentration stärker zu senken als nicht S-nitrosiertes MIF (s. Abb. 24). Die Abnahme der H_2O_2 -Konzentration von 8 μM auf 6,9 μM entspricht dabei einer Reduktion der H_2O_2 -Konzentration um $14 \pm 0,01\%$.

3. Ergebnisse

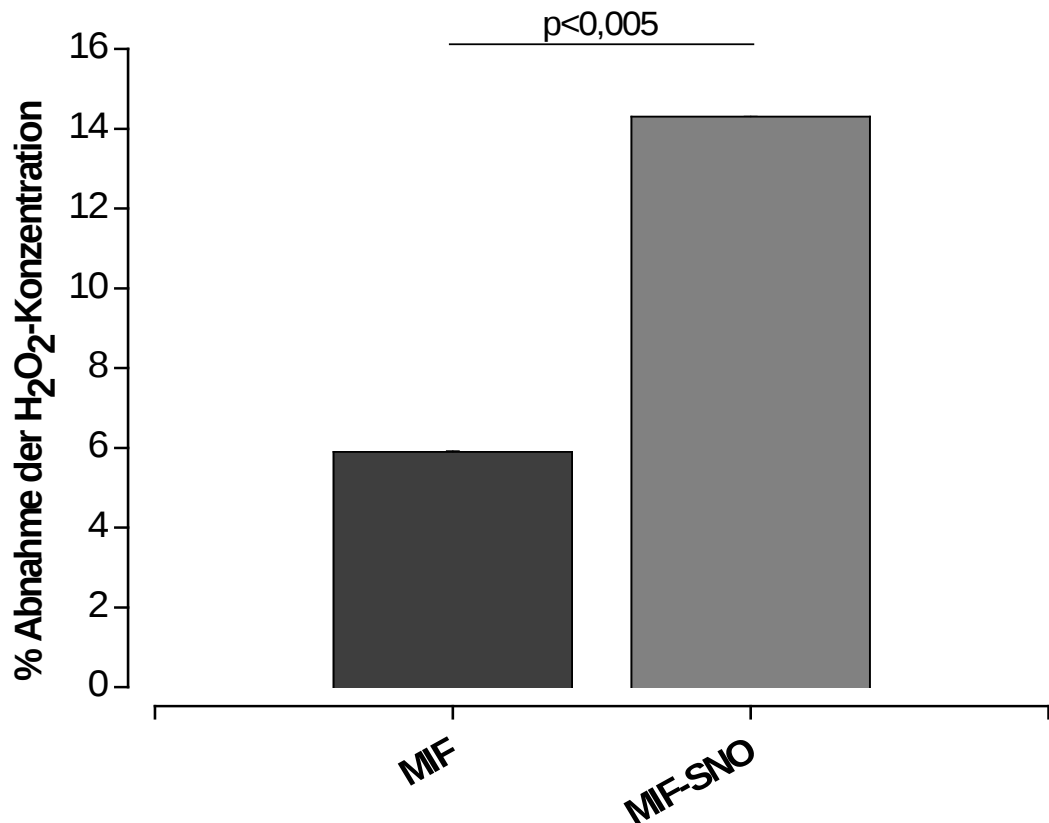


Abb. 24: Die H₂O₂-Konzentration konnte durch MIF um $5,9 \pm 0,02\%$ gesenkt werden. MIF-SNO steigerte das Scavenging von H₂O₂ auf $14,3 \pm 0,01\%$ ($p < 0,005$; Mittelwerte (MW $\pm$ SD) aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten).

3.4.3 Die Aconitase-Aktivität als Parameter für oxidative Schädigung der Mitochondrien

Die Aconitase als Enzym des Citratzyklus ist sensitiv gegenüber oxidativem Stress. Da sie durch ROS, vor allem durch Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid inaktiviert wird¹²², dient die Messung ihrer Aktivität als indirekter Marker für Schäden durch ROS.

Für die folgenden Versuche wurden wildtypische Mäuseherzen entnommen und nach dem *ex vivo* Protokoll behandelt (s. Kapitel 2.9). Nach einer fünfminütigen Reperfusion und entsprechender Probenvorbereitung konnte die Aconitase-Aktivität als Marker für oxidativen Stress spektrophotometrisch bestimmt werden (s. Kapitel 2.11.2).

Dabei wurden Herzen von wildtypischen Mäusen mit Nitrit oder Nitrat perfundiert (s. Abb. 25). Außerdem wurde einigen Mäusen vor der Herzex-

3. Ergebnisse

plantation der anti-MIF-Antikörper appliziert, der das zirkulierende MIF neutralisiert. So entstanden vier Gruppen unterschiedlich behandelter Tiere (s. Tab. 3):

Tab. 3: Übersicht über die Behandlung der vier verschiedenen Gruppen vor Messung der Aconitase-Aktivität

	Behandlung der Mäuse		
	<i>Nitrat</i>	<i>Nitrit</i>	<i>anti-MIF-Antikörper</i>
1.)	X	-	-
2.)	-	X	-
3.)	X	-	X
4.)	-	X	X

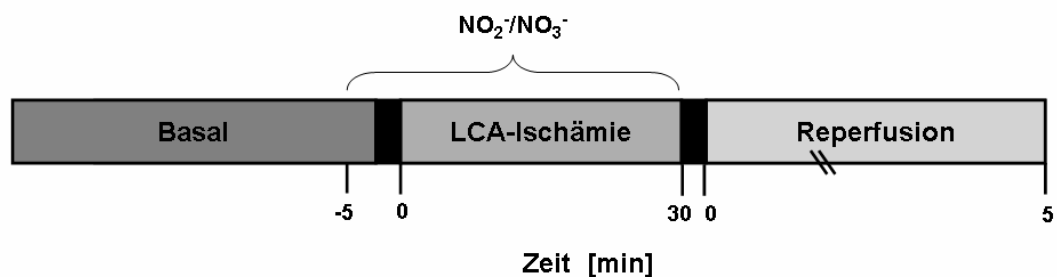


Abb. 25: Protokoll der *ex vivo* Methodik. Die Applikation der verschiedenen Substanzen erfolgte jeweils zu den abgebildeten Zeitpunkten.

Wie in Abb. 26 erkennbar ist, zeigt die Aconitase nach der Perfusion mit Nitrat eine Aktivität von $1,25 \pm 0,48$ mU/mg Protein. Nach der Applikation von Nitrit wurde deutlich, dass die Aktivität weniger stark gehemmt wurde ($2,1 \pm 0,56$ mU/mg Protein).

Die Applikation des anti-MIF-Antikörpers zeigte Ergebnisse, die mit den Resultaten der *in vivo* Operationen korrelierten:

Durch die Applikation des Antikörpers wurde die protektive Wirkung des Nitrits auf das mitochondriale Enzym aufgehoben. Der Schaden durch die I/R wurde größer: die Aconitase-Aktivität betrug in der Gruppe, die mit Nitrat und anti-MIF-Antikörper behandelt wurde, $0,75 \pm 0,27$ mU/mg Protein und in der Gruppe mit Nitrit und anti-MIF-Antikörper $0,63 \pm 0,14$ mU/mg Protein (s. Abb. 26).

3. Ergebnisse

Es kann beobachtet werden, dass die Behandlung mit Nitrit allein weniger hemmend auf die Aconitase wirkt.

Hinzu kommt, dass dieser Effekt durch die Neutralisation des MIF aufgehoben wird. Dies spricht dafür, dass die protektive Wirkung des Nitrits auf die Aktivität der Aconitase durch die Anwesenheit von MIF bedingt wird.

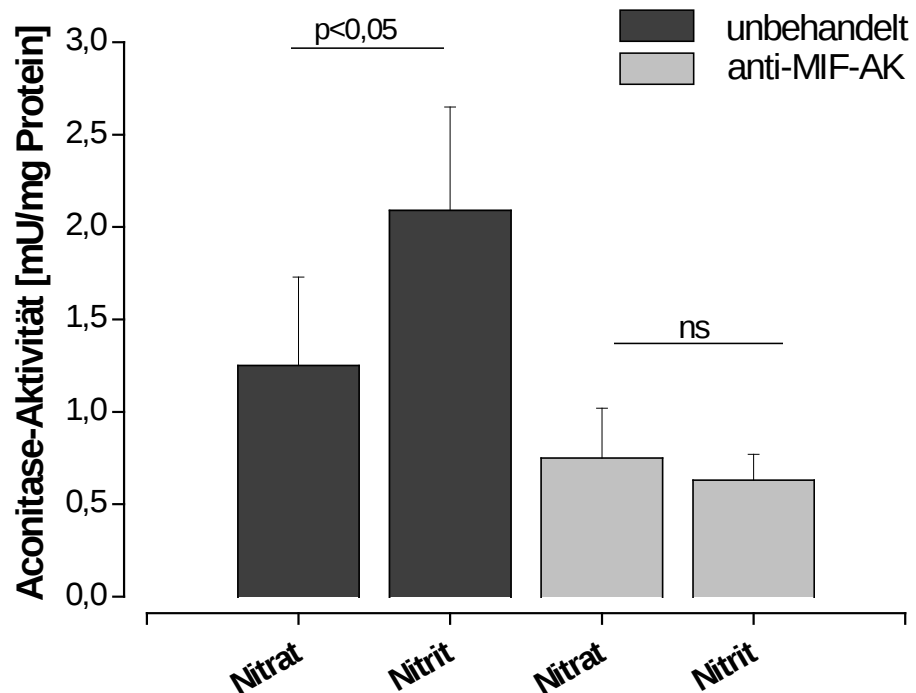


Abb. 26: Die Messung der Aconitase-Aktivität ergab, dass der Schutz der Aconitase, der durch Nitrit vermittelt wird, durch die Applikation des anti-MIF-Antikörpers aufgehoben wird ($p < 0,005$; Mittelwerte (MW $\pm$ SD) aus $n = 3$ voneinander unabhängigen Experimenten).

4. Diskussion

4.1 S-Nitrosierung des Cysteins 81 des Macrophage Migration Inhibitory Factor mittels der Nitritreduktasefunktion desoxygenierten Myoglobins

Die S-Nitrosierung eines Proteins wurde bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführt. Allerdings wurden hierfür bisher vor allem NO-Donoren oder NO-Gas genutzt.

Da Nitrit durch verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Systeme zu NO reduziert werden kann¹²⁵, stellte sich die Frage nach einer Möglichkeit, MIF oder andere Proteine über eines dieser Systeme zu S-nitrosieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Methode der S-Nitrosierung etabliert werden, bei welcher die Pathophysiologie eines ischämischen Herzens während der I/R nachgestellt werden kann. Da desoxygeniertes Myoglobin den Hauptmechanismus der Nitritreduktion im Myokard während der I/R darstellt^{65,67}, wurde in der vorliegenden Arbeit ein dementsprechender Ansatz gewählt. Die S-Nitrosierung von MIF wurde erreicht, indem Nitrit über die Nitritreduktasefunktion von desoxyMb zu NO reduziert wurde, so dass das gebildete NO an MIF binden konnte.

In den Versuchen zur S-Nitrosierung konnte zunächst gezeigt werden, dass $47 \pm 15\%$ der SH-Gruppen von MIF durch NO besetzt werden (s. Abb. 13). Dies zeigt, dass NO entweder an einem oder an zwei Cysteinen bindet, was dadurch zu erklären ist, dass der Redoxstatus von MIF vorher nicht bestimmbar war. In den Versuchen zur Identifikation des S-nitrosierten Cysteins wurde jedoch deutlich, dass lediglich die C81S-Mutante des MIF keine S-Nitrosierung erfährt (s. Abb. 14). Dies heißt im Umkehrschluss, dass NO nur am Cystein 81 bindet.

Einerseits muss bei diesem Ergebnis bedacht werden, dass für die Mutante C81S im Gegensatz zu den anderen Mutanten Konformationsänderungen beschrieben wurden¹⁶. Andererseits ist jedoch bekannt, dass zwei der drei Cysteine – C57 und C60 – eine Disulfidbrückenbindung eingehen, während das Cystein 81 keine intramolekularen Bindungen besitzt¹⁴. Durch die kovalente Bindung zwischen den Schwefel-Atomen der Cysteine des CALC-

4. Diskussion

Motiv ist dort keine mögliche Bindungsstelle für NO vorhanden. Dadurch ist erklärbar, warum eine S-Nitrosierung allein des Cysteins 81 detektiert wurde. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Cysteine des CALC-Motiv für die Oxidoreduktasefunktion von MIF verantwortlich sind, während das Cystein 81 keinerlei Einfluss auf die enzymatische Funktion des Proteins ausübt¹⁵. Es bleibt damit fraglich, ob die S-Nitrosierung einen Einfluss auf die Oxidoreduktasefunktion ausüben kann. Mögliche Konformationsänderungen durch die S-Nitrosierung und deren Auswirkungen auf das CALC-Motiv sind bisher nicht untersucht worden.

Kürzlich wurde von Jung et al.¹⁶ gezeigt, dass neben einer indirekten Interaktion zwischen MIF und p53 auch eine direkte ohne weitere Interaktionspartner existiert. Durch die transiente Transfektion von MIF(-Mutanten) und p53 in HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass MIF und p53 Komplexe bilden. Diese Komplex-Formation findet jedoch nur dann statt, wenn das Cystein 81 anwesend ist, denn Versuche mit der Mutante C81S zeigten keine Komplexbildung. Die beiden anderen Cysteine scheinen bei der Regulation des p53 keine Rolle zu spielen. Weiterhin wurde deutlich, dass die Interaktion zwischen den Cysteinen von MIF und p53 abhängig vom Redox-Status der Zelle ist. Inwieweit die S-Nitrosierung des Cysteins 81 die Interaktion mit p53 beeinflusst, ist bisher nicht geklärt.

Insgesamt zeigt dieser Versuchsansatz also die Möglichkeit der S-Nitrosierung von MIF durch Nitrit im Rahmen der I/R durch die dann vorherrschende Reduktion von Nitrit zu NO via desoxyMb. Funktionelle Aspekte bleiben bisher aber unklar.

4.2 Die maximal kardioprotektive Nitrit-Dosis während der I/R

Die Nitrit-medierte Reduktion des myokardialen I/R-Schadens ist in mehreren I/R-Studien nachgewiesen worden. Das Nitrit-Dosis-Wirkungsprofil der Bolus-Injektion von Nitrit wurde von Duranski et al. als U-förmig mit einer signifikanten Infarktverringerng zwischen 2,4 nmol bis 960 nmol und einer höchsten Effektivität bei 48 nmol beschrieben¹⁰². In dieser Arbeit wurden die Infarktgrößen nach einmaliger Gabe von entweder 48 nmol oder 96 nmol Nitrit in einem ex vivo Modell verglichen. In Konsens mit Duranski et al. zeigt

sich hier mit der Applikation von 48 nmol Nitrit eine Verringerung der Infarktgröße um 30,1% (s. Abb. 16). Gemäß diesem Resultat konnten dann auch alle *in vivo* Versuche zur I/R mit einer Bolus-Gabe von 48 nmol Nitrit durchgeführt werden.

4.3 Verlust der Nitrit-medierten Kardioprotektion durch die Neutralisation von MIF

Die kardioprotektive Wirkung des Nitrits während der myokardialen I/R ist bekannt¹⁰² und wird durch dessen Reduktion zu NO durch desoxygeniertes Myoglobin erklärt⁶⁷. Ebenso ist bekannt, dass MIF kardioprotektiv wirkt. In den entsprechenden Versuchen zeigte sich bei MIF-defizienten Mäusen ein signifikant größeres Infarktareal als bei wildtypischen Mäusen im selben I/R-Modell⁴³.

Die Applikation des neutralisierenden anti-MIF-Antikörpers hätte demnach zu einer Vergrößerung des Infarktgebietes führen sollen. Allerdings zeigt sich hier kein Unterschied zur Kontrollgruppe (s. Abb. 20). Dieser Effekt ist bisher noch nicht völlig verstanden, jedoch bieten sich unterschiedliche Erklärungsansätze. Einerseits könnte die positive Wirkung von MIF allein über intrazellulär lokalisiertes MIF vermittelt werden, das zwar durch die genetischen Deletion im Knockout-Modell, nicht aber durch die Behandlung mit dem Antikörper entfernt wird. Andererseits sind die Effekte der genetische Deletion von MIF in Bezug auf die Maus noch nicht endgültig geklärt. In Bezug auf die kardioprotektive Wirkung des Nitrits ließ sich jedoch ein Effekt nachweisen. Die Applikation von Nitrit bewirkt keine Reduktion des infarzierten Areals, wenn MIF durch den Antikörper neutralisiert wird (s. Abb. 20). Dieser Effekt kann durch die durchgeführte Isotyp-Kontrolle eindeutig dem spezifischen anti-MIF-Antikörper zugeordnet werden und stellt kein Artefakt des Antikörpers dar. Dies lässt die Überlegung zu, dass die kardioprotektive Wirkung von Nitrit über (extrazellulär lokalisiertes) MIF vermittelt wird. Über welche Mechanismen diese Interaktion stattfindet, und ob es sich dabei *in vivo* um eine S-Nitrosierung von MIF handelt, ist noch unklar. Hierzu sollten weitere Nachweise der S-Nitrosierung geführt werden. Beispielsweise könnte man

4. Diskussion

die S-Nitrosierung *in vivo* mittels NMR- oder EPR-Spektroskopie oder mittels *Biotin Switch Assay* überprüfen.

Eine mögliche Interaktion könnte über die AMPK ablaufen. Sowohl MIF als auch Stickstoffmonoxid aktivieren die AMPK und reduzieren so durch die Regulation des Energiehaushalts den I/R-Schaden^{43,126,127}. Auch die Regulation der ERK1/2 kann als Erklärung für den über MIF vermittelten Nitrit-Effekt dienen. Die Aktivierung der ERK1/2 scheint für die Verringerung der Apoptose durch NO verantwortlich zu sein¹²⁸, ebenso vermittelt MIF seinen anti-apoptotischen Effekt über die Aktivierung der ERK1/2 und die *downstream* Regulation von p53²⁰. Die Identifikation eines Mechanismus der Interaktion zwischen Nitrit/NO und MIF kann als Ziel für weitergehende Untersuchungen angesehen werden.

4.4 Mechanismus der Kardioprotektivität von MIF und Nitrit: Reduktion der oxidativen Proteinschädigung durch eine verringerte Radikalbildung

Die Aufklärung des Mechanismus der Kardioprotektivität von Nitrit und MIF steht noch am Anfang. Die Studie von Miller et al. weist darauf hin, dass MIF seine zytoprotektiven Effekte über die Beeinflussung des ATP- und Glukosestoffwechsels vermittelt⁴³. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der Regulation der Kalium- und Calciumkonzentration vor allem die Limitierung oxidativer Schäden zu den kardioprotektiven Mechanismen des zu NO reduzierten Nitrits zählt. So stellt sich heraus, dass die Applikation von Nitrit während der I/R zu einer S-Nitrosierung des Komplex I der Atmungskette und damit zu einer reduzierten Generierung reaktiver Sauerstoffspezies führt⁷³. Darauf aufbauend konnte der protektive Effekt auf mitochondriale Proteine am Beispiel der Aconitase demonstriert werden⁶⁷. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die gemeinsame Wirkung von Nitrit und MIF auf Parameter des oxidativen Stresses zu untersuchen.

4.4.1 Peroxidase-Funktion und Scavenging von Wasserstoffperoxid

In der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels des Amplex Red[®] Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay keine Peroxidase-Funktion von MIF bzw. MIF-

4. Diskussion

SNO nachgewiesen werden. Aufgrund der Struktur von MIF erscheint eine Peroxidase-Aktivität jedoch wahrscheinlich. Genau wie MIF besitzen einige Proteine der Peroxiredoxin-Familie wie z.B. Thioredoxin oder Glutaredoxin ein CXXC-Motiv in ihren aktiven Zentren und weisen weitere strukturelle Ähnlichkeiten auf¹²⁹. Sie gehören zu den Proteinen mit einer Oxidoreduktase-Aktivität und weisen darüber hinaus eine Peroxidase-Funktion auf.

Die für den Assay vorgesehene Meerrettichperoxidase reduziert H_2O_2 , bindet das freie Sauerstoffatom an ihrem Häm und oxidiert dann das Substrat A6550 zu dem rot fluoreszierenden Resorufin. Besitzt eine Peroxidase keine Häm-Gruppe, sondern entweder ein redox-aktives Cystein oder ein Selenocystein zur Ausübung der Peroxidase-Aktivität, so ist der Ablauf der Entgiftung von H_2O_2 unterschiedlich. Am Beispiel der Cytochrom c-Peroxidase wurde deutlich, dass das am Häm gebundene Sauerstoffatom das zur Entgiftung nötige zweite Elektron nicht vom Porphyrin-Ring, sondern von einem Tryptophan-Rest erhält¹³⁰. Im Fall des Thioredoxin-Systems gestaltet sich die Peroxidase-Funktion erneut anders. Wasserstoffperoxid wird hier mittels der Thioredoxin-Peroxidase (TPx) neutralisiert, indem die beiden Cysteine des CXXC-Motivs oxidiert werden. Im Anschluss wird die TPx durch Trx reduziert, woraufhin dann Trx durch die Thioredoxin-Reduktase und NADPH reduziert wird¹³¹. Aufgrund der großen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten mit Trx ist ein ähnlicher Mechanismus auch für MIF denkbar und würde das negative Ergebnis in diesem Assay erklären. MIF könnte H_2O_2 neutralisieren, indem es selbst durch die redox-aktiven Cysteine in seinem CALC-Motiv oxidiert wird. Dann würde eine weitere Reduktase – wie im Trx-System die Thioredoxin-Reduktase – benötigt, um MIF zu reduzieren und das im Assay eingesetzte A6550 zu Resorufin zu oxidieren. In dem hier genutzten Assay wurde neben MIF kein weiteres Enzym eingesetzt. So kann vermutet werden, dass MIF zwar als Peroxidase fungiert, diese Aktivität jedoch in dem hier gewählten Versuchsansatz nicht festgestellt werden konnte. Dieser Mechanismus könnte auch die Ergebnisse der Scavenging-Untersuchungen erklären. Die Reduktion der H_2O_2 -Konzentration wäre dadurch erklärbar, dass MIF in seinem aktiven Zentrum durch ein Sauerstoffatom des Wasserstoffperoxids oxidiert wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass S-nitrosiertes MIF die Reduktion der H_2O_2 -Konzentration steigert, so

4. Diskussion

dass die S-Nitrosierung des Cystein 81 evtl. einen Effekt auf das katalytische Zentrum des Enzyms ausübt (s. Abb. 24).

4.4.2 Interaktion mit der Aconitase-Aktivität

Das mitochondriale Enzym Aconitase wird durch reaktive Sauerstoffspezies während der I/R geschädigt, so dass die Aktivität der Aconitase als Parameter für oxidative Proteinschädigung gesehen werden kann. Je geringer die Aktivität der Aconitase, desto größer ist der oxidative Schaden am Enzym. Shiva et al. haben gezeigt, dass aus Leberzellen isolierte Mitochondrien nach hepatischer I/R eine geringere Aconitase-Aktivität aufweisen. Durch die Applikation von 48 nmol Nitrit während der I/R wird die Aconitase-Aktivität weniger stark gehemmt, so dass Nitrit einen Schutz vor oxidativer Proteinschädigung darstellt⁷³. Im myokardialen *ex vivo* I/R-Modell konnte ebenfalls verdeutlicht werden, dass die Behandlung mit Nitrit zu einer weniger reduzierten Aconitase-Aktivität führt, da Nitrit zu NO reduziert wird und so durch eine Hemmung des mitochondrialen Komplex I zu einer Reduktion der ROS-Bildung führt⁶⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Nitrit und der Hemmung von MIF auf die Aconitase-Aktivität untersucht. Im ersten Schritt konnten die bereits vorliegenden Ergebnisse in einem *ex vivo* Modell verifiziert werden, da die Behandlung mit Nitrit eine geringere Hemmung der Aconitase zur Folge hatte (s. Abb. 26). Im nächsten Schritt wurde der anti-MIF-Antikörper eingesetzt. Dies hatte zur Folge, dass der Effekt, den Nitrit auf die Aconitase ausübt, nicht mehr erfolgte. Obwohl eine der beiden Gruppen mit Nitrit behandelt wurde, wurde die gleiche Aconitase-Aktivität gemessen wie in der Kontrollgruppe der mit Nitrat behandelten Mäuse (s. Abb. 26). Dies spricht dafür, dass Nitrit nur dann zytoprotektiv wirken kann, wenn MIF anwesend ist.

4.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurde anhand von *in vitro* Versuchen eine direkte Interaktion zwischen NO und MIF im Sinne einer S-Nitrosierung nachgewiesen. Durch Infarktstudien erhielt man starke Hinweise darauf, dass Nitrit ei-

4. Diskussion

nen Teil seiner protektive Wirkung über MIF ausübt. Als Mechanismus dafür wurde eine Reduktion des bei der I/R entstehenden oxidativen Stresses ermittelt. Zur Erklärung des genauen Mechanismus des Zusammenwirkens von Nitrit und MIF sind weitere Versuche nötig. Zum einen bedarf es des Nachweises der S-Nitrosierung von MIF *in vivo* beispielsweise mittels NMR- oder EPR-Analyse oder *Biotin Switch Assay*, zum anderen wird es nötig sein, das *downstream signaling* von MIF und Nitrit anhand von Assays über die AMPK, ERK1/2 und p53 durch Immunoblots/Immunhistochemie und Bindungsassays aufzuklären. Weiterhin sollten Infarktstudien an MIF-defizienten Mäusen durchgeführt werden, um dort den Effekt einer Nitrit-Applikation zu untersuchen. Zur Klärung der physiologischen Relevanz könnte außerdem die Untersuchung hämodynamischer Parameter wie z.B. der Ejektionsfraktion oder des linksventrikulären Drucks relevant sein.

5. Zusammenfassung

Entgegen bisheriger Annahmen ist Nitrit kein inertes Oxidationsprodukt von Stickstoffmonoxid (NO). Entlang eines physiologischen Sauerstoffgradienten wird Nitrit zu NO reduziert. Somit gilt Nitrit als endokriner Speicher von NO, der zur Regulierung der Zirkulation und zellulärer Effekte aktiviert werden kann. Im Myokard reduziert Nitrit den Ischämie-/Reperfusionsschaden und wirkt somit kardioprotektiv. Als Mechanismus gilt dabei die Reduktion des Nitrits zu NO unter ischämischen Bedingungen. Myoglobin liegt während der Ischämie in seiner desoxygenierten Form vor, welche als Nitritreduktase fungiert. Auch das Zytokin Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) besitzt eine kardioprotektive Wirkung durch die Regulation des zellulären Energiehaushaltes nach der Ischämie. Inwieweit sich diese beiden Faktoren in der I/R gegenseitig beeinflussen, ist bisher unklar.

Durch eine *in vitro* Untersuchung konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass NO an die Cysteine von MIF bindet, also eine so genannte S-Nitrosierung stattfindet. Diese S-Nitrosierung wird über das Cystein 81 vermittelt. In Infarktstudien an wildtypischen Mäusen wurde verdeutlicht, dass die kardioprotektive Wirkung von Nitrit nur in Anwesenheit von MIF auftritt. Als Mechanismus der Kardioprotektion wurden in *ex vivo* Untersuchungen die Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies und die konsekutive Verringerung oxidativer Proteinschädigung nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit liefert erste Erkenntnisse zum Mechanismus der Wirkung von Nitrit auf den myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden. Die Aufklärung der Nitrit-Wirkung kann dazu verhelfen, einen therapeutischen Ansatz für den Reperfusionsschaden nach einem akuten Myokardinfarkt zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 1966;153(731):80-82.
2. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1966;56(1):72-77.
3. Johnson WH, Czerwinski RM, Stamps SL, Whitman CP. A kinetic and stereochemical investigation of the role of lysine-32 in the phenylpyruvate tautomerase activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry*. 1999;38(48):16024-16033.
4. Nathan CF, Remold HG, David JR. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J. Exp. Med.* 1973;137(2):275-290.
5. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993;365(6448):756-759.
6. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 1994;179(6):1895-1902.
7. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* 1999;189(2):341-346.
8. Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, Kleemann R, Bernhagen J, Ihling C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(13):1561-6.
9. Yu C, Lai KW, Chen Y, Huang X, Lan HY. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(5):625-31.
10. Zernecke A, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117(12):1594-602.
11. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5191-6.
12. Mühlhahn P, Bernhagen J, Czisch M, Georgescu J, Renner C, Ross A, Bucala R, Holak TA. NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci.* . 1996;5(10):2095–2103.

6. Literaturverzeichnis

13. Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.* 1996;10(14):1607-1613.
14. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Jüttner S, Brunner H, Bernhagen J. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol.* 1998;280(1):85-102.
15. Kleemann R, Mischke R, Kapurniotu A, Brunner H, Bernhagen J. Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes. *FEBS Lett.* 1998;430(3):191-196.
16. Jung H, Seong HA, Ha H. Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity. *J. Biol. Chem.* 2008;283(29):20383-20396.
17. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* 2003;197(11):1467-1476.
18. Jasanoff A, Wagner G, Wiley DC. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein li. *EMBO J.* 1998;17(23):6812-6818.
19. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity.* 2006;25(4):595-606.
20. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol. Endocrinol.* 2007;21(6):1267-1280.
21. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* 2007;13(5):587-96.
22. Tarzami ST, Miao W, Mani K, Lopez L, Factor SM, Berman JW, Kitsis RN. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation.* 2003;108(19):2387-2392.
23. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis From Pathophysiology to Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54(23):2129-2138.

6. Literaturverzeichnis

24. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in Atherosclerosis. An Update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008.
25. Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Noncanonical Chemokine Important in Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2009;19(3):76-86.
26. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;340(2):115-126.
27. Lin SG, Yu XY, Chen YX, Huang XR, Metz C, Bucala R, Lau CP, Lan HY. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ. Res.* 2000;87(12):1202-1208.
28. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, Bucala R, Weber C. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(3):380-385.
29. Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, Graffy C, Garlich CD, Böckler D, Menschikowski D, Braun-Dullaeus R, Daniel WG, Strasser RH. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability. *Atherosclerosis.* 2005;178(1):83-94.
30. Pan JH, Lindholt JS, Sukhova GK, Baugh JA, Henneberg EW, Bucala R, Donnelly SC, Libby P, Metz C, Shi G. Macrophage migration inhibitory factor is associated with aneurysmal expansion. *J. Vasc. Surg.* 2003;37(3):628-635.
31. Verschuren L, Lindeman JHN, van Bockel JH, Abdul-Hussien H, Kooistra T, Kleemann R. Up-regulation and coexpression of MIF and matrix metalloproteinases in human abdominal aortic aneurysms. *Antioxid. Redox Signal.* 2005;7(9-10):1195-1202.
32. Bach J, Deuster O, Balzer-Geldsetzer M, Meyer B, Dodel R, Bacher M. The role of macrophage inhibitory factor in tumorigenesis and central nervous system tumors. *Cancer.* 2009;115(10):2031-2040.
33. Wilson JM, Coletta PL, Cuthbert RJ, Scott N, MacLennan K, Hawcroft G, Leng L, Lubetsky JB, Jin KK, Lolis E, Medina F, Brieva JA, Poulson R, Markham AF, Bucala R, Hull MA. Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1485-1503.
34. Shun C, Lin J, Huang S, Lin M, Wu M. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 2005;11(24):3767-3771.
35. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.* 1999;5(3):181-191.

6. Literaturverzeichnis

36. Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ. Res.* 2003;93(4):321-329.
37. Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgott M, Büttner K, Browarzyk C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Müller F, Beck H, Büning H, Boekstegers P, Hatzopoulos AK. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J.* 2005;19(11):1576-1578.
38. Garner LB, Willis MS, Carlson DL, DiMaio JM, White MD, White DJ, Adams GA, Horton JW, Giroir BP. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2500-9.
39. Chagnon F, Metz CN, Bucala R, Lesur O. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ. Res.* 2005;96(10):1095-1102.
40. Lehmann L, Book M, Hartmann W, Weber S, Schewe J, Klaschik S, Hoeft A, Stueber F. A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study. *J Transl Med.* 2009;7(1):100.
41. Parrish WR, Gallowitsch-Puerta M, Czura CJ, Tracey KJ. Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: mediators and mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1144:210-236.
42. Takahashi M, Nishihira J, Shimpo M, Mizue Y, Ueno S, Mano H, Kobayashi E, Ikeda U, Shimada K. Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2001;52(3):438-45.
43. Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R, Young LH. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature.* 2008;451(7178):578-82.
44. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 2000;10(20):1247-1255.
45. Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):H643-649.
46. Xing Y, Musi N, Fujii N, Zou L, Luptak I, Hirshman MF, Goodyear LJ, Tian R. Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2003;278(31):28372-28377.

6. Literaturverzeichnis

47. Russell RR, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*. 2004;114(4):495-503.
48. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Förstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol*. 2000;57(1):68-74.
49. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J. Biol. Chem*. 1991;266(35):23790-23795.
50. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-918.
51. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch H, Gödecke A, Weber A, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006;107(7):2943-2951.
52. Joshi MS, Ferguson TB, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10341-6.
53. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic. Biol. Med*. 2006;40(2):295-302.
54. Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem*. 2000;275(11):7757-7763.
55. Zhang Z, Naughton DP, Blake DR, Benjamin N, Stevens CR, Winyard PG, Symons MC, Harrison R. Human xanthine oxidase converts nitrite ions into nitric oxide (NO). *Biochem. Soc. Trans*. 1997;25(3):524S.
56. Moriwaki Y, Yamamoto T, Suda M, Nasako Y, Takahashi S, Agbedana OE, Hada T, Higashino K. Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993;1164(3):327-330.
57. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(37):13683-8.

6. Literaturverzeichnis

58. Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 2006;3(4):277-287.
59. Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature.* 1994;368(6471):502.
60. Björne H, Petersson J, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L, Lundberg JO. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J. Clin. Invest.* 2004;113(1):106-114.
61. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.* 2003;9(12):1498-1505.
62. Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* 2003;278(47):46349-46356.
63. Brooks J. The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. *Proc R Soc Biol.* 1937;123:368-382.
64. Doyle MP, Pickering RA, DeWeert TM, Hoekstra JW, Pater D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J. Biol. Chem.* 1981;256(23):12393-12398.
65. Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res.* 2007;100(12):1749-54.
66. Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ. Res.* 2007;100(5):654-61.
67. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008.
68. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 2002;16(13):1775-85.

6. Literaturverzeichnis

69. Liu Z, Rudd MA, Freedman JE, Loscalzo J. S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998;284(2):526-534.
70. Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(12):4308-13.
71. Ng ESM, Jourdain D, McCord JM, Hernandez D, Yasui M, Knight D, Kubes P. Enhanced S-nitroso-albumin formation from inhaled NO during ischemia/reperfusion. *Circ Res.* 2004;94(4):559-565.
72. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res.* 2002;91(6):470-477.
73. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefer DJ, Gladwin MT. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med.* 2007;204(9):2089-102.
74. Reinartz M, Ding Z, Flögel U, Gödecke A, Schrader J. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased S-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. *J. Biol. Chem.* 2008;283(25):17440-9.
75. Jung H, Kim T, Chae HZ, Kim KT, Ha H. Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J. Biol. Chem.* 2001;276(18):15504-15510.
76. Thiele M, Bernhagen J. Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* 7(9-10):1234-48.
77. Antman EM, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC. ACC/AHA Guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation Research.* 2004;110(9):e82.
78. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
79. Taegtmeyer H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am. J. Cardiol.* 1998;82(5A):54K-60K.

6. Literaturverzeichnis

80. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1991;23(9):1077-1086.
81. Farber JL, Chien KR, Mitnacht S. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.* 1981;102(2):271-281.
82. Rocha M, Victor VM. Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effects of mitoquinone. *Med. Sci. Monit.* 2007; 13(7):RA132-145.
83. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation.* 2001;104(25): 3158-3167.
84. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* 2005;390(Pt 2):377-394.
85. Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 1990;265(12):6656-6663.
86. Ip JH, Levin RI. Myocardial preservation during ischemia and reperfusion. *Am. Heart J.* 1988;115(5):1094-1104.
87. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu. Rev. Med.* 1991;42:225-246.
88. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
89. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, post-ischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66(6):1146-1149.
90. Krug A, Du Mesnil de Rochemont W, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ. Res.* 1966;19(1):57-62.
91. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1984;16(6):497-518.
92. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649-1652.
93. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997;82(2):291-295.
94. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 1998;38(2):291-300.

6. Literaturverzeichnis

95. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998;30(12):2567-2576.
96. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 1994;28(9):1301-1311.
97. Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE, Entman ML. Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ. Res.* 1994;75(3):546-555.
98. Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 1995;147(1-2):13-19.
99. Belosjorow S, Schulz R, Dörge H, Schade FU, Heusch G. Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF-alpha concentration and myocardial infarct development in rabbits. *Am. J. Physiol.* 1999;277(6 Pt 2):H2470-2475.
100. Sack MN, Smith RM, Opie LH. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia - an anti-apoptotic perspective. *Cardiovasc. Res.* 2000;45(3):688-695.
101. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2002;53(1):31-47.
102. Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet S, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1232-40.
103. Jung KH, Chu K, Ko SY, Lee ST, Sinn DI, Park DK, Kim JM, Song EC, Kim M, Roh JK. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke.* 2006;37(11):2744-50.
104. Elrod JW, Greer JJM, Bryan NS, Langston W, Szot JF, Gebregzlabher H, Janssens S, Feelisch M, Lefer DJ. Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(7):1517-1523.
105. Siegfried MR, Carey C, Ma XL, Lefer AM. Beneficial effects of SPM-5185, a cysteine-containing NO donor in myocardial ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):H771-777.
106. Calvert JW, Lefer DJ. Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc. Res.* 2009;83(2):195-203.

6. Literaturverzeichnis

107. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001;33(11):1897-1918.
108. Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca^{2+} channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ. Res.* 1997;81(5):742-752.
109. Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca^{2+} channel α_1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 2006;98(3):403-411.
110. Rickover O, Zinman T, Kaplan D, Shainberg A. Exogenous nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning by preventing intracellular Ca^{2+} overload in cardiomyocytes. *Cell Calcium.* 2008;43(4):324-333.
111. Costa ADT, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ. Res.* 2005;97(4):329-336.
112. Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S, Brookes PS. Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 2006;394(Pt 3):627-634.
113. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2005;1(5):290-7.
114. Rassaf T, Kleinbongard P, Kelm M. Circulating NO pool in humans. *Kidney Blood Press Res.* 2005;28(5-6):341-8.
115. Rodriguez J, Maloney RE, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(1):336-41.
116. Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry.* 1994;33(47):14144-14155.
117. Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med.* 1995;1(7):781-788.
118. Feelisch SJ. *Methods in Nitric Oxide Research*. Wiley; 1996.

6. Literaturverzeichnis

119. Alpert C, Ramdev N, George D, Loscalzo J. Detection of S-nitrosothiols and other nitric oxide derivatives by photolysis-chemiluminescence spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997;245(1):1-7.
120. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. *Physiologia Bohemoslovaca.* 1990;39(6):481-504.
121. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourdain D, Huang PL, Lefer DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.* 1999;276(5 Pt 2):H1567-1573.
122. Gardner PR. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep.* 1997;17(1):33-42.
123. Tiravanti E, Samouilov A, Zweier JL. Nitrosyl-heme complexes are formed in the ischemic heart: evidence of nitrite-derived nitric oxide formation, storage, and signaling in post-ischemic tissues. *J. Biol. Chem.* 2004;279(12):11065-11073.
124. Burger-Kentischer A, Göbel H, Kleemann R, Zerneck A, Bucala R, Leng L, Finkelmeier D, Geiger G, Schaefer HE, Schober A, Weber C, Brunner H, Rütten H, Ihling C, Bernhagen J. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis.* 2006;184(1):28-38.
125. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(5):915-22.
126. Almeida A, Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol.* 2004;6(1):45-51.
127. Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR, Cushman SW, Holman GD, Young LH. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(5):E834-41.
128. Li DY, Tao L, Liu H, Christopher TA, Lopez BL, Ma XL. Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis.* 2006;11(6):923-930.
129. Fomenko DE, Gladyshev VN. Identity and Functions of CxxC-Derived Motifs. *Biochemistry.* 2003;42(38):11214-11225.
130. Edwards SL, Mauro JM, Fishel LA, Wang JM, Miller MA, Xuong NH, Kraut J. Where is the radical in compound I of cytochrome c peroxidase? Clues from crystallography and mutagenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988; 274:463-475.

6. Literaturverzeichnis

131. Nakamura T, Matsumura H, Inoue T, Kai Y, Uegaki K, Hagihara Y, Ataka M, Ishikawa K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of thioredoxin peroxidase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* . 2005;61(Pt 3):323–325.

7. Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Vor allem möchte ich mich bei ihm für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und seine Unterstützung während der Weiterentwicklung des Projekts danken. Seine Begeisterung für die Forschung hat einen bleibenden Eindruck hinterlassen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die hervorragende Betreuung als Stipendiatin im Graduiertenkolleg 1098 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Teilnahme an diesem Graduiertenkolleg hat mir viele Facetten des wissenschaftlichen Arbeitens näher gebracht.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung und die Hilfe in allen Fragen zum Thema „MIF“.

Mein besonderer Dank gilt Marcel Reeh für die interessante und spannende Zusammenarbeit an diesem Projekt und die Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Ulrike Hendgen-Cotta und Dominik Semmler für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen zur praktischen und theoretischen Arbeit.

Den Mitarbeitern des kardiologischen Labors danke ich für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern und Geschwistern gilt ein besonders großer Dank. Ihnen und meiner restlichen Familie danke ich für ihre permanente Unterstützung und ihr Vertrauen in mich, das mich zu Vielem ermutigt hat. Diese Arbeit ist ihnen in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Danken möchte ich auch Oliver Pohl für seine wundervolle Unterstützung während meines ganzen Studiums.

8. Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf hinterlegt sind.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Sobierajski
Geburtsdatum: 08.12.1984
Geburtsort: Geilenkirchen

Schul Ausbildung

1991-1995 Katholische Grundschule Übach
1995-2004 Carolus-Magnus-Gymnasium Übach-Palenberg
2004 Abitur

Hochschulausbildung

10/2004 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen (Modellstudiengang)
09/2007 Ärztliche Basisprüfung
11/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2010 Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie,
Pneumologie und Angiologie am Universitätsklini-
kum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
(Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Malte Kelm)

Auszeichnungen

2007-2009 Stipendiatin des Graduiertenkollegs 1089 (Protein-
interaktionen und -modifikationen am Herzen),
Teilprojekt 3 (Univ.-Prof. Dr.med. M. Kelm und
Univ.-Prof. Dr.med. T. Rassaf)
2008-2009 Teilnahme an TANDEMmed (Mentoring-
Programm der Rheinisch-Westfälischen Techni-
schen Hochschule Aachen)