

**Beeinflussung der Funktion des pro-inflammatorischen Cytokins
Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor durch das
ribosomale Protein S19**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

vorgelegt von
Philipp Lacher

aus Anrath, Deutschland

Giessen 2014

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Geschäftsführender Direktor: Herr Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie (Leiter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt)
des Fachbereichs 11 Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt
Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 05.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	5
	2.1 Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor (MIF)	5
	2.1.1 Struktur von MIF Gen und Protein	6
	2.1.2 Zelluläre Quellen und Expressionsmuster von MIF	7
	2.1.3 MIF Sekretion	8
	2.1.4 Molekulare Mechanismen der MIF Aktivität	9
	2.1.4.1 MIF Rezeptoren	9
	2.1.4.2 Aktivierung der ERK1/2 Signalwege	10
	2.1.4.3 Hochregulierung der TLR4 Expression	10
	2.1.4.4 Unterdrückung der p53 Aktivität	11
	2.1.4.5 Inhibition der JAB1/CSN5 Aktivität	11
	2.1.5 Tautomerase Aktivität	12
	2.1.6 MIF bei Inflammation und humanen Krankheiten	12
	2.1.7 MIF und Glucocorticoide	15
	2.1.8 Direkte Interaktion mit anderen Proteinen	15
	2.2 Das ribosomale Protein S19 (RP S19)	18
	2.2.1 Außerribosomale Funktionen von RP S19	18
	2.2.2 Mutationen im RP S19 Gen und ihre Folgen	19
	2.3 NEDD8	20
	2.4 Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
	3.1 Material und Geräte	22
	3.1.1 Chemikalien	22
	3.1.2 Kits	23
	3.1.3 Kulturmedien/Antibiotika	23
	3.1.4 Zelllinien	24
	3.1.5 Verbrauchsmaterial	24
	3.1.6 Geräte	24
	3.1.7 Sonstiges	25
	3.1.8 Enzyme	25
	3.1.9 Antikörper	26
	3.1.9.1 Primärantikörper	26
	3.1.9.2 Sekundärantikörper	26
	3.1.10 Oligonukleotide	26
	3.1.11 Vektoren	27
	3.1.12 Bakterienstämme	28
	3.1.13 Expressionskonstrukte	28
	3.2 Methoden	29
	3.2.1 Molekularbiologische Methoden	29
	3.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese	29
	3.2.1.2 Klonierung des His-FLAG getagten RP S19 Proteins mittels DNA-Hybridisierung	30
	3.2.1.3 Klonierung des His-FLAG getagten RP L11 Proteins mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
	3.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	32
	3.2.1.5 Restriktionsenzym-Verdau	32
	3.2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32

3.2.1.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren	32
3.2.1.8	DNA-Ligation	33
3.2.1.9	Transformation von Bakterien	33
3.2.1.10	Plasmidpräparation	35
3.2.2	Zellbiologische Methoden	37
3.2.2.1	Zellkultur	37
3.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	37
3.2.2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	37
3.2.2.4	Transiente Transfektion durch Lipofektion	38
3.2.2.5	Transiente Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation	38
3.2.2.6	Gewinnung von Zelllysaten	39
3.2.2.7	Zellisolierung von Monozyten aus Blut	39
3.2.3	Biochemische Methoden	40
3.2.3.1	Proteinbestimmung (Bradford)	40
3.2.3.2	Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE	41
3.2.3.3	Western Blotting und Detektion	41
3.2.3.4	Ko-Immunopräzipitation	42
3.2.3.5	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	43
3.2.3.6	Durchflusszytometrie (FACS)	43
3.2.3.7	Neddylation Assay	44
3.2.3.8	Monozyten Chemotaxis Test	45
3.2.3.9	Glucocorticoid Overriding Test	47
3.2.3.10	Proteinisolierung aus Blutplasma	47
3.2.3.11	Statistische Auswertungen	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Effekt von RP S19 auf die Glucocorticoid- <i>Overriding</i> Aktivität von MIF	48
4.2	Inhibition der MIF-induzierten Monozyten/Makrophagen Migration durch RP S19	53
4.3	Das ribosomale Protein S19 wird nicht neddyliert	57
4.4	Zwei Punktmutanten von RP S19 zeigen eine erniedrigte MIF-Bindung	60
4.5	Identifikation der MIF-RP S19 Interaktionsdomäne	63
4.6	Nachweis von RP S19 in humanem Blutplasma	65
5	Diskussion	67
5.1	RP S19 inhibiert die <i>glucocorticoid-overriding</i> Aktivität von MIF	67
5.2	RP S19 inhibiert nicht signifikant die MIF abhängige Migration von Monozyten/Makrophagen	70
5.3	Das ribosomale Protein S19 wird nicht neddyliert	70
5.4	Einfluss von RP S19 Punktmutationen auf die Bindung von MIF	72
5.5	Identifikation der MIF Interaktionsdomäne im ribosomalen Protein S19	74
5.6	Nachweis von RP S19 in humanem Blutplasma	78
6	Zusammenfassung	81
7	Literatur	83
8	Publikationen	96
9	Danksagung	97
10	Ehrenwörtliche Erklärung	98

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CD74	<i>cluster of differentiation 74</i>
cm	Zentimeter
COP9	<i>constitutive photomorphogenic 9 complex</i>
COX2	Cyclooxygenase 2
CSN5	COP9 Signalosom Untereinheit 5
DAPI	Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DDT	D-Dopachrom Tautomerase
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E _{xy}	Extinktion bei einer Wellenlänge von xy nm
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	durch ein extrazelluläres signal-regulierte Kinase
ETS	Erythroblastose Virus E26 Onkogen Homolog
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) je nach Kontext

Abkürzungen

GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
His	Histidin
HPO	Hepatopoetin
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Il-1	Interleukin-1
Jab-1	<i>Jun activation domain binding protein-1</i>
JNK	Jun-N-terminale Kinase (Januskinase)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
K _M	Michaeliskonstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)</i>
μ g	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor
Min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
NEDD8	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nucleolar localisation sequence</i>
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzungen

NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _{xy}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xy nm
pH	-log [H ⁺]
PAG	<i>proliferation associated gene</i>
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA2	Phospholipase A2
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
RA	rheumatoide Arthritis
rec MIF	rekombinantes MIF
RNA	Ribonucleinsäure
RP L11	ribosomales Protein 11 der großen Untereinheit (L)
RPMI Medium	<i>Rosswell Park Memorial Institute Medium</i>
RP S19	ribosomales Protein 19 der kleinen Untereinheit (S)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOBMedium	Super optimal broth Medium
TAE	Tris-Acetat EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFBPuffer	Transformationspuffer
T _H 1	T-Helfer Zellen vom Typ 1
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetradecanoyl-phorbol-acetat
u	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewichtsverhältnis

Abkürzungen

wt Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor (MIF)

Die Erkennung und Bekämpfung eindringender Krankheitserreger ist unabdingbar für das Überleben von Organismen. Die natürliche Abwehr des Wirtes gegen Mikroorganismen stellt zunächst das angeborene Immunsystem sicher. Dabei handelt es sich um den älteren zweier Zweige des Immunsystems. Die Entdeckung von Pathogenen wird zu allererst durch die Wächterzellen des angeborenen Immunsystems geleistet, wie Makrophagen und dendritische Zellen, die in Geweben lokalisiert sind, die in Kontakt mit der Umwelt des Körpers stehen. An zweiter Stelle werden Pathogene bekämpft, indem zirkulierende Granulozyten und Monozyten schnellstmöglich zur Entzündungsstelle rekrutiert werden. Dieser Prozess schließt koordinierte Aktionen des alternativen und Mannose-bindenden Lectinweges des Komplementsystems, der Proteine der akuten Phase wie zum Beispiel CD14 und den *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs), ein. Die Bindung von konservierten molekularen Motiven, als *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet, an diese Rezeptoren, aktiviert Signaltransduktionswege und die Transkription von Immungenen, was zur Ausschüttung einer Vielzahl von immunregulatorischen Molekülen in das extrazelluläre Milieu und zur Expression von ko-stimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche führt. Bei diesen Effektormolekülen haben Zytokine eine essentielle Rolle, da sie die Immunantwort des Wirtes initiieren und die zelluläre und humorale Immunantwort koordinieren. Dies führt innerhalb von Minuten bis zu wenigen Stunden zur Eindämmung oder sogar zur Beseitigung des Pathogens. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen in Tieren, bei denen Zytokin oder Zytokinrezeptor kodierende Gene mutiert oder deletiert sind, ist ein starkes Anzeichen für die essentielle Rolle der Zytokine, ihrer Rezeptoren und Signalwege in der Abwehr von mikrobiellen Pathogenen. So ist eine dysregulierte, das heißt, sowohl eine überregulierte, als auch eine herunterregulierte Produktion, von pro-inflammatorischen Mediatoren potenziell lebensbedrohlich. Dies zeigt sich sehr deutlich bei einer schweren Sepsis, bei der es in Folge einer Infektion zu einer überschießenden Ausschüttung von Zytokinen, wie zum Beispiel dem Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor (MIF) (Bernhagen 1993; Bozza 2004), Interleukinen und Interferonen kommt, was schließlich zu einem Multiorganversagen führen kann. Dies zeigt, dass eine korrekte Regulation der Zytokinproduktion essentiell ist. Als eines der ersten Zytokine überhaupt wurde 1966 in einer Studie über die Hypersensitivität vom Typ

IV (verzögerter Typ) MIF identifiziert. Sein Name geht auf eine eindruckliche Eigenschaft des damals noch unbekanntes Faktors zurück, der die ungerichtete Migration von kultivierten peritonealen Makrophagen aus dem Meerschweinchen aus einer Kapillare heraus *in vitro* inhibierte. 1966 charakterisierten gleichzeitig zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Aktivität eines löslichen Faktors, der von aktivierten T-Lymphozyten produziert wurde (Bloom BR 1966; David 1966). In den folgenden Jahrzehnten wurde festgestellt, dass die MIF Aktivität mit allgemeinen Funktionen der Makrophagenaktivierung, inklusive Adhärenz, Ausbreitung, Phagozytose und einer erhöhten Tumoraktivität korreliert (Nathan 1971; Nathan 1973; Churchill 1975; Lan 1996; Matsumoto 2001; Yamada 2002).

Weitere biologische Funktionen von MIF blieben jedoch unklar, bis 1989 die komplementäre DNA von humanem MIF kloniert werden konnte (Weiser 1989). 1993 führte die Suche nach neuen Regulatoren der Inflammation zur erneuten Entdeckung von MIF als einem Molekül, welches, ähnlich den Hormonen, von Zellen der Hypophyse nach Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) ausgeschüttet wird. Diese überraschende Beobachtung legt nahe, dass MIF ein Vermittler zwischen Endokrinium und Immunsystem sein könnte.

2.1.1 Struktur von MIF Gen und Protein

Im humanen Genom gibt es nur ein für MIF kodierendes Gen, welches auf dem Chromosom 22 (22q11.2) lokalisiert ist. Dieser Teil des Chromosoms ist syntenisch zu Teilen des Chromosoms 10 der Maus, auf dem das Maus Gen für MIF lokalisiert ist (Weiser 1989; Wistow 1993; Bernhagen 1994; Paralkar 1994; Kozak 1995; Bozza 1996). Es wurden jedoch mindestens neun MIF Pseudogene im Mausgenom gefunden (Kozak 1995; Bozza 1996). Bei der Suche nach Homologen von MIF im humanen Genom wurde lediglich ein Gen gefunden, das für die D-Dopachrom-Tautomerase (D-DT) kodiert. Da beide Gene recht nah beieinander auf dem Chromosom 22 liegen, könnte es sich um die Duplikation eines Ursprungsgens handeln, die zu zwei unterschiedlichen Genprodukten mit ähnlichen Funktionen führte. Verschiedene Polymorphismen im humanen MIF Gen werden mit Krankheiten in Verbindung gebracht.

Die 0,8 kb MIF messenger-RNA kodiert für ein 114 Aminosäure großes nicht glykosyliertes Protein von 12,5 kDa Größe. Alle Säugetier MIF's weisen eine 90%ige Homologie auf. Überraschenderweise scheint MIF zu keiner bekannten Zytokin Superfamilie zu gehören. Das hohe Maß an Homologie von MIF in so verschiedenen Arten wie Säugetieren, aber auch Pflanzen, Parasiten, Fischen und sogar Cyanobakterien, und die damit verbundene

Einleitung

Konservierung des MIF Gens, lässt darauf schließen, dass MIF wichtige biologische Funktionen besitzt (Wistow 1993; Pastrana 1998; Jaworsky 2001; Guillano 2002; Sato 2003). Kristallographische Untersuchungen mit humanem und murinem MIF zeigen, dass MIF in beiden Organismen ein Homotrimer bildet. Jedes Monomer besteht aus zwei antiparallelen α -Helices und sechs β -Faltblättern. Im Trimer bilden die β -Faltblätter eines Monomers je eine β -Faltblattdomäne, so dass drei dieser β -Faltblattdomänen von insgesamt sechs α -Helices außen umgeben werden. Dadurch entsteht im Inneren ein an beiden Enden offener Tunnel (siehe Abb. 1), dessen Innenseite vor allem mit hydrophilen Aminosäurenresten ausgekleidet ist. Der Kern der Tunnelstruktur ist positiv geladen und kann möglicherweise mit negativ geladenen Resten anderer Moleküle interagieren (Baugh 2002).

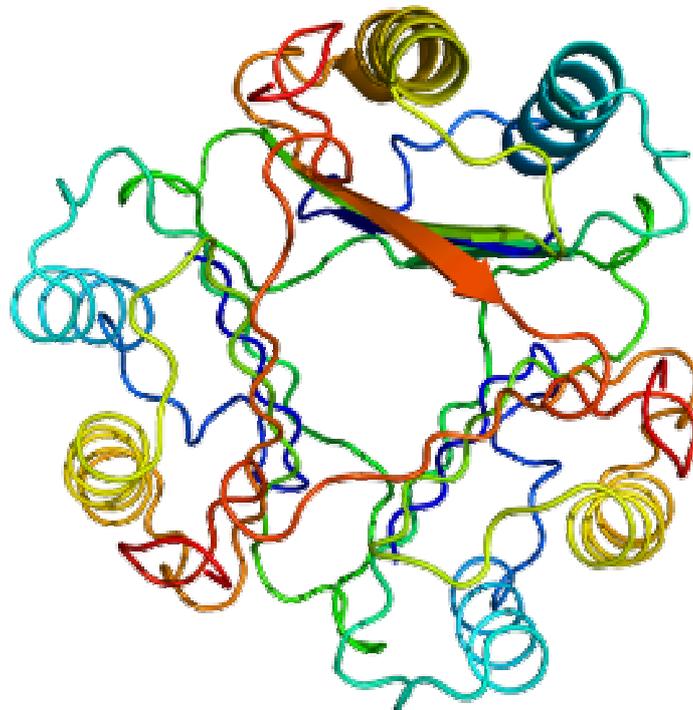


Abbildung 1: Drei-dimensionale Struktur des Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor Trimers mit zentralem Kanal (Baugh 2002).

2.1.2 Zelluläre Quellen und Expressionsmuster von MIF

Zunächst dachte man, dass T-Zellen die zelluläre Hauptquelle von MIF seien (Bernhagen 1993). MIF wurde später jedoch ebenso in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und Basophilen gefunden (Baugh 2002; Lue 2002). Im Gegensatz zu den meisten Zytokinen, wie Interleukin-1 β und dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , wird MIF konstitutiv exprimiert und in intrazellulären Pools

gelagert, weswegen keine *de novo* Proteinsynthese für die Sekretion von MIF notwendig ist. Die Sekretion von MIF durch Makrophagen geschieht nicht nur sehr rasch, sondern benötigt auch nur eine 10-100 mal geringere Konzentration an LPS, als zum Beispiel zur Sekretion von TNF α nötig ist (Calandra 1994).

Außerhalb des Immunsystems zeigt MIF eine breite Gewebedistribution. Namentlich wird MIF von Zellen und Geweben exprimiert, die in direktem Kontakt zur Umwelt stehen, wie Lunge, Hautepithel und Gastrointestinaltrakt. Eine weitere charakteristische Eigenschaft von MIF ist das hohe Expressionslevel in einzelnen Geweben des endokrinen-Systems, speziell von Organen der Stressantwort (Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere) (Bernhagen 1993).

2.1.3 MIF Sekretion

MIF fehlt eine amino-terminale Signalsequenz, sodass es über einen nicht konventionellen Protein-Sekretionsweg aus der Zelle gebracht werden muss. Durch verschiedene Techniken konnte gezeigt werden, dass MIF in sekretorischen Vesikeln in corticotropen Zellen der Hirnanhangsdrüse zu finden ist (Nishino 1995). Eine andere Studie zeigte, dass MIF in vesikulären Strukturen von Epithelzellen des Nebenhodens bei Ratten zu finden ist (Eickhoff 2001). Mittels Immunoelektronenmikroskopie wurde MIF im Zytoplasma, jedoch nicht innerhalb des Golgi-Komplexes oder des endoplasmatischen Retikulums, nachgewiesen. MIF ist in Stereozilien der apikalen Zelloberfläche konzentriert, wo mit MIF angereicherte Vesikel an der Plasmamembran abgeschnürt und freigegeben werden. Ob es sich bei diesen Strukturen um eine spezifische MIF Sekretion von epididymalen Zellen, oder einen generellen Mechanismus der MIF Sekretion handelt, bleibt unklar.

Neuere Daten belegen, dass das Golgi-assoziierte Protein p115 an MIF bindet und die Sekretion von MIF vermitteln könnte. MIF kommt in großen intrazellulären Pools vor, die nach Stimulation mit LPS in Richtung Zellperipherie wandern. Genauso ändert p115, welches an MIF bindet, nach LPS Stimulation seine Verteilung vom Golgi-Apparat in Richtung Plasmamembran, was auf eine Rolle in der Vermittlung der MIF Sekretion hindeutet (Merk 2009).

2.1.4 Molekulare Mechanismen der MIF Aktivität

2.1.4.1 MIF Rezeptoren

Zytokine funktionieren durch Bindung an einen membrangebundenen Rezeptor, der auf der Zielzelle exprimiert wird und aktivieren dadurch Signal-Transduktionswege, die in der Transkription bestimmter Gene und der Expression bestimmter Proteine münden. Diese Wirkungsweise zeigt sich auch bei MIF und wird durch die Erkenntnis bestätigt, dass MIF durch Interaktion mit einem Rezeptor, in diesem Falle CD74, die *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/ERK2), Mitglieder der Familie der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), aktiviert (Leng 2003). Dabei bindet MIF die extrazelluläre Domäne von CD74, auch bekannt als die MHC Klasse II assoziierte invariante Kette, die am Transport der MHC Klasse II Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat beteiligt ist. Ungefähr 5% des zellulären Vorkommens an CD74 wird unabhängig von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert. Es scheint, dass die intrazelluläre Domäne von CD74 keine Sequenzen beinhaltet, die dafür bekannt sind, dass sie mit Signalmolekülen interagieren. Allerdings erfolgen die Aktivierung von ERK1/ERK2, Zellproliferation und Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) durch MIF CD74 abhängig. Zur Aktivierung des ERK1/ERK2 Signalweges bedarf es eines zusätzlichen Proteins, nämlich CD44, welches die Src Tyrosin Kinase aktiviert und somit das Signal weiterleitet (Shi 2006). Für die kritische Rolle, die MIF bei der inflammatorischen Zellrekrutierung oder der Atherogenese spielt sind die beiden CXC-Chemokin-Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 wichtig, die von MIF aktiviert werden. Über die Bindung von MIF an CXCR2 oder CXCR4 kommt es zu einem G_{oi}- und Integrin abhängigen Arrest und einer chemotaktischen Wirkung auf Monozyten und T-Zellen, sowie einer Integrin Aktivierung und einem Kalziumeinstrom. MIF kann direkt an CXCR2 binden, wenn dieses zusammen mit CD74 einen Rezeptorkomplex bildet, was zu einem Monozytenarrest in entzündeten oder atherosklerotischen Arterien führt (Bernhagen 2007). Außerdem führt die Bindung von MIF an CD74 auf Kardiomyocyten zur Stimulierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) Kaskade, was zum Schutz vor ischämischen Verletzungen führt (Miller 2008; Qi 2009).

2.1.4.2 Aktivierung der ERK1/2 Signalwege

Studien haben gezeigt, dass MIF innerhalb von 30 Minuten und bis zu 24 Stunden lang die Phosphorylierung und Aktivierung des ERK1/ERK2-MAPK Signalweges beeinflusst und somit die Zellproliferation aktiviert und aufrechterhält (Mitchell 1999). Die durch MIF induzierte ERK1/ERK2 Aktivierung ist Proteinkinase A abhängig und mit einer erhöhten zytoplasmatischen Phospholipase A2 (PLA2) Enzymaktivität assoziiert. Die PLA2 ist ein wichtiger intrazellulärer Mediator für die Aktivierung der pro-inflammatorischen Kaskade, was zunächst in der Produktion von Arachidonsäure und dann Prostaglandinen sowie Leukotrienen mündet. PLA2 ist also ein Schlüsselmolekül des anti-inflammatorischen Effektes von Glucocorticoiden. Die ERK1/ERK2 vermittelte Induktion von PLA2 ist damit ein Mechanismus durch den MIF die beschriebene immunsuppressive Wirkung von Glucocorticoiden aufheben könnte (Calandra 1995). Außerdem wurde nachgewiesen, dass MIF abhängig von JAB1/CSN5 und Src Kinase Aktivität den ERK1/ERK2-MAPK Signalweg ebenso transient aktivieren kann (Lue 2006).

2.1.4.3 Hochregulierung der TLR4 Expression

Die konstitutive Expression eines Zytokins durch Makrophagen ist ungewöhnlich und führt zur Frage, welche Vorteile die basale Expression von MIF Makrophagen bietet. Studien mit MIF *anti-sense* Konstrukten in Makrophagen, die aus MIF defizienten Mäusen isoliert wurden zeigen, dass MIF-defiziente Makrophagen hypersensitiv auf LPS und gramnegative Bakterien, aber nicht auf andere Stimuli, reagieren. Dies zeigt sich in einer niedrigeren Produktionsrate von Zytokinen und der Herunterregulierung der Expression von TLR4, dem Signaltransduktionsmolekül des LPS-Rezeptorkomplexes. MIF erhöht die Expressionsrate von TLR4, indem es auf die Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie einwirkt. Dadurch fördert MIF die Detektion von Endotoxin enthaltenden Bakterien und befähigt Makrophagen, als erste Front der antimikrobiellen Abwehr des Körpers, schnell auf eindringende Bakterien zu reagieren. Eine schnelle Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen ist absolut essentiell für eine erfolgreiche Immunabwehr des Körpers. Übereinstimmend mit diesem Konzept, zeigen MIF-defiziente Mäuse auch eine fehlende Kontrolle des intrazellulären Pathogens *Salmonella typhimurium* (Koebernick 2002). Die erhöhte Empfänglichkeit von MIF-defizienten Mäusen für Infektionen ist assoziiert mit einem reduzierten Plasmalevel von

Einleitung

Zytokinen, wie TNF α , IL-12 und Interferon γ (IFN γ) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Dies lässt vermuten, dass MIF die T_H1-Zellantwort gegen *Salmonella typhimurium* unterstützt.

2.1.4.4 Unterdrückung der p53 Aktivität

Zahlreiche primäre Tumore und Tumorzelllinien exprimieren große Mengen von MIF. Durch Untersuchungen über MIF als negativen Regulator der p53-vermittelten Wachstumshemmung und der Apoptose, wurde eine Verbindung zwischen Inflammation, Zellwachstum und Tumorgenese geschaffen (Hudson 1999). Es wurde gezeigt, dass MIF-defiziente Makrophagen eine gestörte pro-inflammatorische Funktion (wie Produktion von TNF α , IL-1 und PGE₂) und eine verringerte Viabilität im Vergleich zu Wildtyp Makrophagen aufweisen, wenn sie mit LPS behandelt werden (Mitchell 2002). Außerdem zeigte sich, dass MIF die NO-induzierte intrazelluläre Akkumulation von p53 und damit die p53-vermittelte Apoptose inhibiert. Die Inhibition von p53 durch MIF ist abhängig von der aufeinander folgenden Aktivierung von ERK1/ERK2, PLA2, Cyclooxygenase 2 (COX2) und PGE₂. Es wurde außerdem gezeigt, dass MIF den E2F-p53 Signalweg beeinflusst, um normales und malignes Zellwachstum aufrecht zu erhalten (Petrenko 2003). Die Hochregulierung der Expression von TLR4 und das aufrecht erhaltene Zellwachstum sind zwei Mechanismen durch die MIF die pro-inflammatorische angeborene Immunantwort unterstützt (Kleemann 2000; Mitchell 2002).

2.1.4.5 Inhibition der JAB1/CSN5 Aktivität

Durch ein *Yeast Two Hybrid* System wurde die Interaktion von MIF mit dem *JUN-activation domain-binding protein 1* (JAB1) - auch *COP9 subunit 5* (CSN5) genannt - gezeigt (Kleemann 2000). JAB1/CSN5 aktiviert die *JUN N-terminal kinase* (JNK), die JUN, eine Untereinheit des *activator protein 1* (AP-1), phosphoryliert. So wirkt JAB1/CSN5 als Koaktivator von AP-1, einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, Transformation und Zelltod spielt. Andere Funktionen von JAB1 beinhalten die Degradation des Zellzyklusinhibitors KIP1 und des Tumorsuppressors p53. MIF und JAB1 kolokalisieren im Zytoplasma, und MIF inhibiert die positiven regulatorischen Effekte von JAB1/CSN5 auf die JNK- und AP-1 Aktivität.

2.1.5 Tautomerase Aktivität

Die dreidimensionale Struktur von MIF ist der anderer Zytokine nicht ähnlich und bildet daher eine eigene Zytokinklasse. Das einzige humane Protein, welches eine ähnliche Struktur aufweist, ist die D-Dopachrom-Tautomerase (D-DT) (Sugimoto 1997). MIF und D-DT zeigen eine 27%ige Sequenzgleichheit (Zang 1995) und ebenso wie MIF bindet D-DT an CD74 und weist auch darüber hinaus ein überlappendes Spektrum an Aktivitäten auf (Merk 2011). Wie D-DT hat MIF eine Tautomerase-Aktivität und katalysiert die Tautomerisierung von natürlicherweise nicht vorkommendem D-Dopachrom in sein 5,6 Dihydroxyderivat (Rosengren 1996) oder von natürlicherweise vorkommendem Hydroxyphenylpyruvat oder Phenylpyruvat in ihre Keto-Form (Rosengren 1997). Dabei erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Pyruvate physiologische Substrate für MIF darstellen, da die gemessenen K_M Werte im Vergleich zur endogenen Konzentration dieser Substrate zu hoch erscheinen (Deutsch 1997; Rosengren 1997).

Reifes MIF beginnt aminoterminal mit der katalytisch aktiven Aminosäure Prolin. Zur Ausbildung des aktiven Zentrums ist die Ausbildung eines Trimers erforderlich, da das aktive Zentrum an der Grenzfläche von zwei Monomeren gebildet wird (Lubetsky 1999). Bislang war unklar, ob die Tautomeraseaktivität für die biologischen Funktionen von MIF notwendig ist. Kürzlich wurde jedoch eine MIF P1G Knock-in Maus in einem MIF Knockout Background hergestellt, bei der die katalytische Aktivität von MIF durch Mutation von Prolin 1 zu Glycin inaktiviert wurde. Das von diesen Mäusen produzierte Protein ist jedoch noch immer in der Lage an seinen Zelloberflächenrezeptor CD74 und das intrazelluläre Bindungsprotein JAB1/CSN5 zu binden (Fingerle-Rowson 2009).

2.1.6 MIF bei Inflammation und humanen Krankheiten

Endotoxine gehören zu den Hauptvirulenzfaktoren von gramnegativen Bakterien (Beutler 2003). Werden Makrophagen durch LPS stimuliert, so setzen sie MIF frei (Calandra 1994). Ebenso kann die Ausschüttung von MIF durch andere Effektormoleküle der Immunzellen, wie TNF α und INF γ , induziert werden. Nach Freisetzung agiert es als ein proinflammatorisches Zytokin, welches die angeborene und erworbene Immunantwort durch autokrine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen in Gang setzt.

MIF fördert direkt oder indirekt die Produktion von vielen verschiedenen proinflammatorischen Molekülen, inklusive Zytokinen, wie TNF α (Calandra 1994; Donnelly

Einleitung

1997), INF γ (Bacher 1996; Abe 2001), IL-1 β , IL-2 (Bacher 1996), IL-6 (Calandra 1994), IL-8 (Donnelly 1997; Benigni 2000) und *macrophage inflammatory protein 2* (Makita 1998), Stickoxiden (Bernhagen 1994; Bozza 1999), COX2 und PGE₂ (Mitchell 1999; Mitchell 2002), sowie verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren (Onodera 1999; Onodera 2002).

Wegen der genannten verschiedenen regulatorischen Möglichkeiten ist MIF in der Pathogenese zahlreicher akuter oder chronischer Entzündungs- und Immunkrankheiten involviert (siehe Tabelle 1).

Humane Krankheiten, die mit einer erhöhten MIF Expression assoziiert werden

- **Immunsystem:** Sepsis, septischer Schock und Abstoßung allogener Transplantate (Lan 1998; Calandra 2000; Joshi 2000; Beishuizen 2001; Gando 2001; Lehmann 2001)
- **Lunge:** Akutes respiratorisches Syndrom, Asthma, Tuberkulose (Bloom BR 1966; Rossi 1998; Lai 2003; Mizue 2005)
- **Niere:** Glomerulonephritis (Lan 1996; Lan 1997; Lan 2000; Matsumoto 2001)
- **Knochen:** Rheumatoide Arthritis (Leech 1999)
- **Gastrointestinaltrakt:** Colitis (Bernhagen 1993; De Jong 2001; Murakami 2001)
- **Haut:** Atopische Dermatitis und systemische Sclerose (Shimizu 1997; Selvi 2003)
- **Endokrines System:** Typ-2-Diabetes (Yabunaka 2000)
- **Gehirn:** Multiple Sklerose (Nilno 2000)
- **Herz:** Artherosklerose (Burger-Kentischer 2002; Schober 2004; Bernhagen 2007)

Tabelle 1: Auflistung der Krankheiten, die mit einer erhöhten Expression von MIF assoziiert werden [teilweise entnommen aus (Calandra 2003)].

Die proinflammatorische Wirkung von MIF wie auch die Tatsache, dass MIF von Immunzellen produziert wird und es eine essentielle Rolle in der Immunantwort von Makrophagen gegen Mikroorganismen einnimmt, legt den Schluss nahe, dass MIF eine unterstützende Rolle bei der Sepsis spielen könnte. Bei Überprüfung dieser Hypothese in verschiedenen experimentellen Modellen des toxischen Schocks oder bakterieller Sepsis konnte bestätigt werden, dass es hier zu einer exzessiven und damit gefährlichen Expression von MIF während der akuten Phase des septischen Schocks kommt. Außerdem wurden erhöhte Konzentrationen von MIF im Blut von Patienten mit schwerer Sepsis oder einem septischen Schock gefunden (Calandra 2000; Beishuizen 2001; Gando 2001; Lehmann 2001). Ratten denen rekombinantes MIF verabreicht wurde, so dass ihre MIF Konzentration im Blut der von Sepsis Patienten entsprach, zeigten eine erhöhte Konzentration von Corticosteron im

Einleitung

Serum, bei unveränderter Konzentration des Glucocorticoidrezeptors (GR) und deutlich erniedrigter Konzentration des Hitzeschockprotein 90 in kultivierten Kardiomyozyten. Die spezifische Bindung des GR an DNA wurde durch MIF signifikant inhibiert. Erhöhte Konzentrationen von MIF bei Sepsis Patienten können also die bei ihnen beobachtete Glucocorticoid-Resistenz zumindest teilweise erklären (Jing 2011). Ebenso wurde gezeigt, dass die Expressionsrate von MIF mit der Ausbildung des *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) bei septischen Patienten korreliert (Beishuizen 2001). Die Neutralisation von MIF oder die Deletion des MIF-Gens führt in Mäusen zu einer Erniedrigung der pro-inflammatorischen Aktivität und einer erhöhten Überlebensrate (Bernhagen 1993; Calandra 1995; Calandra 1998; Bozza 1999; Calandra 2000).

Am eindrucksvollsten konnte der Einfluss von MIF bei einer chronischen inflammatorischen Krankheit, der rheumatoiden Arthritis (RA) belegt werden. Durch Einsatz von monoklonalen anti-MIF Antikörpern konnte die inflammatorische Antwort im Maus Modell von humaner RA signifikant vermindert werden (Mikulowska 1997). Ein typischer pathologischer Befund bei RA ist die Zersetzung von Bindegewebe durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die durch die Hochregulierung von MMP-1 und MMP-3 mRNA in synovialen Fibroblasten unter anderem durch MIF erfolgt (Onodera 2000). Glucocorticoide dagegen können die Transkription des MMP-1 Gens unterdrücken, indem sie über den Glucocorticoidrezeptor die Aktivität des AP-1 Komplexes inhibieren (Transrepression) (Vincenti 1996). Mechanistisch kann der *glucocorticoid overriding effect* von MIF (s.u.) also so erklärt werden, dass MIF JAB1/CSN5 inhibiert, wodurch die ko-aktivierende Wirkung von JAB1/CSN5 auf den Glucocorticoidrezeptor ausbleibt (Chauchereau 2000) und so die inhibierende Wirkung des Rezeptors auf AP-1 nur gering ausfällt.

Außerdem konnte ein Einfluss von MIF auf die Zellproliferation und somit ein möglicher Einfluss auf die Tumorangio-genese gezeigt werden. So korreliert in murinen Kolonkarzinomzellen die Erhöhung der zytosolischen Konzentration von MIF durch Wachstumsfaktoren mit einer gesteigerten Zellproliferation (Takahashi 1998). Durch Überexpression von *antisense* MIF Konstrukten kommt es dagegen zu einer Inhibition der Zellproliferation.

Die erfolgreiche Anwendung von anti-MIF Antikörpern in präklinischen Modellen von Sepsis, rheumatoider Arthritis und Tumorgenese zeigt das Potenzial von auf MIF basierenden therapeutischen Ansätzen (Bernhagen 1993; Mikulowska 1997; Calandra 2000; Sakai 2003).

2.1.7 MIF und Glucocorticoide

Die Aktivierung der hypothalamo-hypophysären-adrenalen-Achse ist für eine systemische Stressantwort charakteristisch und führt zu einer Erhöhung der Konzentration an zirkulierenden Glucocorticoiden, welche unabdingbar für die Modulation der Wirtsantwort nach einer Infektion oder Gewebeinvasion ist (Munck 1984). Überraschenderweise stellte sich heraus, dass, anders als erwartet, Glucocorticoide die Produktion des proinflammatorischen wirkenden MIF induzieren, anstatt sie zu inhibieren (Calandra 1995). Dies führte zur Annahme, dass MIF als Gegenspieler für die anti-inflammatorisch wirkenden Glucocorticoide fungieren könnte. Bei der Überprüfung dieser Hypothese stellte sich heraus, dass exogen verabreichtes rekombinantes MIF die Inhibition der Zytokinproduktion *in vitro* und die Verminderung der Endotoxin-induzierten Letalität durch Glucocorticoide *in vivo* aufheben kann. Diese Wirkung von MIF schwächt sich dosisabhängig mit steigenden Glucocorticoidkonzentrationen ab (Calandra 1995). Diese Fähigkeit von MIF die immunsuppressive Wirkung von Glucocorticoiden aufzuheben wurde in einer Reihe von Veröffentlichungen bestätigt (Donnelly 1997; Leech 1999; Mitchell 1999; Daun 2000; Fingerle-Rowson 2003). Es zeichnet sich mehr und mehr ab, dass innerhalb der Zytokinkaskade MIF und Glucocorticoide die Schaltunkte der Immun- und inflammatorischen Antwort kontrollieren.

2.1.8 Direkte Interaktion mit anderen Proteinen

MIF kann als Immunmodulator mit zwei Gesichtern beschrieben werden. Zum einen wird es als Zytokin sezerniert und wirkt über seine membranständigen Rezeptoren CD74/CD44 sowie CXCR2 und 4, und zum anderen ist es ein zytoplasmatisch vorkommendes ubiquitäres Protein. Unterstützend für den letzt genannten Aspekt ist, dass seit etwa einem Jahrzehnt eine Reihe von intrazellulären Proteinen identifiziert wurden, die an MIF binden (siehe Tabelle 2). Einige dieser Proteine sind Redoxproteine oder Proteine, die direkt mit der Redoxregulation verbunden sind. So interagiert MIF mit PAG, einer thiol-spezifischen Peroxidase (Jung 2001), mit Hepatopoietin (HPO), einer Flavin gebundenen Sulfhydryl-Oxidase (Li 2004) und mit Insulin, welches enzymatisch von MIF reduziert werden kann (Kleemann 1998). Insulin koloalisiert zusammen mit MIF in den sekretorischen Granula der β -Zellen in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse, wobei MIF die durch Glukose induzierte Freisetzung von Insulin reguliert (Waeber 1997). MIF interagiert ebenso mit JAB1

Einleitung

(Kleemann 2000), der Untereinheit 5 des COP 9 Signalosoms (CSN/CSN5), welches ursprünglich als Ko-Aktivator von AP-1 Transkription identifiziert wurde. Das CSN moduliert den Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg und erhöht zum Beispiel die Abbaurrate des Tumorsuppressors p53 (Bech-Otschir 2001). Eine direkte Interaktion von MIF mit der *endothelial myosin light chain kinase* (MLCK) wurde ebenso nachgewiesen (Wadgaonkar 2005). Diese Interaktion stellt einen Hinweis auf die Regulierung von MLCK durch MIF dar.

Einleitung

Name	Funktion(en) des Interaktors	Effekt der Interaktion mit MIF
CD 74 (Leng 2003)	Bildung und Transport von MHC Klasse II Komplexen Stimulation von Immunzellen zusammen mit CD 44	Phosphorylierung von ERK-1/2, PGE2 Produktion und Zellproliferation
PAG (Jung 2001)	Thiol-spezifische Peroxidase	Inhibiert die D-DT Aktivität von MIF
HPO (Li 2004)	Flavin gebundene Sulfhydryl-Oxidase	Komplex bindet an JAB1/ CSN5 und moduliert AP-1
Insulin (Kleemann 1998)	Proteohormon zur Regulierung des Blutzuckerspiegels	Reduktion von Insulin Regulation der Glukose induzierten Freisetzung von Insulin
Jab1/CSN5 (Kleemann 2000)	Regulator bei vielen Signalwegen Deneddylierung von SCF E3 Ubiquitin Ligasen Bindung an Glucocorticoid- und Progesteronrezeptor	Inhibition der durch JAB1/CSN5 vermittelten Aktivierung von AP-1 Inhibition von JNK Inhibition der Phosphorylierung von c-Jun
MLCK (<i>Myosin light chain kinase</i>) (Wadkaonkar 2005)	Effektor bei der Muskelkontraktion Involviert in Angiogenese, Apoptose und Leukodiapedese	Regulation von MLCK wie z.B. pathobiologische vaskuläre Ereignisse
<i>Bcl-2interacting protein 2-like</i> (BNIPL) (Shen 2003)	Apoptose	Inhibition der MIF vermittelten Zellproliferation
Hepatitis B virales Protein (HBx) (Zhang 2006)	HBV Infektion Virus vermittelte Onkogenese der Leber	Inhibition der durch HBx vermittelten Apoptose
Thioredoxin-1 (TRX) (Son 2009)	Oxidoreduktase	Internalisierung von MIF Inhibition der MIF vermittelten TNF α Produktion

Tabelle 2: Proteine, deren direkte Bindung an MIF nachgewiesen wurde

Aufgrund der wichtigen Rolle, die MIF bei proinflammatorischen Immunreaktionen und bei vielen Autoimmunkrankheiten spielt, wurde nach weiteren Interaktionspartnern von MIF gesucht, die in der Lage sind die starken proinflammatorischen Fähigkeiten von MIF zu inhibieren. Durch die Suche mittels KoImmunopräzipitation, wie auch mit einem *in vivo* BiotinTagging System wurde als weiterer Interaktionspartner von MIF das ribosomale Protein S19 (RP S19) identifiziert (Filip 2009).

2.2 Das ribosomale Protein S19 (RP S19)

Proteine werden von Ribosomen synthetisiert, die sich aus einer kleinen und einer großen Untereinheit zusammensetzen. Das ribosomale Protein S19 hat eine Größe von 16 kDa und ist Teil der kleinen 40S Untereinheit. Dort trägt es dazu bei die 18S rRNA zu binden (Lutsch 1990). Die Struktur von RP S19 ist hauptsächlich α -helical und bildet ein Bündel aus fünf α -Helices. Dabei verbindet die α -Helix 3 die α -Helices 1 und 6 auf der einen Seite mit den α -Helices 4 und 5 auf der anderen Seite und formt so den hydrophoben Kern des Proteins.

RP S19 wird eine essentielle Rolle in der Biogenese der kleinen Untereinheit des Ribosoms zugeschrieben, da die Inhibition der RP S19 Expression durch siRNA die Synthese der 18S rRNA und gleichzeitig den Zusammenbau der 40S Untereinheit beeinträchtigt und zur Apoptose der betreffenden Zellen führt (Choemmel 2007; Flygare 2007).

Die gezielte Ausschaltung des RP S19 Gens in Mäusen ist bereits im Blastozysten-Stadium der Embryogenese letal, wenn die Mäuse homozygot defizient für RP S19 sind (Matsson 2004).

2.2.1 Außerribosomale Funktionen von RP S19

Neben seiner Funktion als essentieller Bestandteil des Ribosoms und notwendiger Faktor der Proteinbiosynthese, existiert RP S19 ebenso in freier Form im Zytosol (Soulet 2001). So hat RP S19, wie auch andere ribosomale Proteine, zusätzliche extraribosomale Funktionen (Wool 1996). Zum Beispiel bindet und interagiert freies RP S19 mit internalisiertem *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) im Zytoplasma und unterbricht so den Signalweg von FGF-2 (Soulet 2001). RP S19 bindet ebenso PIM-1, eine ubiquitäre Serin/Threonin Kinase, welche unter anderem in erythropoetischen Zellen nach Stimulierung mit verschiedenen

Einleitung

Wachstumsfaktoren produziert wird. Die Bindung der beiden Proteine führt zur Phosphorylierung von RP S19 (Chiocchetti 2005).

Mittels Affinitätsreinigung von GST-RP S19 konnten 159 Proteine identifiziert werden, die an RP S19 binden. Unter ihnen befanden sich auch viele nicht nukleäre oder nicht ribosomale Proteine. Allerdings wurde MIF mit diesem Ansatz nicht gefunden (Orru 2007).

RP S19 kommt üblicherweise in Form eines Monomers vor. Durch eine Transglutaminase-reaktion kann RP S19 jedoch auch zu einem kovalenten Homodimer verknüpft werden. Als Dimer weist RP S19 eine selektive chemotaktische Wirkung auf Monozyten auf. Dies geschieht zum Beispiel, wenn RP S19 bei rheumatoider Arthritis von apoptotischen Zellen in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt wird. RP S19 wirkt dann durch die Bindung an den C5a Rezeptor chemotaktisch auf Monozyten (Nishiura 1998). Außerdem konnte freies RP S19 in humanem Blutplasma nachgewiesen werden (Semba 2010).

2.2.2 Mutationen im RP S19 Gen und ihre Folgen

Mutationen im RP S19 Gen werden bei etwa 25% aller Patienten mit DiamondBlackfan-Anämie gefunden (Draptchinskaia 1999). Dabei handelt es sich um eine chronische kongenitale hypoplastische Anämie, die durch eine selektive Störung der Bildung von Erythrozyten zustande kommt (Ball 2011). Bei diesen Mutationen im RP S19 Gen handelt es sich um Punktmutationen, die mit erhöhter Häufigkeit in einem so genannten „Hotspot“ zwischen den Kodons 52 und 62 auftreten (Willig 1999). Mutationen im Kodon 52 und 62 aus Patienten mit DBA zeigten zum Beispiel eine geringere Bindung an die untranslatierte 5' Region der eigenen RP S19 mRNA (Schuster 2010).

Die molekularen Mechanismen, die der Blockade der Erythropoese zugrunde liegen, sind noch unbekannt. Unglücklicherweise helfen Tiermodelle bei der Aufklärung dieses Problems nicht, denn die homozygote *Knockout* RP S19^{-/-} Maus stirbt *in utero*, während die heterozygote RP S19^{+/-} Maus keinerlei hämatologische oder andere Abnormalitäten aufweist (Matsson 2004). Dies deckt sich mit der Tatsache, dass alle Patienten mit einer Mutation im RP S19 Gen ebenso nur heterozygot sind und somit eine homozygote Ausprägung der Mutation vermutlich letal ist (Matsson 2004). Das RP S19 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Erythropoese spielt, zeigt auch die Blockade der Erythrozytenproliferation und -differenzierung nach *knock down* von RP S19 in humanen Knochenmarkzellen (Flygare 2005).

Eine Anzahl verschiedener RP S19 Punktmutanten, die in Patienten mit DBA vorkommen, zeigen zudem eine gestörte Lokalisation von RP S19 in nukleolären Strukturen und eine geringere Stabilität des RP S19 Proteins. Keine dieser RP S19 Mutanten wird erfolgreich in die kleine Ribosomenuntereinheit eingebaut (Angelini 2007). Außerdem zeigten Versuche mit Zellen einer erythroiden Zelllinie oder CD34+ Zellen aus DBA Patienten mit Mutationen im RP S19 Gen eine leicht erhöhte Konzentration und Aktivität von p53 (Dutt 2011; Moniz 2012).

Bei einer Reihe von ribosomalen Proteinen konnte eine Modifikation mit dem Ubiquitin ähnlichen Protein NEDD8 nachgewiesen werden. Dies führte unter anderem zu einer veränderten Stabilität dieser Proteine (Xirodimas 2008). Eine Assoziation von RP S19 wurde noch nicht nachgewiesen.

2.3 NEDD8

NEDD8 ist ein dem Ubiquitin ähnliches Protein, welches wie Ubiquitin kovalent an andere Proteine gebunden werden kann (Kamitani 1997; Yeh 2000). Das NEDD8-Homolog in der Hefe ist Rub1, welches mit Ub1 verwandt ist. Es weist die höchste Homologie (57% Identität) mit Ubiquitin in der wachsenden Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine in Eukaryonten auf. Die Konjugation von Proteinen mit NEDD8 folgt in ihrem Mechanismus der Konjugation von Proteinen mit Ubiquitin. Zunächst wird reifes NEDD8 über ein C-terminales Glycin durch die Bindung an ein Enzym (E1) aktiviert. Danach wird NEDD8 an ein weiteres spezifisches Enzym (E2) überführt und schließlich durch ein drittes Enzym (E3-Ligase) an das jeweilige Zielprotein über Lysinreste kovalent gebunden.

Als die ersten Substrate von NEDD8 wurden Culline, beschrieben. Culline sind eine Untereinheit von Ubiquitin E3-Ligasen, die sich aus Skp1, Cullin/Cdc53 und einem F-box Protein zusammensetzen (SCF E3-Ligasen). Es wurde beschrieben, dass alle Mitglieder der Cullin-Familie als Komponenten verschiedener SCF Komplexe mit NEDD8 modifiziert werden können (Wada 1999). Dabei ist die NEDDylierung von Cullin für die Aktivität des SCF-Komplexes notwendig (Liu 2002). Inzwischen wurde eine Reihe weiterer nicht zur Cullin-Familie gehöriger Proteine als Substrate für NEDD8 identifiziert. Dazu gehören E2F1 (Loftus 2012), der Regulator von Calcineurin 1 (RCAN1) (Noh 2012), Parkin und PINK1 (Um 2012), Hu Antigen R (HuR) (Embade 2012), IKK γ (Noguchi 2011), HIF-1 α und -2 α (Ryu 2011), Ataxin-3 (Ferro 2007), pVHL (Li 2006), Mdm2 (Xirodimas 2004), p53 und sein

Homolog p73 (Watson 2006), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Oved 2006), das mit Brustkrebs assoziierte Protein 3 (Gao 2006).

2.4 Zielsetzung

Auf der Suche nach bislang unbekanntem intrazellulären Interaktionspartnern des Makrophagen Migrations Inhibitionsfaktor (MIF), einem pleiotropen Immunmodulator, wurde das ribosomale Protein S19 identifiziert (Filip 2009). Damit stellte sich die Frage, ob RP S19 pro-inflammatorische Funktionen von MIF beeinflussen kann. MIF wirkt beispielsweise als Chemokin auf Monozyten/Makrophagen und ist in der Lage die inhibitorische Wirkung von Glucocorticoiden aufzuheben. Es sollte daher untersucht werden, ob RP S19 diesen sogenannten *glucocorticoid overriding* Effekt von MIF sowie dessen chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen beeinflussen kann.

Ein weiterer intrazellulärer Interaktionspartner von MIF ist JAB1/CSN5, die fünfte Unter-einheit des COP9 Signalosoms (CSN). Das CSN wirkt als DeNEDDylase und beeinflusst über die Dekonjugation von NEDD8, einem Protein aus der Ubiquitin-Familie, und Cullin 1 die Aktivität von SCF E3 Ligasen. MIF wiederum inhibiert durch Bindung an JAB1/CSN5 die DeNEDDylase Aktivität des CSN. Neben den Cullinen werden auch einige ribosomale Proteine NEDDyliert (Xirodimas 2008). Daher sollte untersucht werden, ob RP S19 kovalent mit NEDD8 verknüpft und so die Wirkung von MIF auf das CSN moduliert werden kann.

Von RP S19 sowie einigen anderen ribosomalen Proteinen ist auch bekannt, dass bestimmte Punktmutanten zu einer Diamond Blackfan Anämie führen. Einige dieser Mutanten verändern die Bindung von RP S19 an die Serin-Threonin-Kinase PIM-1 (Chiocchetti 2005). Analog dazu sollte überprüft werden, ob RP S19 Mutanten, die mit DBA in Verbindung gebracht werden, auch eine veränderte Bindung an MIF zeigen. Darüberhinaus sollte eine Reihe von amino- und carboxyterminalen Verkürzungsmutanten von RP S19 eingesetzt werden, um den oder die Bereiche im RP S19 Protein zu identifizieren, die für die Interaktion mit MIF notwendig sind.

Die Interaktion von MIF und RP S19 könnte nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär von funktioneller Bedeutung sein. So ist seit langem bekannt, dass MIF in geringen Mengen im Blut nachweisbar ist. Auch für RP S19 wurde dies bereits von einer Arbeitsgruppe gezeigt (Semba 2010), deren Befund hier überprüft werden sollte.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid 30 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aktivkohle Norit CN1	Norit, Amersfoort, Niederlande
Agar Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin bovine serum, fatty acid free, low endotoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua bidest.	
Blocking Reagenz	Qiagen, Hilden
Bacto-Trypton	BD Bioscience, Sparks, USA
Bacto-Hefeextrakt	BD Bioscience, Sparks, USA
Brilliant Blau G Konzentrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau-NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextransulfat 5000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Guanidin Hydrochlorid 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iodoacetamid	Bio Rad, Hercules, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)sulfat	Riedel de Haen, Seelze
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharid (LPS) <i>E.coli</i> 0127:B8	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Non-fat dry milk	Bio-Rad, München
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Percoll	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Salzsäure rauchend 37%	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

3.1.2 Kits

Bradford Protein Assay	Bio Rad, München
JET Star Plasmid Purification System	Genomed, Löhne
humanes TNF alpha Elisa Kit	eBiosciences AMDS, Malden, NL
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAexpress Detection and Assay Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond AX	Macherey Nagel, Düren

3.1.3 Kulturmedien/Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Minimal Essential Medium low Glucose without L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	PAA, Pasching, Österreich

Optimem serumfrei

Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Zelllinien

COS 7	Nieren-Fibroblasten der grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i> (erhalten von Prof. G. Suske, Marburg)
HEK-293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen (erhalten von der Arbeitsgruppe von Prof. T. Chakraborty, Giessen)
HeLa	Humane Epithelzellen aus einem Cervixkarzinom (erhalten von der Arbeitsgruppe von Prof. T. Chakraborty, Giessen)
264.7 RAW	Murine Makrophagen (bezogen von der Firma Cell Lines Service, Eppelheim)
NIH 3T3	Murine Fibroblasten eines Adenokarzinoms (erhalten von Prof. O. Eickelberg, Giessen jetzt München)

Monozyten/Makrophagen wurden wie in 3.2.2.7 beschrieben frisch aus Buffy Coats isoliert. Die Buffy Coats wurden vom Institut für Klinische Immunologie und Transfusionmedizin des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell 6-Well und 96-Well	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatten	
Transwell Filter System	Corning, Schiphol, Niederlande
Einmalspritzen 1ml	Braun, Melsungen
Microlance Kanüle	Beckton Dickinson, Drogheda, Ireland
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Konische Röhrchen, Polypopylen (15ml, 50ml)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäß (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Parafilm, Menasha, USA
Zählkammer Neubauer improved	Labor Optik, Friedrichsdorf
Objektträger	Menzel, Braunschweig

3.1.6 Geräte

Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Blaulichtransilluminator Visi-Blue	UVP, Cambridge, UK
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Klasse II, BDK-S 1800	
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Geldokumentationseinrichtung mit UV-Transilluminator	Intas, Göttingen
Gel Jet Imager 2000	
Heizblock DB-2A	Techne, Cambridge, UK
Horizontal Minielektrophoresesystem PerfectBlue	PEQLAB, Erlangen
CO ₂ -Brutschrank CB	Binder, Tuttlingen
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Umkehrmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Inkubationsschüttler Certomat IS	B. Braun Biotech, Melsungen
Schüttelapparat 3017	GFL, Burgwedel
Semi-Dry-Elektroblotter	PEQLAB, Erlangen
Vertikales Elektrophoresesystem PerfectBlue	PEQLAB, Erlangen
Hochgeschwindigkeitszentrifuge RC5C	Sorvall Instruments bei Thermo Scientific, Dreieich

3.1.7 Sonstiges

DNA High and Low Mass Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Größenmarker: DNA Ladder (100 bp und 1 kb)	Promega, Mannheim
VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Amersham ECL Western Blot Nachweissystem	GE Healthcare, Freiburg
Hybond ECL Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Freiburg
Protein Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Ni ²⁺ NTA Agarose beads	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg

3.1.8 Enzyme

Bam HI	Promega, Mannheim
Eco RI	Promega, Mannheim
Nde I	Promega, Mannheim
Xho I	Promega, Mannheim
Hind III	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim

Material und Methoden

Taq Polymerase	Promega, Mannheim
DNase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Peq Lab, Erlangen
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Roche, Mannheim

3.1.9 Antikörper

3.1.9.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Firma	Verdünnung
Maus M2 anti Flag	Sigma, Steinheim	1:10000
Kaninchen anti NEDD8	Axxora, USA	1:500
Maus anti RP S19	Dr. Fabrizio Loreni Universität Rom, Italien	1:500
Kaninchen anti MIF Serum	AG Meinhardt	1:10000
Anti his HRP konjugiert	Qiagen, Hilden	1:2000
Huhn anti EGFP	Acris/Novus Bio, USA	1:8000
Kaninchen anti GFP	Biomol, Hamburg	1:5000
Human anti CD14 FITC	Miltenyi Biotec	1:10

3.1.9.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Firma	Verdünnung
Kaninchen anti Maus HRP	Cell Signaling, USA	1:3,000
Ziege anti Kaninchen POD	ICN, Ohio, USA	1:10,000
Esel anti Huhn POD	Acris/Novus Bio, USA	1:8,000

3.1.10 Oligonukleotide

Name	Sequenz
His_S19_up_Nde1	ctgcacatgcaccaccaccaccacatggactacaaggacgacgatgacaagg
His_S19_low_Nde1	aattccttgatcgcgccttgtagtccatattgggtggtggtggtgcatggtgcaggtac
His_L11_for_Nde1	tcgaagcttgacacatgcaccaccaccaccacatggactacaaggacgacgat
His_L11_rev_Nde1	gatcgaattctatttgcagg

3.1.12 Bakterienstämme

E.coli DH5 α , *E.coli* XL1-Blue

3.1.13 Expressionskonstrukte

His ₆ -NEDD8	in pcDNA3.1 (Dr. D. Xirodimas, Universität Dundee, Dundee, UK) (Xirodimas 2004)
L11-Flag	in pcDNA3.1 (Prof. KH. Vousden, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK) (Lohrum 2003)
RP S19-GFP Mutanten	in pEGFP-C3 (Dr. L. Da Costa, Laboratoire d'Hematologie, Paris, FR) (Da Costa 2003)
RP S19-Flag Mutanten	in pcDNA3.1 (Dr. M. Angelini, Universität „Tor Vergata“, Rom, IT) (Angelini 2007)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Agarose-Gele (0,8-1,5%) in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch kurzes Aufkochen gelöst und in einer Gelkammer mit Kamm ausgebracht. Nach Polymerisation des Gels, wurde der Kamm entfernt und in die entstandenen Taschen die Proben (Größenmarker und in 1x Probenpuffer gelöste DNA-Proben) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 2 V/cm durchgeführt, bis entweder die Bromphenolblau oder die Xylencyanol Bande circa zur Mitte des Gels migriert waren. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel im UV-Transilluminator mit dem Gel-Jet-Imager dokumentiert.

TAE-Puffer (50x):

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
<hr/>	
	auf 1 L aufgefüllt

10x Probenpuffer:

0,5M Tris-HCl pH 6,8	1 ml
10% SDS (w/v)	1,6 ml
Glyzerin	0,8 ml
DTT	0,64 g
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Wasser	4 ml
<hr/>	
Aqua bidest.	auf 10 ml aufgefüllt

3.2.1.3 Klonierung des His-FLAG getagten RP L11 Proteins mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe einzelsträngiger Oligonukleotide (siehe Abb. 3) und dem pFLAGwtRPL11 Template wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion DNA-Fragmente amplifiziert.

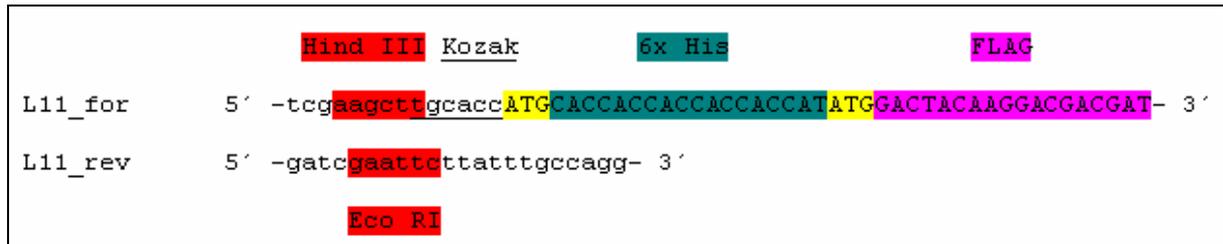


Abbildung 3: Darstellung der Oligonukleotide mit deren Hilfe die His-FLAG-getagten Varianten des RP L11 Proteins hergestellt wurde. Schnittstellen der Restriktionsenzyme Hind III und Eco RI (rot), die Kozak-Sequenz (unterstrichen)(Kozak 1995), der His-Tag (türkis) und der FLAG-Tag (rosa) wurden farbig unterlegt.

Für eine Standardreaktion wurden pipettiert:

Taq Polymerase	1,2 u	0,4µl
dNTP's	jeweils 10 mM	1µl
Primer	jeweils 25 pmol	1µl
Template	50 ng	1µl
PCR Puffer (10x)		5µl
H ₂ O		41,6µl
Gesamtansatz		50µl

Zur Amplifizierung der Reaktionsansätze wurde folgendes PCR-Programm genutzt.

95°C	10:00 min	Denaturierung	} 30 Zyklen
95°C	0:30 min	Denaturierung	
60°C	0:30 min	Primer-Anlagerung	
72°C	2:00 min	Elongation	
72°C	10:00 min	Endelongation	
4°C	endlos	Kühlung	

Sowohl das so entstandene DNA-Fragment als auch der pFLAGwtRPL11-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Eco RI geschnitten (siehe 3.1.2.5) und anschließend

ligiert (siehe 3.2.1.8). Nach Amplifizierung des so entstandenen DNA-Plasmides in *E.coli* Bakterien (siehe 3.2.1.9 und 3.2.1.10) wurde dieses für die Neddylierungsversuche weiter verwendet (siehe 4.3).

3.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Amplifizierung wurde der QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen genutzt. Dabei wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

Nach Zugabe eines Puffers binden DNA-Fragmente ab 100 bp Größe an eine Silikatmembran. Kleinere Fragmente, wie Primer oder auch andere Moleküle (z.B. Enzyme), binden nicht und können in mehreren Waschschrinen entfernt werden. Später wurden die DNA-Fragmente mit bidestilliertem Wasser eluiert.

3.2.1.5 Restriktionsenzym-Verdau

Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente und zur Vorbereitung der Klonierung, wurden die DNA-Fragmente und die Vektoren mittels Restriktionsenzymen sequenzspezifisch hydrolytisch gespalten. Dabei wurden die Vorgaben der Hersteller beachtet. Das heißt, die Reaktionsansätze mit den Enzymen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Inaktivierung der Enzyme bei 60°C für 10 min gestoppt.

3.2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Qualex II Gel Extraction Kit von Qiagen genutzt. Dabei wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

Das die spezifische DNA-Bande enthaltende Gelstück wurde ausgeschnitten und in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration bei 50°C für 10 min gelöst, sodass die DNA unter diesen Bedingungen an zugegebene Kügelchen binden konnte. Nach mehreren Waschschrinen erfolgte die Elution der DNA in bidestilliertem Wasser.

3.2.1.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde photometrisch in wässriger Lösung durchgeführt. Es wurden 10 mm Quarzküvetten benutzt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 260 und 280 nm. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration

berechnet und die Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95 %.

3.2.1.8 DNA-Ligation

Die zuvor restriktionsenzymatisch geschnittenen DNA-Fragmente (Insert) und Vektoren wurden mit Hilfe der T4 DNA Ligase ligiert. Der Vektor wurde dann mit Phosphatase am 5'Ende dephosphoryliert. Der Vektor und das Insert wurden dabei in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:3, 1:1, 3:1) zueinander in einem Standard-Reaktionsansatz eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 37°C für eine Stunde.

Ligase	1,5u	0,5 µl
LigasePuffer (10x)		3,0 µl
Insert		x µl
Vektor		x µl
H ₂ O		x µl
Gesamtansatz		30,0 µl

3.2.1.9 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* Bakterien wurden diese nach dem vereinfachten Protokoll von Hanahan chemisch kompetent gemacht. Dazu wurde eine 30 ml SOB-Kultur mit 100µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis die optische Dichte (OD 600) bei 0,45 bis 0,55 lag. Die Bakterienkultur wurde 10 Minuten auf Eis gestellt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 12 Minuten bei 4°C und 2,500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml TFB-Puffer resuspendiert. Nach 10-15 Minuten auf Eis wurde die Suspension erneut für 12 Minuten bei 4°C und 2,500 Upm zentrifugiert. Nun wurden die Zellen nach Verwerfen des Überstandes in 2,4 ml TFB-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 84 µl DMSO für 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Es wurden 84µl 1M DTT zugegeben und 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach weiterer Zugabe von 84µl DMSO folgte eine letzte Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Zu jeweils 50µl Bakteriensuspension wurde die zu transformierende DNA gegeben und für 30 Minuten auf

Material und Methoden

Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und anschließender 12 minütiger Inkubation auf Eis wurden 800 µl, auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Bakterien auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Medium:

Baktotrypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10,0 g
<hr/>	
Aqua bidest.	auf 1 L aufgefüllt

LB-Agar: LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar

SOB-Medium:

Baktotrypton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
<hr/>	
Aqua bidest.	auf 1 L aufgefüllt

Nach dem Autoklavieren des SOB-Mediums wurden 5 ml einer 2 M Mg²⁺-Stammlösung zugefügt.

2 M Mg²⁺-Stammlösung:

MgCl ₂	1 M
MgSO ₄	1 M

TFB-Puffer:

K-MES pH 6,3	10 mM
KCl	100 mM
MnCl ₂ · 2 H ₂ O	45 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mM
[Co(NH ₃) ₆]Cl ₃	3 mM
Aqua bidest.	auf 1L aufgefüllt

SOC-Medium:

SOB-Medium	980 ml
1 M Glucoselösung	20 ml
<hr/>	
Endvolumen	1 L

3.2.1.10 Plasmidpräparation

Maxi-Präp:

Alle Plasmide wurden für die Präparation in *E.coli* DH5 α transformiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Von Einzelkolonien wurden Übernachtskulturen angelegt. Anschließend wurden 200 ml Kulturen mit 1 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden unter Verwendung des JETstar Plasmid Purification Maxi Kits oder des NucleoBond Xtra Maxi Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in Tris-Puffer pH 8.0 eluiert. Um zu einem späteren Zeitpunkt eine Sequenzierung durchführen zu können, wurde auf EDTA im Puffer verzichtet. Die Konzentration der DNA im Eluat wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Mini-Präp:

Von einzelnen Kolonien wurden 5 ml Übernachtskulturen angelegt. Die über Nacht gewachsenen Bakterien werden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem ersten Schritt wurde das Zellpellet in 100 μ l Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lysepuffer wurden 100 μ l Neutralisationspuffer zugegeben. Nach 5 Minuten auf Eis wurden ausgefällte Protein-DNA-Komplexe bei 4°C und 13,000 Upm für 15-30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wurde neue Reaktionsgefäße überführt und zur Fällung der DNA mit 1 ml eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation über 30 Minuten bei 13,000 Upm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 20 μ l Aqua bidest aufgenommen.

Zur Überprüfung der Plasmide wurde die DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Agarose-Gel analysiert, sowie sequenziert (SeqLab, Göttingen).

Resuspensionspuffer:

Glukose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8.0	25 mM

Lysepuffer:

NaOH	0,2 N
SDS	1 %

Neutralisationspuffer:

Kaliumacetat 5M	60 ml
Eisessig (Essigsäure)	11,5 ml
Wasser	28,5 ml

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

NIH3T3- und COS7-Fibroblasten, sowie HEK-293- und HeLa-Epithelzellen werden in DMEM Nährmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, sowie 2 mM L-Glutamin, bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Unter gleichen Bedingungen, jedoch in RPMI Nährmedium (10% fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) werden die primär isolierten primären Monozyten/Makrophagen und die RAW-Makrophagen kultiviert.

Bei einer Konfluenz von 80% werden die Zellen passagiert, indem sie nach Entfernen des Nährmediums zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen werden und durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Wenn die Zellen sich vollständig abgelöst hatten, wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von Vollmedium mit FKS gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 100g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die erneut in Vollmedium resuspendierten Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2-1:8 in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität wurde Trypan-Blau verwendet. Eine kleine Menge Zellsuspension wurde 1:1 (v/v) mit Trypan-Blau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer (improved) ausgezählt. Lebende Zellen werden nicht gefärbt, blau gefärbte Zellen sind schwer geschädigt oder bereits tot.

3.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen werden eingefroren, indem in ca. 900 µl Vollmedium konzentrierte und suspendierte Zellen 1:1 mit frisch präpariertem Gefriermedium (70% DMEM, 10% FKS, 20% DMSO) vermischt und in spezielle Gefriergefäße gefüllt werden. Diese Gefriergefäße werden zunächst über Nacht in einer Cryo-Gefrierbox bei -80°C gelagert. Die Cryo-Gefrierbox sorgt für eine kontrollierte Abkühlung der Zellsuspension, sodass die Zellen ohne Kristalleinschlüsse einfrieren können und durch diese nicht zerstört werden. Zur längeren Lagerung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Um die Zellen aufzutauen, werden diese für zwei Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und schnellstmöglich mit Vollmedium vermennt und für 5 Minuten bei 100g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden in frischem Vollmedium resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert.

3.2.2.4 Transiente Transfektion durch Lipofektion

Zellen wurden so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% hatten. Die Menge des Nährmediums und die Menge an Transfektionsmedium und Transfektionsreagenz wurden entsprechend den Herstellerangaben für die verschiedenen Gewebekulturformate eingesetzt. Es wurde sowohl in Gewebekulturplatten mit sechs Vertiefungen, als auch in Gewebekulturplatten mit 10 cm Durchmesser gearbeitet. Für die Transfektion von Plasmid-DNA in Eukaryonten wurde üblicherweise ein DNA:Transfektionsreagenz-Verhältnis von 1:1 angewandt.

Zunächst wurde eine entsprechende Menge Optimem-Medium (ohne Zugabe von FKS und Penicillin/Streptomycin) mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) vorsichtig vermennt und fünf Minuten inkubiert. Währenddessen wurde in einem anderen Reaktionsgefäß die DNA mit Optimem-Medium vermennt und schließlich zum Lipofectamin-Optimemgemisch hinzu gegeben. Nach vorsichtigem Vermengen wird das Gemisch 15 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen in den Gewebekulturplatten mit warmem PBS oder Medium ohne Zusätze gewaschen und schließlich mit Nährmedium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) bedeckt. Nach der Inkubation und der Bildung der DNA-Lipofectamin-Komplexe wurden die Ansätze zu den Zellen gegeben, indem die Mischung tropfenweise auf den Zellen verteilt wurde. Dann wurden die Zellen bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre für 4h inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde von den Zellen abgesaugt, durch frisches Nährmedium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 20-68 h kultiviert bevor Zelllysate hergestellt wurden.

3.2.2.5 Transiente Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Für die transiente Transfektion von NIH3T3 oder HEK Zellen mit Plasmid-DNA wurde auch die Methode der Kalziumphosphat-Kopräzipitation angewandt. Dazu wurden die Zellen in 10 cm² Gewebekulturplatten so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80% aufwiesen. Die Plasmid-DNA wurde mit sterilem Wasser auf 200 µl aufgefüllt und dann mit 21,6 µl HEBS-Puffer (10x) vermennt. Nach Zugabe von 10,8µl

2M CaCl₂-Lösung wurde der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit warmem PBS oder Medium gewaschen und schließlich mit 15 ml Medium bedeckt. Nach Bildung des DNA-Kalziumphosphat-Präzipitats wurde die Suspension vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch Vollmedium ersetzt. Zelllysate wurden nach weiteren 12-16 h Inkubation hergestellt.

HEBS-Puffer (10x)

NaCl	1,37 M
Glucose	0,06 M
Na ₂ HPO ₄	0,007 M
HEPES pH 7,2	0,2 M
KCl	0,05 M

3.2.2.6 Gewinnung von Zelllysaten

Transfizierte Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Gewebekulturplatten gelöst und in Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300g abzentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer für 15-30 Minuten auf Eis lysiert. Zur weiteren Aufbereitung der Zelllysate wurden diese dreimal durch eine 26G Nadel gedrückt um genomische DNA zu scheren und anschließend für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Zur Klärung der Zelllysate wurden diese schließlich für 10 Minuten bei 4°C und 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen verwendet.

Zellyse-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Igepal CA-630	1% (v/v)
NP-40	

3.2.2.7 Zellisolierung von Monozyten aus Blut

Die Monozyten wurden aus den Buffy Coats von Blutspendern isoliert. Zunächst wurden in einem Ficoll-Gradienten, einem Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, die mononukleären Zellen (PBMC) aufgereinigt. Mit dem nachfolgenden Percoll-Gradienten,

einem kolloidalen Silikat mit einer Polyvinylpyrrolidon Beschichtung, wurden dann Lymphozyten und der Monozyten getrennt.

70 ml Buffy Coat wurden mit der gleichen Menge $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS verdünnt. Dann wurden in mehreren 50 ml Falcon-Gefäßen insgesamt 52,5 ml Ficoll (18 -20°C) vorgelegt und vorsichtig mit der Blut-PBS-Mischung überschichtet, ohne die beiden Phasen zu vermengen. Nach Zentrifugation bei 400g für 30-40 min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor ohne Bremse die obere Phase, die aus Plasma besteht, vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde die darunter befindliche Schicht mit den mononukleären Zellen vorsichtig aufgenommen und zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und zwischendurch abzentrifugiert. Um eine Verunreinigung durch Blutplättchen zu vermeiden, wurden die Zellen mit FKS gewaschen, in HBSS/10% FKS (Hank's Balanced Salt Solution) aufgenommen und auf einen präformierten Percollgradienten gegeben, der zuvor durch Zentrifugation von 1:1 (v/v) mit 2x PBS verdünnter Percoll-Lösung für 40 min bei 15,000g in einem SS34 Rotor bei Raumtemperatur aufgebaut worden war. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 1,000g bildeten sich vier Phasen aus, von denen die oberste tote Zellen und Zelltrümmer enthält. Die zweite Phase enthält Monozyten und wenige Lymphozyten. Die Dritte Phase enthält überwiegend Lymphozyten, während in der vierten Phase die Granulozyten zu finden sind. Die Zellen aus der zweiten Phase wurden zur letzten Aufreinigung mittels Adhärenz für 15 min auf einer Gewebekulturplatte ausgebracht und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, sodass die nicht adhärennten Lymphozyten entfernt wurden. Zur weiteren Verwendung wurden die adhärennten Monozyten vorsichtig abgeschabt und in einer Neubauer Kammer (improved) die Zellzahl bestimmt.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Proteinbestimmung (Bradford)

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Dieses Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brillantblau G250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein. Die Bestimmung wurde in 1 ml Plastikküvetten durchgeführt. Proteinproben von maximal 10µl Volumen wurden mit 1 ml Bradfordreagenz (8,5 % (v/v) H_3PO_4 ; 5 % (v/v) Ethanol; 0,01 % (v/v) Coomassie Brillantblau G 250), welches mit Aqua bidest. 1:5 verdünnt wurde, versetzt und die Extinktion der Lösung nach 5 min bei 595 nm gegen

Wasser/Lysepuffer und Bradfordreagenz als Leerwert bestimmt. Anhand einer BSA-Eichgeraden wurden anschließend die Proteinkonzentrationen berechnet.

3.2.3.2 Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Auftrennung von Proteinproben unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Perfect Blue Vertical Electrophoresis System, Peqlab) durchgeführt. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (4 %) konzentriert und über ein Polyacrylamid-Trenngel (10 - 15 %) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Gelherstellung und die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgten nach Laemmli (Tris/Glyzin) (Laemmli 1970) oder nach der Modifikation von Schägger (Tris/Trizin) (Schägger 1987). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Laemmli Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung eines Tris-Glyzin-Puffers oder nach Schägger eines Anoden-Tris-Puffers und eines Kathoden-Trizin-Puffers für 2-4 h bei 80-120V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Nitrozellulose-Membranen geblottet.

3.2.3.3 Western Blotting und Detektion

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry Verfahren (Perfect Blue Semi-Dry-Electroblotter, Peqlab) auf eine Nitrozellulose-Membran bei 100 mA/Gel für 1 h transferiert. Dafür wurden Filterpapiere in verschiedenen Puffern (1-3) eingeweicht und wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt zusammen mit dem zu blottenden Gelstück und der Nitrozellulose-Membran in folgender Reihenfolge aufgelegt.

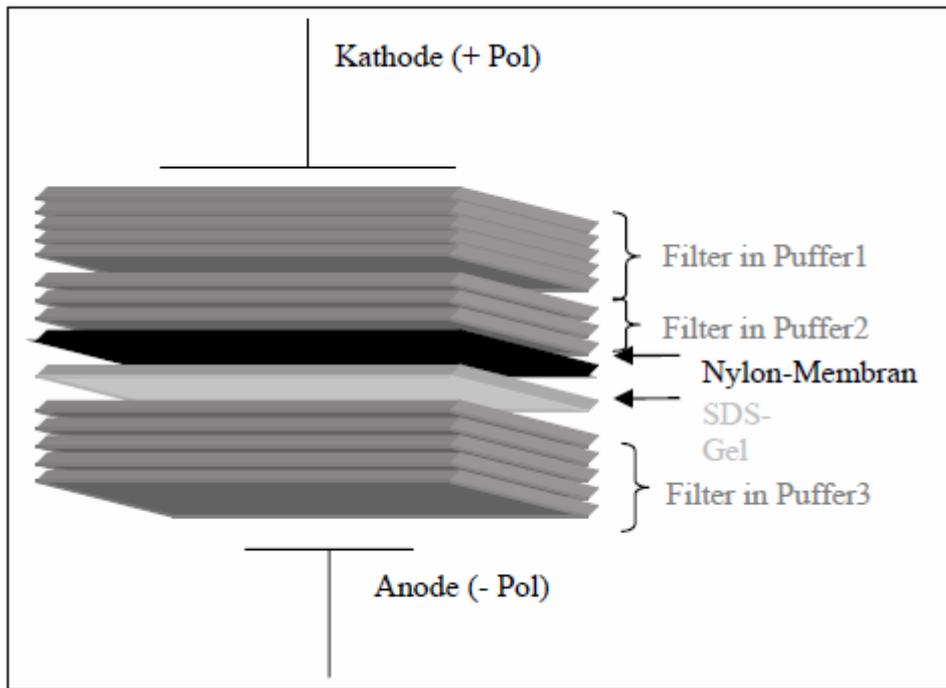


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Filteranordnung bei einem Western Blotting entnommen von: www.edoc.hu-berlin.de

	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
Tris Base	300 mM	30 mM	40 mM
Methanol	20%	20%	20%
6-Aminohexansäure	40 mM	/	/

Anschließend wurde die Membran für 1 h mit einer Blockierungs-Lösung (1x PBS mit 0,1% Tween, 5 % non-fat dry milk) unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach einmaligem kurzem Waschen mit 1x PBS/Tween wurde die Membran mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung (siehe 3.1.9.1), unter ständigem Schütteln für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS/Tween gewaschen und dann mit dem zweiten, mit POD oder HRP konjugierten Antikörper (siehe 3.1.9.2), für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBS/Tween für jeweils 5 min wurde die Membran mit ECL Detektionsreagenz für 60 Sekunden inkubiert. Das Lumineszenzlicht wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert (1-15 min Belichtung).

3.2.3.4 Ko-Immunopräzipitation

30 µl Protein G Sepharose Beads (4 Fast Flow, GE Healthcare) werden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1-2 µl Kaninchen anti MIF Serum in PBS für mindestens

1 h oder über Nacht bei 4°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt), die in einem Überkopf-Schüttler fixiert sind, inkubiert. Die Zelllysate wurden auf vorher dreimal mit PBS gewaschene Sepharose Beads gegeben und bei 4°C rotierend für mindestens 4 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose Beads einmal mit Lysepuffer, sowie folgend zweimal mit kaltem (4°C) PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 25 µl 3x Laemmli Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden abschließend bei 4°C für 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand über SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

3.2.3.5 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung des TNF α Gehaltes in Zellüberständen von isolierten Monozyten wurde das humane ELISA-Kit von eBioscience benutzt. Die Durchführung des Assays, inklusive Erstellung der Standardkurve, geschah nach Angaben des Herstellers. Proben der Zellüberstände wurden verdünnt und auf zuvor über Nacht mit anti TNF α Antikörper beschichteten Vertiefungen einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen verteilt. Nach mehrfachem Waschen und Inkubation mit dem Detektionsantikörper wurde HRP gekoppeltes Avidin und schließlich Substratlösung zugegeben und bei einer Wellenlänge von 450nm die Adsorption gemessen.

3.2.3.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse der Expression von Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen, der Charakterisierung und Bestimmung von verschiedenen Zelltypen in einer heterogenen Zellpopulation, der Abschätzung der Reinheit einer isolierten Subpopulation und der Analyse der Zellgröße und des Zellvolumens.

Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Monozytenkulturen wurden die Zellen mit FITC konjugiertem CD14 Antikörper markiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. CD 14 ist ein Oberflächenprotein, welches spezifisch in Monozyten exprimiert wird und somit als Monozytenmarker dient.

Die isolierten Monozyten wurden in 1ml PBS aufgenommen, sodass ungefähr 100,000 Zellen in jeder Probe analysiert werden konnten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min im Dunkeln mit CD14-FITC Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 100µl PBS inkubiert und erneut mit gewaschen, bevor die Proben im FACS-Calibur (Beckton

Dickinson) gemessen und analysiert wurden. Es wurde der Anteil der CD14-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in der Suspension bestimmt.

3.2.3.7 Neddylation Assay

Zum Nachweis einer Neddylierung wurde ein *in vivo* Neddylierungs-Test angewandt (Xirodimas 2004). HEK-293T-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für NEDD8-His und RP L11-/RP S19-FLAG ko-transfiziert und NEDD8-His sowie NEDD8-His neddylierte Proteine mittels Ni-NTA Chromatographie aufgereinigt. Dafür wurden Ni²⁺-NTA (Nitrilotriessigsäure) Agarosebeads verwendet. Dabei wurde dem Protokoll von Xirodimas (Xirodimas 2008) gefolgt:

36 h nach der Transfektion von HEK Zellen wurden diese lysiert und zur Verringerung der Viskosität mit Ultraschall beschallt. Die Lysate wurden zu 75 µl Ni²⁺-NTA-Agarosebeads hinzu gegeben und für 4 h auf einem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Lyse und Aufreinigung der His-getagten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumchlorid. Die Beads wurden sukzessive mit drei verschiedenen Puffern gewaschen. Der dritte Waschpuffer wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen von Triton X-100 variiert (siehe Pufferliste). Nach dem letzten Waschschritt wurden die Beads mit 200mM Imidazol eluiert.

Die Eluate wurden auf ein 10%iges SDS-PAGE Gel (Tris-Trizin) aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden die Zielproteine RP L11 und RP S19 sowohl über den his-Tag, den FLAG-Tag und ebenso RP S19 direkt detektiert.

Lysepuffer:

Guanidinium-HCl	6 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Imidazol	5 mM

Waschpuffer 1

Guanidinium-HCl	6 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

Waschpuffer 2

Harnstoff	8 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

Waschpuffer 3a

Harnstoff	8 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Triton X-100	0.2 %

Waschpuffer 3b

Harnstoff	8 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

Waschpuffer 3c

Harnstoff	8 M
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Triton X-100	0.1 %

Elutionspuffer:

Imidazol	200 mM
Tris/HCl pH 6.7	150 mM
Glyzerin	30 %
β-Mercaptoethanol	0.72 M
SDS	5 %

3.2.3.8 Monozyten Chemotaxis Test

Der Chemotaxis Test wurde mit humanen Monozyten, die aus Buffy Coats isoliert wurden (siehe 3.2.2.7), durchgeführt. Dafür wurden 5×10^4 Zellen in 200 µl RPMI Medium mit 0,5% Endotoxin freiem BSA in einen Transwell Filtereinsatz gegeben, der dann in eine Gewebekulturplatte mit 24 Vertiefungen eingesetzt wurde an deren Boden zuvor

Glasplättchen ausgelegt wurden. In die Vertiefungen wurden außerdem jeweils 500 μl Medium mit 0,5% BSA und den verschiedenen Zusätzen wie MCP-1 (25 ng/ml), rekombinantem MIF (50 ng/ml), RP S19 (fünffache molare Menge von MIF, gleiche Menge wie MIF, 1/5 der Menge von MIF oder fünffache Menge von MCP-1) gegeben. Nach 3 h Inkubation wurden die Transwell Einsätze entfernt und die Zellen, die durch die Membran des Filters migriert waren und sich auf den Glasplättchen am Boden der Vertiefungen der Gewebekulturplatte abgesetzt hatten durch Zugabe von Paraformaldehyd (1,8% w/v) fixiert. Anschließend wurden die Glasplättchen mit den fixierten migrierten Monozyten vorsichtig entnommen und auf einen Objektträger aus Glas gelegt. Die Glasplättchen mit den migrierten Zellen wurden mit der viskosen Lösung von Hoechst 33342 überzogen und somit die Zellkerne angefärbt. Danach wurden die migrierten Zellen im Mikroskop bei 200 facher Auflösung gezählt indem 23 Sichtfelder in Kreuzform (siehe Abb. 5) ausgezählt wurden. Als Zählreferenz wurden in zwei Vertiefungen jeweils 2,500 und 5,000 Zellen direkt, also ohne Transwell Filtereinsatz, ausgesät. Der Mittelwert der Zählungen in den Vertiefungen mit 2,500 oder 5,000 Zellen wurde als 5% oder 10% migrierte Zellen festgelegt (5×10^4 Zellen befanden sich im Filtereinsatz).

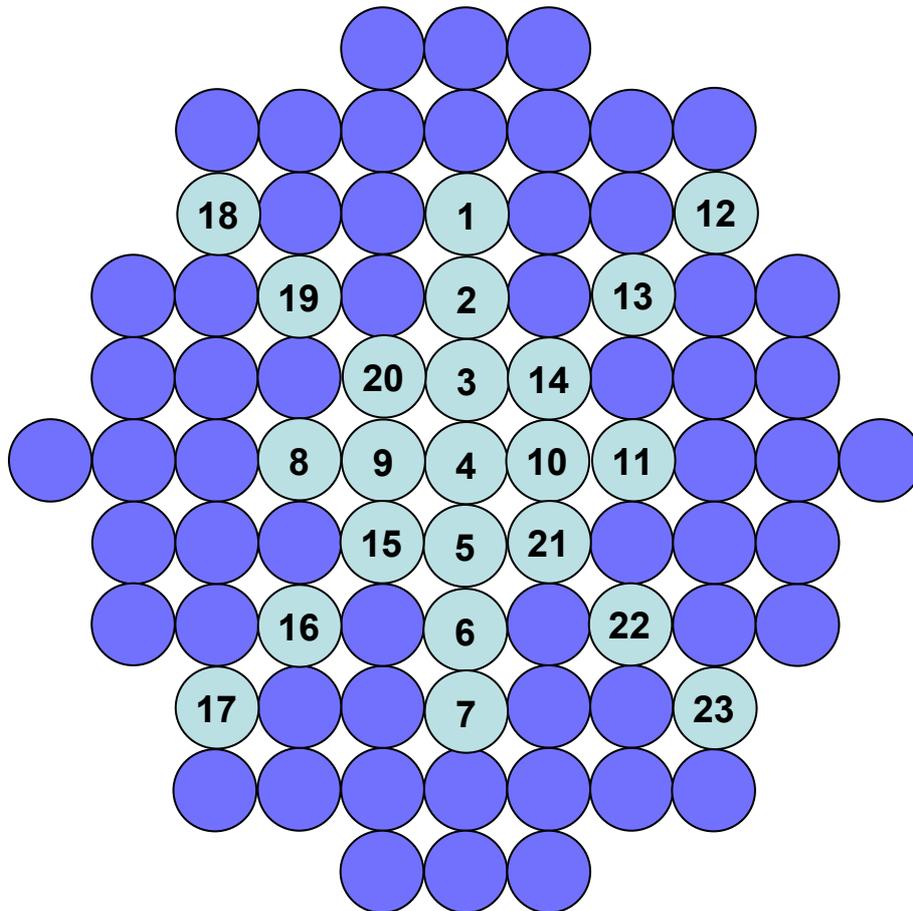


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zählordnung mit 23 Zählfeldern bei 200 facher Vergrößerung

3.2.3.9 Glucocorticoid Overriding Test

Der Glucocorticoid Overriding Test wurde mit humanen Monozyten, die aus Buffy Coats isoliert wurden (siehe 3.2.2.7), durchgeführt. Dafür wurden 1×10^6 Zellen in Nährmedium ohne Zusätze in jede Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 12 Vertiefungen gegeben und die verschiedenen Zusätze, wie LPS (100 ng/ml), Dexamethason (10^{-9} M), rekombinantes MIF (10-1000 ng/ml) oder RP S19 (jeweils die fünffache molare Menge von MIF), zugegeben. Dabei wurde zunächst RP S19 1 h mit MIF separat zu den Zellen präinkubiert und anschließend zusammen mit Dexamethason zu den Zellen gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert, bevor LPS zugegeben wurde. Die Überstände wurden 4 h nach Stimulation gesammelt und die Menge an sezerniertem TNF α mit Hilfe eines TNF α ELISA (siehe 3.2.3.5) quantifiziert.

3.2.3.10 Proteinisolierung aus Blutplasma

Um RP S19 Protein im Blutplasma nachzuweisen wurden durch Zugabe von Dextransulfat in einer finalen Konzentration von 2% zum Blutplasma und anschließender Zentrifugation bei 35,000g bei 4°C und für 30 Minuten Moleküle mit einem sehr hohen Molekulargewicht entfernt (Cornwall 1961). Der Überstand wurde abgenommen und Proteine mit der vierfachen Menge vorgekühlten Acetons (-20°C) über eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 15,000g und 4°C wurde das Pellet in SDS Auftragspuffer resuspendiert und bei nur 42°C für 20 Minuten denaturiert. Anschließend folgten SDS-PAGE und Western Blotting.

3.2.3.11 Statistische Auswertungen

Experimente, die statistisch ausgewertet wurden, wurden mindestens dreimal ausgeführt und ihre Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Vergleiche zwischen unterschiedlichen Bedingungen wurden mit dem Student's t-Test bewertet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet und mit einem * markiert. Ein p-Wert $<0,01$ wurde als hoch signifikant bewertet und mit zwei ** markiert. Ein p-Wert <0.001 wurde als höchst signifikant bewertet und mit drei *** markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt von RP S19 auf die Glucocorticoid-*Overriding* Aktivität von MIF

Das zu den Glucocorticoiden zählende Steroid Dexamethason (Dex) ist in der Lage, die durch Stimulierung mit LPS erfolgende Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie zum Beispiel dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) durch Monozyten oder Makrophagen, zu inhibieren. Dabei schwächt es die ansonsten starke pro-inflammatorische Immunantwort ab, die auf eine TNF α Sekretion normalerweise folgt. MIF hingegen kann die immunsuppressive Wirkung der Glucocorticoide abschalten, indem es die Inhibition der TNF α Produktion aufhebt (*Glucocorticoid-Overriding*). Um einen möglichen Effekt des mit MIF interagierenden Proteins RPS 19 auf die *Glucocorticoid-Overriding* Aktivität von MIF und die daraus resultierende niedrigere Sekretionsrate von TNF α , zu untersuchen, mussten zunächst Monozyten und Makrophagen des peripheren Blutes isoliert werden (siehe 3.2.2.7). Um eine möglichst hohe Reinheit der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) zu erreichen bedurfte es der Etablierung einer tragfähigen Aufreinigungsprozedur. Um die Auswirkung der verschiedenen Aufreinigungsschritte auf die Reinheit der mononukleären Zellen zu eruieren wurden die isolierten Zellen mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) konjugiertem CD14 Antikörper, welcher speziell an Monozyten bindet, inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe 3.2.3.6). Nach Aufreinigung der mononukleären Zellen über einen Ficoll-Gradienten und anschließender Inkubationszeit von 12 Stunden auf einer Gewebekulturplatte, zwecks Selektion zwischen adhärennten Monozyten/Makrophagen und nicht oder schwach adhärennten anderen Zelltypen, wurde eine Reinheit von nur 3-4% erreicht. Durch die Verkürzung der Inkubationszeit auf der Gewebekulturplatte auf 15-45 Minuten, konnte die Reinheit auf 16-18% erhöht werden. Dabei korrelierte das Maß der Reinheit mit der Verkürzung der Inkubationszeit auf der Gewebekulturplatte. Durch Einfügen eines zusätzlichen Percoll-Aufreinigungsschrittes nach der Ficoll-Aufreinigung ließ sich bei 15 Minuten Adhäsionszeit eine Reinheit von 42-45 % erreichen. Diese Aufreinigungsmethode wurde im Folgenden angewandt, um den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Dexamethason und der verschiedenen Aufreinigungsmethoden auf die induzierte Sekretion von TNF α zu untersuchen. Dabei wurde nach Inkubation der verschieden aufgereinigten Zellen mit 100ng/ml LPS alleine oder

Ergebnisse

zusammen mit Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen, das konditionierte Medium abgenommen und mit einem TNF α ELISA (siehe 3.2.3.6) die TNF α Konzentration gemessen. Der lineare Bereich des ELISA lag zwischen 3,9 und 500 pg/ml (siehe Abb. 6).

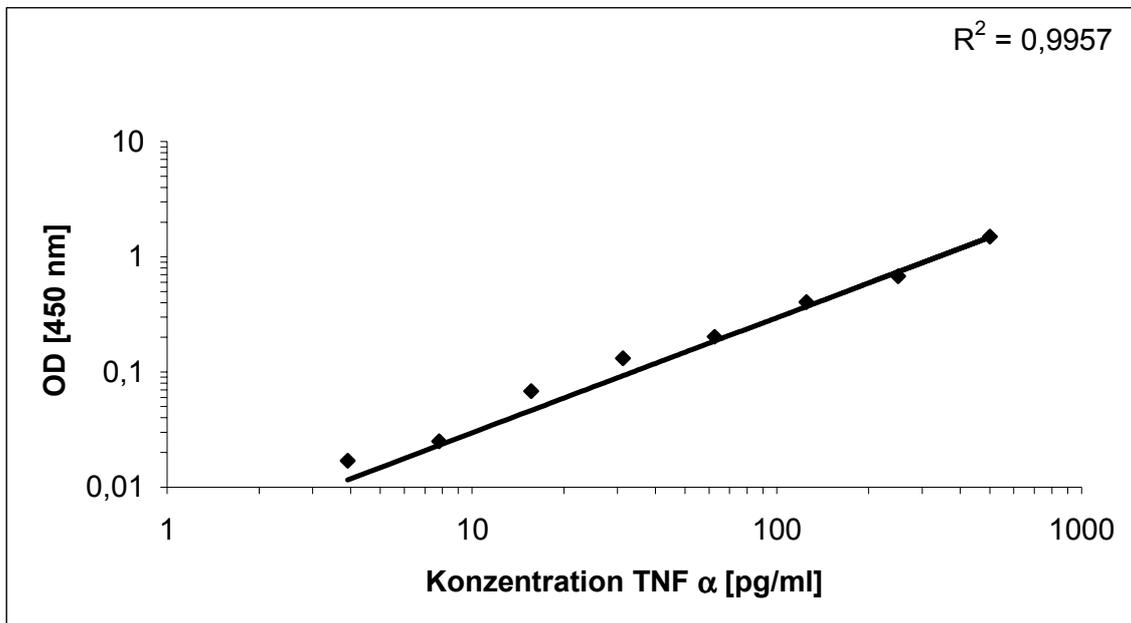


Abbildung 6: Standardkurve für den humanen TNF α ELISA

Bei der alleinigen Aufreinigung der Monozyten/Makrophagen über Ficoll kommt es zu einer schwachen Unterdrückung der TNF α Sekretion durch Dexamethason, unabhängig von der eingesetzten Dexamethasonkonzentration (Abb.7). Wurden die Monozyten/Makrophagen jedoch über einen Ficoll- und anschließend einen Percoll-Gradienten aufgereinigt, konnte eine signifikante Unterdrückung der TNF α Sekretion durch Dexamethason beobachtet werden, die auch dosisabhängig war.

Ergebnisse

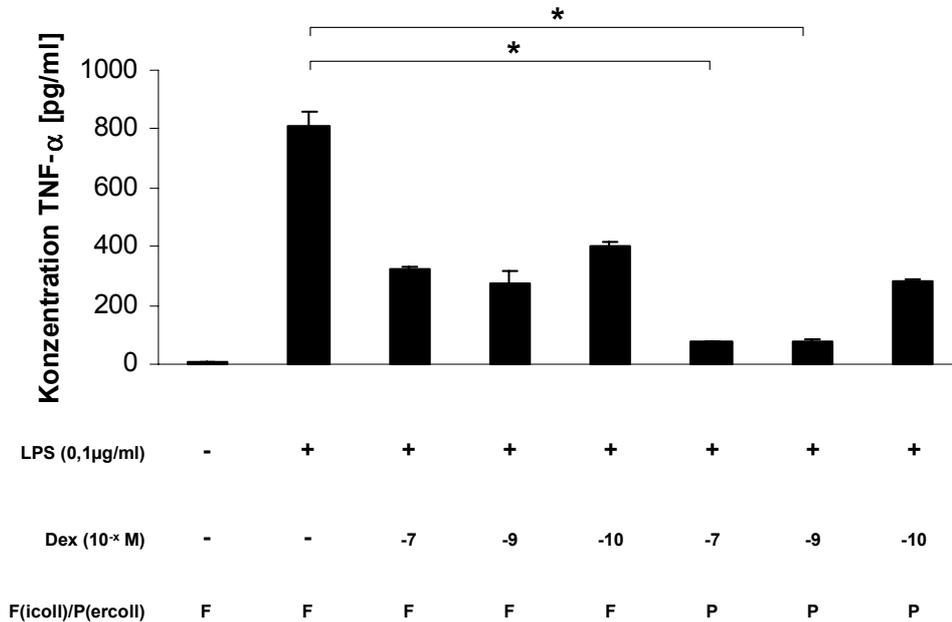


Abbildung 7 Einfluss der Aufreinigungsart und der Dexamethasonkonzentration auf die TNF α Sekretion von Monozyten/Makrophagen

Aus Buffy Coats mit Hilfe eines Ficoll- (F) oder Ficoll- plus Percoll-Gradienten (P) isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden mit unterschiedlichen Mengen Dexamethason nach LPS-Zugabe behandelt und sezerniertes TNF α nach 16 Stunden mit einem ELISA gemessen. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11.

Einen Einfluss hatte zusätzlich auch die Inkubationszeit nach Zugabe von 100 ng/ml LPS. Nach nur einer Stunde Inkubation war noch keine TNF α Sekretion messbar. Es zeigte sich, dass ein Inkubationszeitraum von vier Stunden nach Zugabe von LPS zu einer maximalen signifikanten Unterdrückung der TNF α Sekretion führte, während Dexamethason bei einer Inkubationszeit von 12 und 16 Stunden keine oder nur eine schwache unterdrückende Wirkung zeigte (Abb.8). Die längere Inkubation der mononukleären Zellen nach abschließender Zugabe von LPS über 24 Stunden zeigte eine wiederum leicht erhöhte Wirksamkeit von Dexamethason auf die TNF α Sekretion im Vergleich zu 16 Stunden.

Ergebnisse

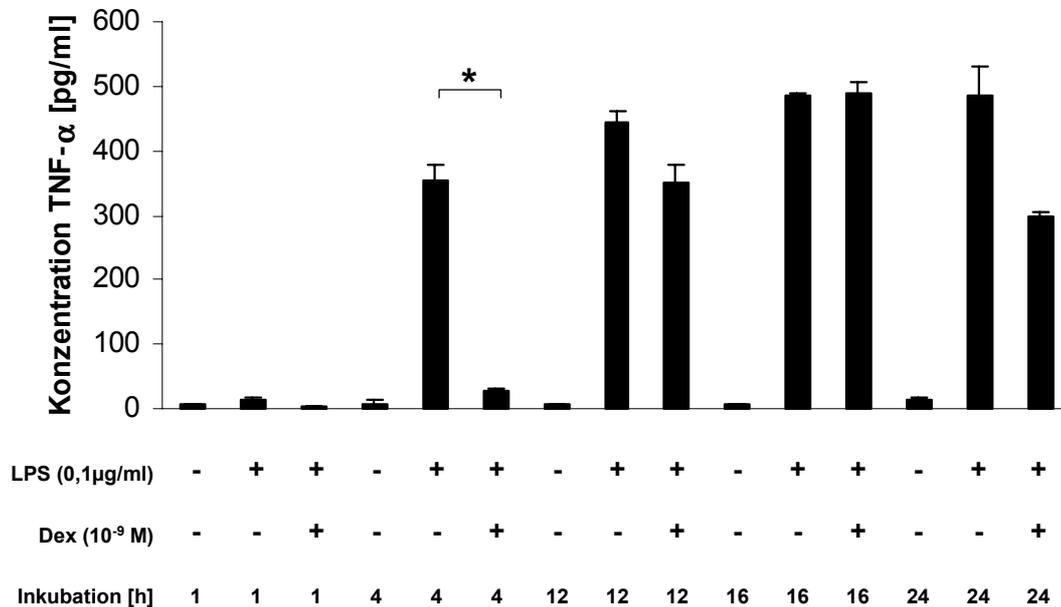


Abbildung 8: Einfluss der Inkubationszeit nach Zugabe von LPS auf die suppressive Dexamethason Wirkung

Mit Hilfe einer Ficoll plus Percoll Aufreinigung aus Buffy Coats isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden nach Zugabe von LPS teilweise mit Dexamethason behandelt (siehe 3.2.3.9). Der Überstand wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen und anschließend per ELISA (siehe 3.2.3.5) TNF α gemessen. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11.

Ausgehend von diesen Befunden wurde nun die Wirkung von RPS 19 auf die Glucocorticoid-*Overriding* Aktivität von MIF untersucht. Dabei wurden Monozyten/Makrophagen über einen Ficoll- und Percoll-Gradienten und 15-minütige Adhärenz auf einer Gewebekulturplatte aufgereinigt. Die so isolierten Monozyten/Makrophagen wurden mit Dexamethason (10⁻⁹ M) alleine, mit Dexamethason (10⁻⁹ M) plus steigenden Konzentrationen von MIF oder zusätzlich mit der fünffachen molaren Menge RP S19 im Vergleich zu MIF, für eine Stunde inkubiert, bevor mit LPS inkubiert wurde (siehe 3.2.3.9). Nach vier Stunden Inkubation wurde TNF α mit einem ELISA im Medium gemessen (3.2.3.6).

Ergebnisse

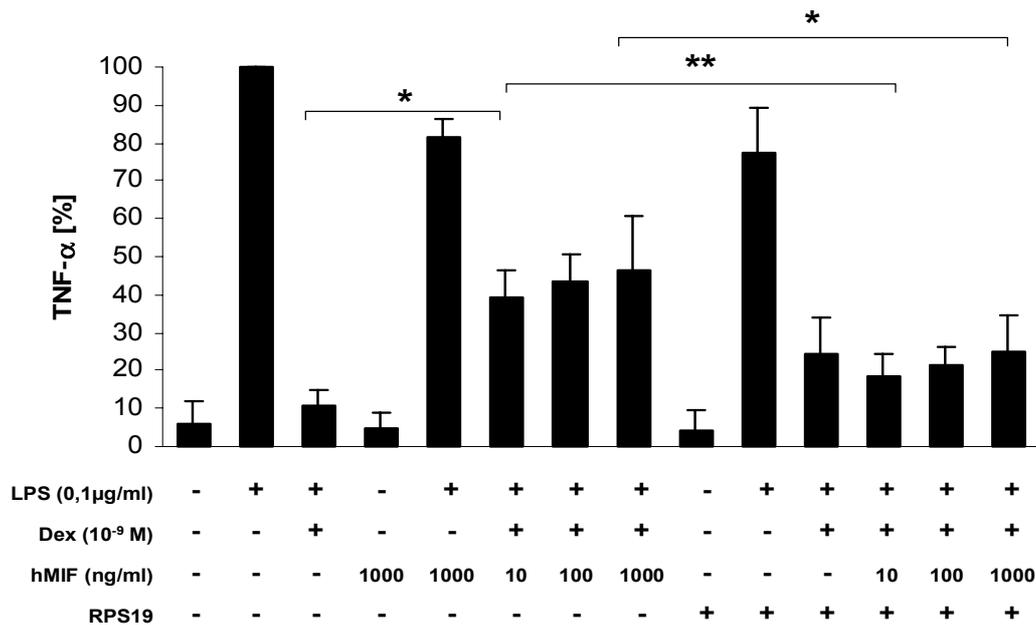


Abbildung 9: Beeinflussung der MIF Glucocorticoid-Overriding Aktivität durch RP S19

Aus Vollblut isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden nach Zugabe von LPS mit Dexamethason, humanem MIF und RP S19 behandelt (siehe 3.2.3.9). Im Überstand wurde nach vier Stunden TNF α mittels einem ELISA (siehe 3.2.3.5) gemessen. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11.

Die absoluten Werte der TNF α Sekretion wurden aus drei verschiedenen Experimenten auf das Sekretionslevel von TNF α nach alleiniger Stimulierung der Zellen mit LPS normiert (100%). Wie in Abbildung 9 zu sehen, inhibiert Dexamethason (Dex) die TNF α Sekretion von Monozyten/Makrophagen, die mit LPS stimuliert wurden (auf 10,6%). Die vorherige Behandlung der Zellen mit steigenden Mengen MIF führt zu einer dosisabhängigen Aufhebung der Dexamethason Inhibition (von 10,6% auf 39-46%). Definiert man eine *Overriding* Aktivität als Verhältnis der Inhibition der LPS induzierten TNF α Sekretion nach Behandlung mit Dex und MIF versus Behandlung nur mit Dex nach unten aufgeführter Formel, dann führt die Zugabe von MIF zu einer *Overriding* Aktivität von 32%-40%.

$$\text{Overriding Aktivität} = \frac{[\text{TNF } \alpha]_{\text{LPS+Dex+MIF}} - [\text{TNF } \alpha]_{\text{LPS+Dex}}}{[\text{TNF } \alpha]_{\text{LPS}} - [\text{TNF } \alpha]_{\text{LPS+Dex}}}$$

Das mit MIF interagierende Protein RP S19 kann, in fünffachem molarem Überschuss zu MIF hinzugegeben, die aufhebende Wirkung von MIF auf die TNF α Inhibition durch

Dexamethason signifikant rückgängig machen. Dabei sinkt das TNF α Level wieder auf 18-25% der LPS-Positivkontrolle, was bedeutet, daß die Glucocorticoid Inhibition der durch LPS induzierten TNF α Sekretion zu einer Erholung der Glucocorticoid Aktivität auf 83-90% des alleinigen Dexamethason-Wertes führt.

Sowohl RP S19, als auch MIF alleine zeigen dagegen keine Wirkung auf die TNF α Sekretion von Monozyten/Makrophagen. Nach vorheriger Stimulation der Zellen mit LPS zeigt die Zugabe von RP S19 alleine oder zusammen mit Dexamethason ebenfalls keine abweichende Wirkung im Vergleich zu beiden Ansätzen ohne RP S19. Zusammenfassend konnte also beobachtet werden, dass RP S19 die biologische Funktion der Glucocorticoid aufhebenden Aktivität von MIF signifikant inhibieren kann.

4.2 Inhibition der MIF-induzierten Monozyten/Makrophagen Migration durch RP S19

Um eine weitere bereits bekannte biologische Aktivität von MIF auf eine mögliche Beeinflussung durch das ribosomale Protein RP S19 zu überprüfen, wurde ein Chemotaxis-Test durchgeführt. MIF wurde zunächst als ein Faktor beschrieben, der die zufällige Migration von Monozyten oder kultivierten Makrophagen inhibiert. Außerdem wurde berichtet, dass MIF die Wirkung des *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1) inhibieren kann (Hermanowski-Vosatka 1999). Neueren Untersuchungen zufolge, die eine aktive chemotaktische Wirkung von MIF bei vaskulären Myozyten (Schrans-Stassen 2005) oder der Rekrutierung von Monozyten bei Atherosklerose zeigen (Bernhagen 2007), ist die inhibierende Wirkung von MIF auf MCP-1 am überzeugendsten mit einer Kompetition zu erklären.

Zum Nachweis der chemotaktischen Wirkung von MIF wurden Monozyten aus peripherem Blut/Buffy Coats isoliert und zunächst mit verschiedenen Arten von Kälberserumalbumin (BSA), welches aufgrund seiner desaggregierenden Wirkung auf Zellen in das Medium aller Ansätze zugegeben wird, inkubiert. Da jedwede stimulierende Wirkung von Endotoxinen auf die Makrophagen/Monozyten verhindert werden muss, musste zunächst geklärt werden, mit welchem BSA es zu keiner Migration der Makrophagen/Monozyten kommt. Zur Isolierung der Monozyten/Makrophagen wurde dieselbe Methode wie im Glucocorticoid-*Overriding* Experiment beschrieben angewandt (siehe 3.2.2.7). Zur Bestimmung der Migrationsrate der isolierten Makrophage/Monozyten in allen folgenden Experimenten wurde der Transwell Assay eingesetzt (siehe 3.2.3.8).

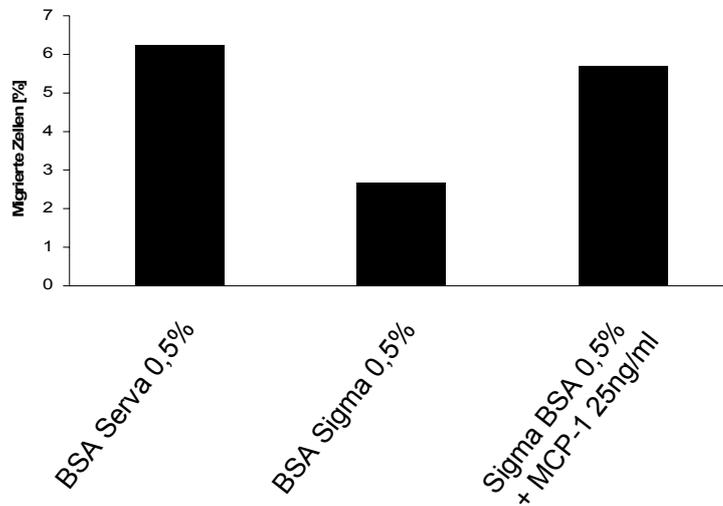


Abbildung 10: Monozyten/Makrophagen Migrationsrate bei Verwendung von endotoxin-haltigem (Serva) oder –freiem (Sigma) BSA

Aus Buffy Coats isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden in Transwell Einsätze plattiert und in Medien gehängt, die MCP-1 als Chemoattraktant und eine der beiden getesteten BSA-Pärparationen enthielten (siehe 3.2.3.8). Nach drei Stunden wurden die durch den Filter gewanderten Zellen gezählt, und die Migrationsraten in % der eingesetzten Zellzahl berechnet. Darstellung eines einzelnen Experimentes.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist es unbedingt nötig endotoxin-freies BSA (Sigma-A8806) einzusetzen, da sonst wie bei alleiniger Zugabe von BSA von der Firma Serva (Serva-11930), welches nicht endotoxin-frei ist, die Rate an migrierten Zellen bereits schon das Niveau der Positivkontrolle MCP-1 von circa 6% erreicht.

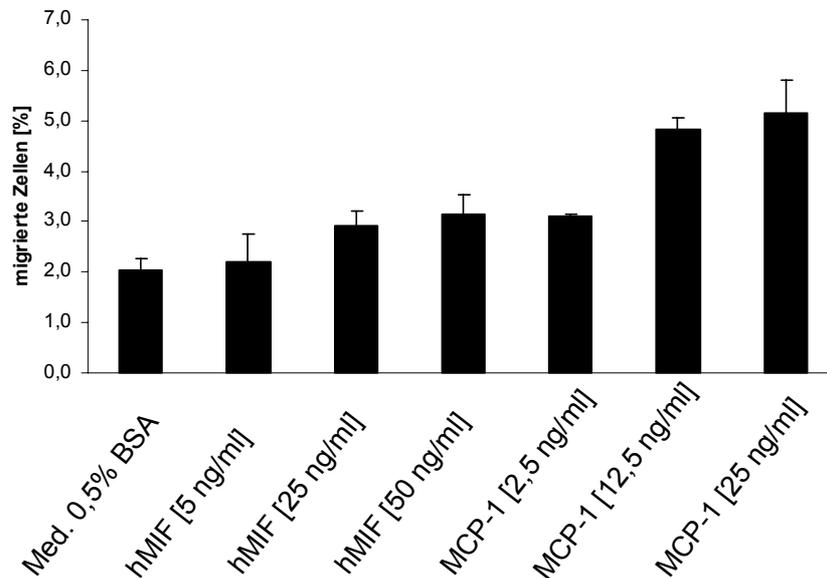


Abbildung 11: Einfluss verschiedener Konzentrationen von MCP-1 und MIF auf die Migrationsrate von Monozyten/Makrophagen

Aus Buffy Coats isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden in Transwell Einsätze plattiert und in Medien gehängt, die MCP-1 oder MIF als Chemoattraktant enthielten (siehe 3.2.3.8). Nach drei Stunden wurden die durch den Filter gewanderten Zellen gezählt, und die Migrationsraten in % der eingesetzten Zellzahl berechnet. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11

Um die optimalen Konzentrationen von MCP-1 und MIF zur Aktivierung der Monozytenmigration zu bestimmen, wurden verschiedene Mengen von MCP-1 und humanem MIF den Zellen zugesetzt. In Abbildung 11 sieht man, dass die Migrationsrate sowohl bei MCP-1, als auch bei MIF dosisabhängig ist. Dabei erreicht die Migrationsrate bei MCP-1 Zugabe ab 12,5 ng/ml und bei MIF von 25 ng/ml ein Plateau. In den folgenden Experimenten wurden dann 50 ng MIF und 25 ng MCP-1 eingesetzt, um jeweils eine maximale Migration zu bekommen. Bei Zugabe von 25ng/ml MCP-1 wurde eine Migrationsrate von rund 5% zu beobachtet, wogegen die Zugabe von 50ng/ml MIF nur zu einer moderaten Erhöhung der basalen Migrationsrate um etwa 50% auf etwa 3% der eingesetzten Zellen führt.

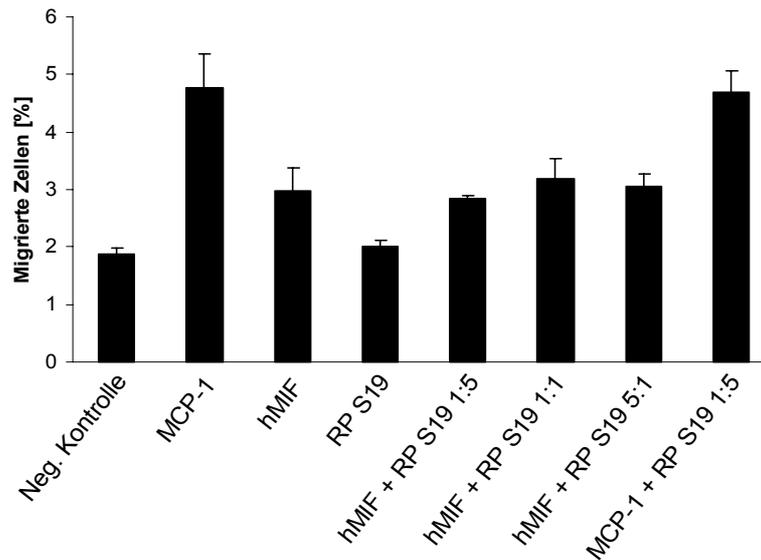


Abbildung 12: Wirkung von RP S19 auf die MIF-induzierte Monozyten/Makrophagen Migration

Aus Buffy Coats isolierte humane Monozyten/Makrophagen (siehe 3.2.2.7) wurden in Transwell Einsätze plattiert und in Medien gehängt, die als Chemoattraktant MCP-1 und MIF sowie zusätzlich RP S19 enthielten (siehe 3.2.3.8). Nach drei Stunden wurden die durch den Filter gewanderten Zellen gezählt, und die Migrationsraten in % der eingesetzten Zellzahl berechnet. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Chemotaxis-Tests nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von RP S19 zu sehen. In der Negativkontrolle ohne Zugabe von Testproteinen migrieren 1,8% der Zellen durch die Membran. Ähnlich sah es bei der alleinigen Zugabe von RP S19 aus (2%). Sowohl bei alleiniger Zugabe von MCP-1 als auch zusammen mit einem fünffachen molaren Überschuss an RP S19 beträgt die Migrationsrate der Zellen 4,7%. Dies zeigt, dass RP S19 keinen inhibierenden Effekt auf die chemotaktische Wirkung von MCP-1 hat. Eine leichte, allerdings statistisch nicht signifikante Erhöhung der Migrationsrate tritt bei der Zugabe von humanem MIF auf (3%). Die Zugabe sowohl der fünffachen (2,85%), als auch der gleichen Menge an RP S19 zusätzlich zu MIF (3,2%), sowie die Zugabe einer fünffachen Menge von MIF im Vergleich zu RP S19 (3%), führten zu keiner signifikanten Veränderung der Migrationsrate, verglichen mit der alleinigen Zugabe von MIF. RP S19 hat offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die ohnehin schwache chemotaktische Wirkung von MIF auf Monozyten/Makrophagen.

4.3 Das ribosomale Protein S19 wird nicht neddyliert

Bei der Suche nach neuen Zielproteinen für die post-translationale Modifikation mit dem ubiquitin-ähnlichen Protein NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*), konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl ribosomaler Proteine mit NEDD8 konjugiert wird (Xirodimas 2008). Diese Modifikation wird auch als Neddylierung bezeichnet. Eines der wenigen ribosomalen Proteine, bei denen keine Neddylierung nachgewiesen werden konnte war RP S19, das als MIF Interaktor beschrieben wurde (Cayli 2009). Da jedoch eine Konjugation von NEDD8 an verschiedene ribosomale Proteine zunächst nachgewiesen wurde, aber nach weiterführenden Experimenten nicht für alle Proteine bestätigt werden konnte, konnte umgekehrt eine Konjugation von NEDD8 an RP S19 auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Daraufhin wurde gezielt untersucht, ob RP S19 mit dem ubiquitin-ähnlichen Protein NEDD8 konjugiert ist oder nicht. Eine solche Modifikation mit NEDD8 wurde für das ribosomale Protein L11 nachgewiesen, welches im Folgenden als Positivkontrolle diene.

Zum Nachweis einer Neddylierung wurde ein *in vivo* Neddylierungs-Test angewandt (Xirodimas 2004). HEK-293T-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für NEDD8-His und RP L11-/RP S19-FLAG ko-transfiziert und NEDD8-His sowie NEDD8-His neddylierte Proteine mittels Ni-NTA Chromatographie aufgereinigt. Die Detektion der Zielproteine RP L11 und RP S19 erfolgte über den FLAG-Tag. Lyse und Aufreinigung der His-getagten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumchlorid.

Zur Erhöhung der Spezifität und der Ausbeute an neddylierten Proteinen wurden die FLAG-getagten ribosomalen Proteine RP L11 (siehe 3.2.1.3) und RP S19 (siehe 3.2.1.2) zusätzlich mit einem His₆-Tag versehen.

Zur Optimierung der Expressionsrate wurde in das RP S19 Konstrukt, wie im RP L11 Konstrukt bereits vorhanden, eine Kozak-Sequenz (Kozak 1995) über spezifische Oligonukleotide eingeführt (siehe 3.2.1.2, 3.2.1.3). Anschließend wurde untersucht, ob sich durch die zusätzliche Kozak-Sequenz eine Erhöhung der Expressionsrate in transfizierten Zellen nachweisen lässt. Dabei kam es jedoch bei der Transfektion des RP S19 Konstruktes mit oder ohne Kozak-Sequenz zu keiner signifikanten Änderung der Expressionsrate von rekombinantem RP S19-Protein.

Da die Expressionsrate speziell von NEDD8-His sehr schwach war, wurde die DNA mit verschiedenen Präparations-Kits isoliert und in verschiedene Zelltypen transfiziert. Dabei war

Ergebnisse

zu beobachten, dass es bei gleicher transfizierter Menge an NEDD8-DNA bei, mit dem Nucleobond AX Präparations-Kit der Firma Macherey und Nagel präparierter NEDD8-DNA, im Vergleich zu NEDD8-DNA, die mit dem JetStar Kit der Firma Genomed präpariert wurde, zu einer deutlich besseren Expressionsrate von NEDD8-Protein kam (siehe Abb. 13). Außerdem wurden zum Vergleich zwei Zelltypen (HEK-293T und HeLa) mit beiden DNA Präparationen transfiziert. Nur bei der Transfektion von HEK-293T Zellen kam es zu einer detektierbaren Expression von rekombinantem NEDD8-Protein sowie einer Vielzahl neddylierter Proteinen (Abb. 13). Als Kontrolle der eingesetzten Lysatmenge diente die Detektion von endogenem RP S19.

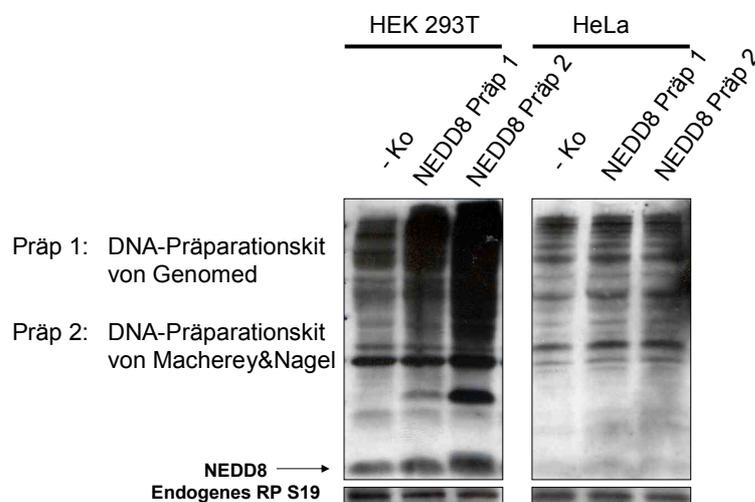


Abbildung 13: Vergleich der Expressionsrate von NEDD8 und neddylierter Proteine nach Transfektion verschiedener NEDD8-DNA Präparationen
HEK 293T und HeLa Zellen wurden mit unterschiedlich präparierten NEDD8 Expressionkonstrukten transfiziert und nach 36 Stunden lysiert (siehe 3.2.2.4 und 3.2.2.6). NEDD8 wurde anschließend in den Zelllysaten mit Hilfe eines *Western Blots* nachgewiesen (siehe 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurden nun die Expressionskonstrukte für His₆-getagtes NEDD8 sowie His₆-und FLAG-markiertes RP S19 oder RP L11 in HEK 293T-Zellen ko-transfiziert, die neddylierten Substrate mit Hilfe der Aufreinigung über den His-Tag aus den gesammelten Zelllysaten isoliert und anschließend über den FLAG-Tag im *Western Blot* detektiert.

Ergebnisse

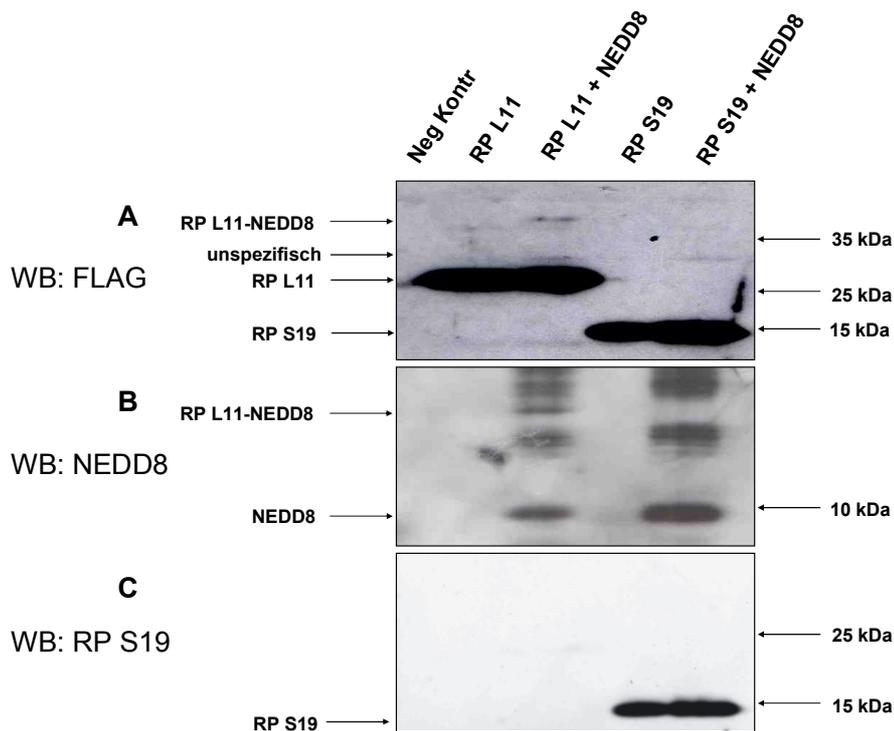


Abbildung 14: Neddylierung ribosomaler Proteine

Expressionskonstrukte für His-RP L11 oder His-RP S19 sowie NEDD8-His wurden in HEK 293T Zellen ko-transfiziert und die Zellen nach 36 Stunden lysiert (siehe 3.2.2.4 und 3.2.2.6). Aus den Zelllysaten wurden mit Hilfe von Ni^{2+} -NTA-Agarosebeads die im Lysat enthaltenden Proteine mit einem His-Tag (siehe 3.2.3.7) aufgereinigt und per SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden FLAG (A), NEDD8 (B) und RP S19 (C) in einem *Western Blot* nachgewiesen (siehe 3.2.3.3).

In Abbildung 14A wurden nach FLAG-Detektion große Mengen der nicht modifizierten Formen von RP L11 und RP S19 erkennbar. Allerdings lässt sich nur bei RP L11 auch eine neddylierte Form detektieren (über den FLAG-Tag in (A) und über NEDD8 in (B)). Nach Detektion mit einem anti-NEDD8 Antikörper ist anhand der molekularen Größe sowohl monomeres NEDD8 in den beiden Spuren mit aufgereinigten Proteinen aus NEDD-His transfizierten Zellen zu erkennen (Abb. 14B) aber nur bei RP L11 auch die neddylierte Form. Auch die Detektion mit einem anti-RP S19 Antikörper (Abb. 14C) zeigt nur die unmodifizierte Form von RP S19. Zusammenfassend kann man also feststellen, dass ein kleiner Teil des in HEK293T Zellen vorhandenen RP L11 mit NEDD8 konjugiert vorliegt, während neddyliertes RP S19 nicht nachweisbar ist.

4.4 Zwei Punktmutanten von RP S19 zeigen eine erniedrigte MIF-Bindung

Im Folgenden wurden die drei RP S19 Punktmutanten W52R, R62W und R101H hinsichtlich ihrer Bindung an MIF untersucht. Bei allen drei Mutationen handelt es sich um bekannte Mutationen im RP S19 Gen, die zu einem Aminosäureaustausch führen und bei Patienten mit Diamond-Blackfan-Anämie gefunden wurden (Draptchinskaia 1999).

Zunächst wurden Expressionskonstrukte für den RP S19 Wildtyp sowie die drei verschiedenen Punktmutanten in HEK 293T sowie HeLa Zellen mittels Lipofektion transfiziert, um zu sehen welche der beiden Zelllinien am besten für das Experiment geeignet waren. Dabei war zu beobachten, dass die Expressionsrate in HeLa Zellen vergleichsweise niedrig ist, während sie bei den HEK 293T-Zellen deutlich höher liegt (Abb. 15).

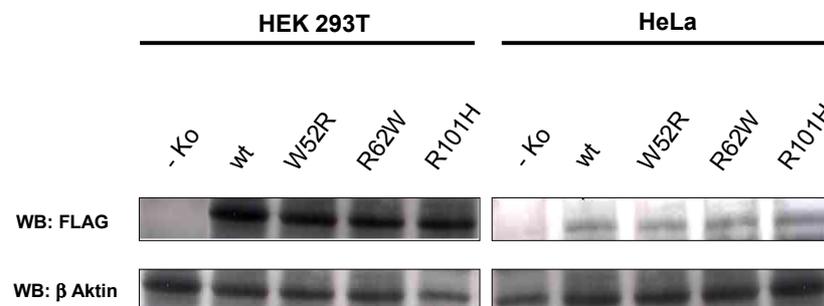


Abbildung 15: Vergleich der Expressionsraten von RP S19-FLAG Wildtyp und Punktmutanten in zwei Zelllinien

Expressionskonstrukte für den RP S19 Wildtyp sowie drei verschiedene Punktmutanten wurden in HEK 293T Zellen und HeLa Zellen transfiziert (3.2.2.4 und 3.2.2.6). Als Negativkontrolle wurde pcDNA3.1 Leervektor transfiziert. In den beiden verschiedenen Zelllysaten (HEK293T und HeLa) wurden anschließend FLAG und β-Aktin mit Hilfe jeweils eines *Western Blots* für jeden Zelltyp nachgewiesen (siehe 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

Ergebnisse

In beiden Zelltypen waren im *Western Blot* klar detektierbare Mengen an RP S19 Protein nur in Zelllysaten vorhanden, die aus lysierten Zellen von mindestens einer Zellkulturplatte mit einem Durchmesser von 90 mm präpariert wurden. Daher wurde überprüft, ob statt Lipofektion auch die einfachere und preiswertere Methode der Kalziumphosphattransfektion zu gut detektierbaren Mengen an rekombinantem Protein führt. Dies war jedoch nicht der Fall, so dass alle weiteren Experimente mit Lipofektion und HEK 293T Zellen durchgeführt wurden.

Die MIF-Bindung der RP S19 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde mit Hilfe einer Ko-Immunopräzipitation mit anschließender *Western Blot* Detektion untersucht. Dabei wurden RP S19 Wildtyp und die RP S19 Mutanten durch humanes MIF kopräzipitiert und anschließend über ihren angehängten FLAG-Tag detektiert. In Abbildung 16A ist beispielhaft eines von drei durchgeführten Experimenten dargestellt. Das Wildtyp RP S19 Protein wurde wie bereits beschrieben kopräzipitiert, was auch auf die drei verwendeten RP S19 Mutanten zutrifft. Die beiden Mutanten RP S19-W52R und RP S19-R62W zeigen jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant niedrigere Bindung, wogegen die Kopräzipitation mit RP S19-R101H variable Ergebnisse zeigten.

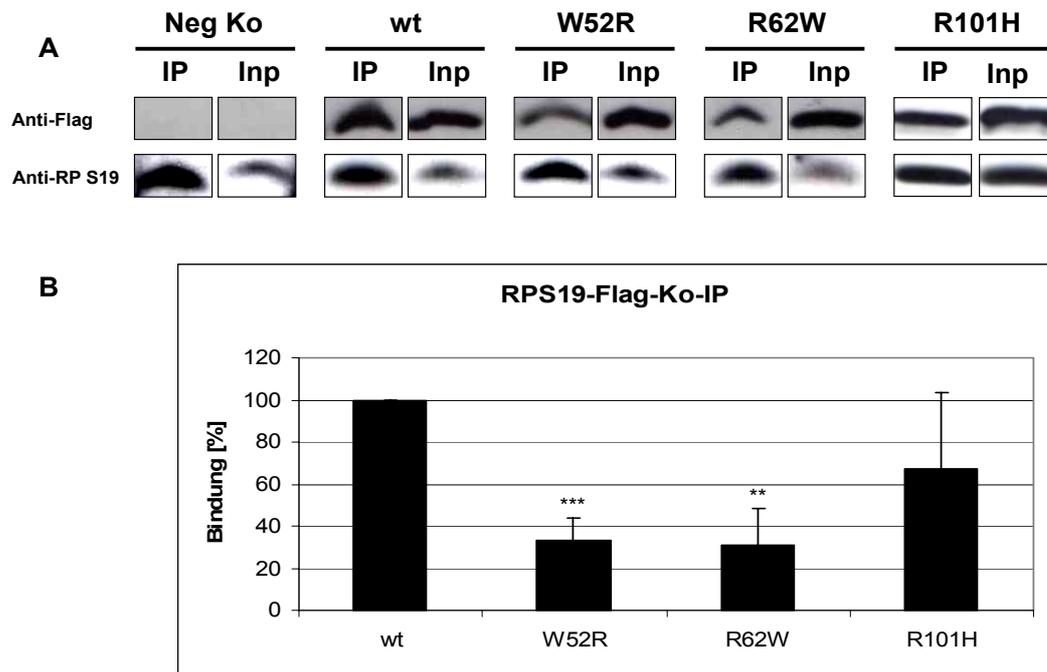


Abbildung 16: Koimmunopräzipitation verschiedener RP S19 Punktmutanten durch humanes MIF

(A) Expressionskonstrukte für drei RP S19-FLAG markierte Punktmutanten und den RP S19 Wildtyp, sowie der pcDNA3.1 Leervektor als Negativkontrolle, wurden in HEK 293T transfiziert und die Zellen anschließend lysiert (3.2.2.4 und 3.2.2.6). Per Ko-Immunopräzipitation (siehe 3.2.3.4) wurde die Bindung von Wildtyp und Punktmutanten an MIF untersucht. Die Präzipitation erfolgte mit Hilfe eines anti-MIF-Antikörpers, der an Protein G Sepharose Beads immobilisiert wurde. Ko-präzipitierte RP S19 Proteine wurden über den FLAG-Tag im *Western Blot* detektiert. Gezeigt ist hier eines von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. (B) Graphische Darstellung aller drei Experimente (siehe Text). Die Kopräzipitation des RP S19 Wildtyp wurde auf 100% gesetzt. Zur statistischen Auswertung siehe 3.2.3.11.

In Abbildung 16B sind die Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente graphisch dargestellt. Dafür wurden die kopräzipitierten Banden des Wildtyps und der RP S19 Mutanten mit Image J quantifiziert, auf gleiche Mengen RP S19 Protein über die anti-RP S19 Detektion normiert und der Mittelwert der drei Ergebnisse im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Von der W52R Mutante wurde demgegenüber 67% weniger kopräzipitiert und von der R62W Mutante 69% weniger. Zwischen der R101H Mutante und dem Wildtyp gab es dagegen keinen signifikanten Unterschied.

4.5 Identifikation der MIF-RP S19 Interaktionsdomäne

Um die Domäne im RP S19 Protein zu identifizieren, welche für die MIF-Bindung notwendig ist, wurden Expressionskonstrukte für verschiedene sowohl NH₂-, als auch COOH-terminale Verkürzungsmutanten in COS7 Zellen transfiziert und die Proteine mit anti-MIF Antikörper kopräzipitiert. Dazu wurden die in Abbildung 17B dargestellten cDNA-Konstrukte verwendet, die von Lydie Da Costa zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden für eine Studie hergestellt, in der *nucleolar localisation signals* (NOS) im RP S19 Protein identifiziert wurden (Da Costa 2003).

Ergebnisse

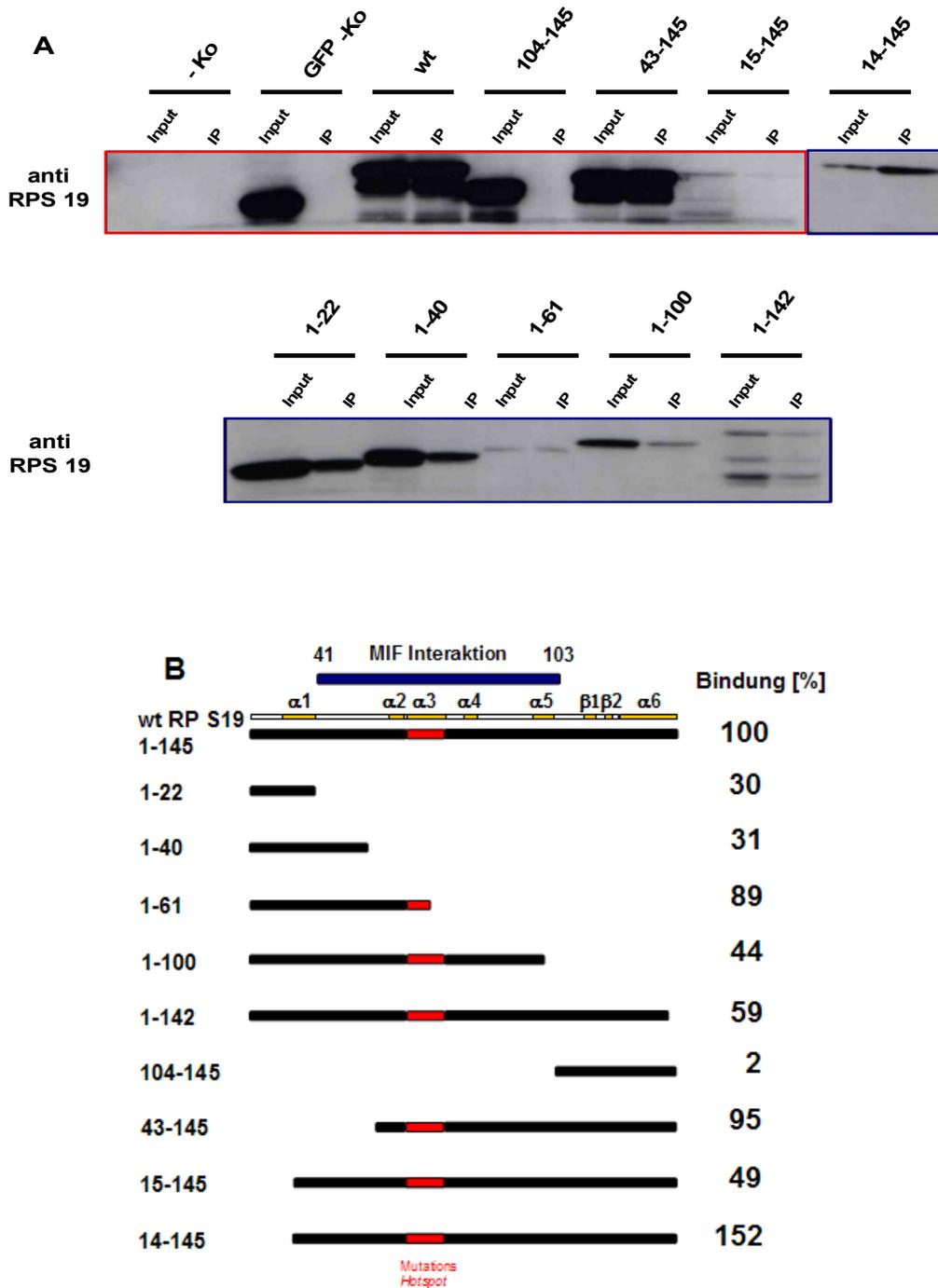


Abbildung 17: Ko-Immunopräzipitation verschiedener RP S19 Verkürzungsmutanten durch humanes MIF

(A) Konstrukte zur Expression der bezeichneten RP S19-GFP Verkürzungsmutanten und des Wildtyps wurden in COS7 Zellen transfiziert und die Zellen anschließend lysiert (3.2.2.4 und 3.2.2.6). Nach Ko-Immunopräzipitation (siehe 3.2.3.4) von RP S19 Wildtyp und Mutanten mittels anti-MIF Antikörper wurden die Proteine über ihren GFP-Tag im *Western Blot* nachgewiesen. Die gezeigten Banden stammen von zwei verschiedenen *Western Blots*, die mit roter bzw. blauer Umrandung markiert sind.

(B) Schematische Darstellung der eingesetzten RP S19 Verkürzungsmutanten. Der rot markierte Bereich stellt den sog. Mutations *Hot Spot* im RP S19 Gen dar. Die Mutanten

Ergebnisse

wurden nach den noch vorhandenen Aminosäuren benannt. Der blaue Balken oben stellt den Bereich im RP S19 Protein dar, der für die Interaktion mit MIF erforderlich ist. Oberhalb des Wildtyps sind die Sekundärstrukturelemente des Proteins (α -Helices und β -Faltblätter) in gelb dargestellt (entnommen aus (Campagnoli 2008)).

Proteinbanden im *Western Blot* wurden mit *Image J* quantifiziert. Die Menge an kopräzipitiertem Protein wurde zur Menge im Input (10% des Lysats) ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Bindung dargestellt.

Dazu wurden erneut die Expressionskonstrukte in COS7 Zellen durch Lipofektion transfiziert und Wildtyp RP S19 sowie die Verkürzungsmutanten mit anti-MIF Antikörper kopräzipitiert und in einem *Western Blot* über den GFP-Tag detektiert.

Abbildung 17A zeigt die Ergebnisse der *Western Blots*. Um die Bindung von MIF an die exprimierten RP S19 Mutanten miteinander vergleichen zu können, wurden die Inputbanden nach Quantifizierung mittels Image J zur Normierung verwendet. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind zusammen mit der schematischen Darstellung der eingesetzten Verkürzungsmutanten in Abbildung 17 B zu sehen.

Berücksichtigt man, dass die Mutanten 1-61 und 15-145 nur schwach exprimiert werden und die Mutante 1-141 nicht stabil zu sein scheint, ergibt sich ein Proteinabschnitt von Aminosäure 41-103, der für die Interaktion mit MIF notwendig zu sein scheint (siehe Abb. 17 blau markiert).

4.6 Nachweis von RP S19 in humanem Blutplasma

Das RP S19 Monomer konnte vor kurzem in humanem Blutplasma und in sehr geringen Mengen ebenso in Blutserum nachgewiesen werden (Semba 2010). Da auch MIF in geringen Mengen im Plasma vorkommt, wurde versucht die MIF-RP S19 Interaktion im Blutplasma durch Ko-Immunopräzipitation nachzuweisen. Dafür wurde zunächst Plasma wie beschrieben (Semba 2010) mit Dextransulfat inkubiert, um Lipoproteine zu entfernen. Nach einer 35,000 g Zentrifugation wurden die Proteine mit Aceton gefällt, in Harnstoff haltigem Probenpuffer (siehe 3.2.10) aufgenommen und bei 42°C denaturiert. In einem *Western Blot* wurde dann RP S19 zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert (Spuren 1-5). Als Kontrollen (Spuren 7-11) wurde Blutplasma verwendet, das mit 10 ng rekombinantem RP S19 (Spur 6) versetzt wurde. In Abbildung 18 ist zu sehen, dass Zentrifugation (Spur 2) und Inkubation mit Dextran/Zentrifugation (Spur 3) keinen Einfluss auf das unspezifische Bindungsmuster des anti-RP S19 Antikörpers hatte. RP S19 konnte weder im unbehandelten Serum (Spur 1) noch im Serum nach Zentrifugation (Spur 2) bzw. nach Inkubation mit Dextran (Spur 3)

Ergebnisse

nachgewiesen werden. Zwar konnte die Entfernung eines Großteils der Immunglobuline durch Protein G Sepharose, einen Großteil der unspezifischen Banden entfernen (Spuren 4-5), jedoch wurde RP S19 dadurch nicht detektierbar. Der Vergleich mit den Spuren 7-11 zeigt, dass die Probenaufbereitung nicht zu einer verbesserten Detektion von RP S19, sondern im Gegenteil zu einem massiven Verlust des zugesetzten RP S19 Proteins bis an die Nachweisgrenze führt. Weitere Experimente führten zu dem Schluss, dass die Nachweisgrenze für RP S19 bei 2-3 ng liegt, sodass man schließen kann, dass die im Serum vorhandene Proteinmenge unter 200-300 ng/ml liegen muss. Für MIF wurden bei normalen Probanden 50ng/ml Serum gefunden. Diese Mengen reichen jedoch nicht aus, um nach einer Immunopräzipitation von Serum-MIF das Protein im *Western Blot* nachweisen zu können. Aus diesem Grunde wurde auf weitere - wenig aussichtsreiche - Ko-immunopräzipitationsexperimente verzichtet.

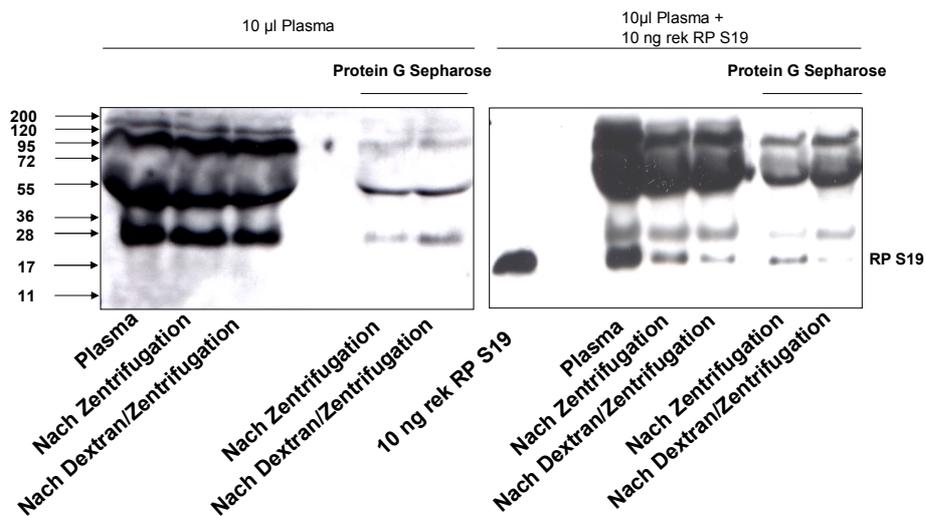


Abbildung 18: Nachweis von RP S19 in humanem Blutplasma

RP S19 Protein wird durch Zentrifugation und Behandlung mit Dextransulfat und weiterer Zentrifugation aus 10µl humanem Blutplasma aufgereinigt (siehe 3.2.3.10) und anschließend mit Hilfe eines *Western Blots* nachgewiesen. Zur weiteren Aufreinigung des Blutplasmas wird dieses für eine Stunde mit Protein G Sepharose Beads inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Als Positivkontrolle für den Nachweis von RP S19 wurden 10ng rekombinantes RP S19 zugegeben.

5 Diskussion

Auf der Suche nach bislang unbekanntem intrazellulären Interaktionspartnern von MIF wurde das ribosomale Protein S19, welches Bestandteil der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms ist, identifiziert (Filip 2009). Verschiedene ribosomale Proteine, wie auch Translations- und Elongationsfaktoren haben nicht nur eine Funktion im Ribosom (Wool 1996; Jeffery 2009), sondern spielen auch eine Rolle in der Regulation des Zellwachstums (Marechal 1997), der Transformation (Wilson 1994) und dem Zelltod (Horino 1998). Speziell für RP S19 konnte die Bindung an einige extraribosomale Proteine gezeigt werden. Dabei handelt es sich um den *fibroblast growth factor 2* (FGF-2), mit dem RP S19 im Zytoplasma interagiert (Soulet 2001) sowie um die Serin/Threonin-Kinase PIM-1, die nach Bindung an RP S19 zu dessen Phosphorylierung führt (Chiocchetti 2005).

Es konnte jedoch nicht nur nachgewiesen werden, dass RP S19 an MIF *in vitro* bindet, sondern auch, dass beide Proteine im Zytoplasma kolokalisieren (Filip 2009). Daraufhin stellte sich die Frage, ob ein Heterodimer aus beiden Proteinen und dessen Lokalisation im Zytoplasma eine funktionelle Bedeutung hat. Daher wurde hier überprüft, ob die Heterodimerisierung die pro-inflammatorischen Funktionen von MIF beeinflusst.

5.1 RP S19 inhibiert die *glucocorticoid-overriding* Aktivität von MIF

Glucocorticoide sind sehr effiziente anti-inflammatorische Substanzen, die über verschiedene Mechanismen funktionieren (Tjandra 1996) und die Aktivität pro-inflammatorischer Zytokine unterdrücken. Im Gegensatz dazu wird die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins MIF bei geringen Glucocorticoidkonzentrationen sogar noch erhöht, während hohe Konzentrationen von Glucocorticoiden die Expression nicht negativ beeinflussen (Calandra 1995; Waeber 1997; Leech 1999).

Da viele der pro-inflammatorischen Eigenschaften von MIF mit seiner Fähigkeit in Verbindung gebracht werden, als Antagonist für Glucocorticoide im Immunsystem zu fungieren (Calandra 1995), wurde überprüft, ob die Bindung von RP S19 an MIF einen Einfluss darauf hat. Einer der wichtigsten anti-inflammatorischen Effekte von Glucocorticoiden besteht in der Inhibition der TNF α Freisetzung durch Makrophagen. MIF wirkt diesem Effekt entgegen, indem es die Inhibition der Freisetzung von TNF α wieder aufhebt, was eine erhöhte Freisetzung von TNF α zur Folge hat (Calandra 1995; Bucala

Diskussion

1996). Diese Wirkung von MIF wird als *Glucocorticoid-overriding* bezeichnet. Auch konnte gezeigt werden, dass der *Glucocorticoid-overriding* Effekt von MIF bei mit LPS und anschließend mit dem Glucocorticoid Dexamethason sowie rekombinatem MIF behandelten Mäusen zu letalen Sepsisverläufen führt (Calandra 1995).

Die Ergebnisse des hier beschriebenen Versuches (siehe Abb. 6 Kapitel 4.1) zeigen, dass durch Zugabe von RP S19 zu rekombinatem MIF in Anwesenheit von Dexamethason, die anti-inflammatorische Wirkung des Glucocorticoids wiederhergestellt wird, MIFs *Glucocorticoid-overriding* Aktivität also durch RP S19 inhibiert werden kann. Die Expression von TNF α durch Makrophagen nach Stimulation mit LPS wird durch die Bindung von RPS 19 an MIF auf dasselbe niedrige Level gebracht, das dem Endotoxin hyposensitiven Phänotyp, den MIF defiziente Makrophagen nach LPS Stimulierung zeigen, entspricht (Bozza 1999).

Darüberhinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass rekombinantes RP S19 Protein einen ausgeprägten anti-inflammatorischen Effekt in einem Glomerulonephritis Mausmodell aufweist (Lv 2013). In diesem Modell wird mit Hilfe von Schaf IgG und Schaf anti-Maus *glomerular basement membrane* (GBM) Serum eine Glomerulonephritis ausgelöst. Typisch hierfür ist eine Proliferation des parietalen Epithels der Bowman Kapsel mit Infiltration von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten sowie extrazellulärer Ablagerung von Fibrin und Collagen, die zur Bildung sogenannter *Crescents* um die Glomeruli führt. Mäuse die nicht oder mit dem Kontrollprotein SCGB2A1 behandelt wurden, entwickeln eine schwere Glomerulonephritis, die mit erhöhten Kreatininwerten im Serum erniedrigter Kreatininwerte-Clearance und einer erhöhten Proteinurie einherging. Weiterhin waren die Konzentrationen von MIF und dessen Rezeptor CD74 in der Niere erhöht, die Signaltransduktionswege ERK und NF- κ B aktiviert und infolge einige Th1 und Th17 Zytokine sowie IL-1 β erhöht. Erhielten die Mäuse dagegen nach Induktion der Krankheit täglich RP S19 intraperitoneal über zehn Tage, so konnte die Bildung von glomerulären *Crescents*, glomerulärer Nekrose, erhöhter Proteinurie und renaler Dysfunktion weitestgehend verhindert werden. Darüberhinaus konnte die RP S19 Gabe die Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von MIF und CD74 inhibieren und auch die Aktivierung der Signaltransduktionswege ERK und NF- κ B verhindern.

Die Aufhebung der *Glucocorticoid-overriding* Aktivität von MIF sowie die inhibitorische Wirkung in einem Glomerulonephritis Mausmodell, in dem MIF eine wichtige Rolle spielt, stellen damit weitere nichtribosomale Funktionen von RP S19 dar. Es ist also nicht

Diskussion

ausgeschlossen, dass RP S19 bei MIF-abhängigen inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen eine therapeutische Bedeutung erlangen könnte.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die pro-inflammatorische Funktion von MIF durch Inhibition der Tautomeraseaktivität aufgehoben werden kann (Kleemann 2002). Ebenso wird die Freisetzung von TNF α durch Makrophagen, nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) mit MIF in Verbindung gebracht. So hat die Inhibition der Tautomeraseaktivität von MIF durch einen spezifischen niedermolekularen Inhibitor (ISO-1) Einfluss auf die Freisetzung von TNF α durch Makrophagen, die aus mit LPS behandelten Mäusen isoliert wurden. Diesen inhibitorischen Einfluss dagegen kann man in Makrophagen aus MIF defizienten Mäusen, die ebenfalls mit LPS behandelt worden sind, nicht feststellen (Bendrat 1997).

Einige Daten zeigen, dass die Neutralisation der pro-inflammatorischen Aktivität von MIF einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung einer Reihe von inflammatorischen Krankheiten darstellt (Calandra 2003). Dies zeigt auch der therapeutische Erfolg von MIF spezifischen neutralisierenden Antikörpern in verschiedenen inflammatorischen und autoimmunen Krankheits- und Tiermodellen, wie zum Beispiel systemischer Inflammation, Arthritis und Diabetes (Bernhagen 1993; Bozza 1999; Calandra 2000; Lan 2000; Murakami 2002).

In einer weiteren Studie in der Makrophagen mit endotoxinfreiem MIF behandelt wurden kam es zu keiner Produktion und Freisetzung von Zytokinen, wie zum Beispiel TNF α . Außerdem wurden in dieser Studie Makrophagen mit LPS und MIF zusammen behandelt, wobei es zu einem synergistischen Effekt und somit zu einer erhöhten Induktion der TNF α Produktion und Sekretion kam (Kudrin 2006). Dieser synergistische Effekt konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 6 Kapitel 4.1). Ganz im Gegenteil zeigte sich nach gleichzeitiger Behandlung von Makrophagen mit MIF und LPS eine leicht verminderte Sekretion von TNF α , im Vergleich zur alleinigen Behandlung der Zellen mit LPS ohne Zugabe von MIF.

5.2 RP S19 inhibiert nicht signifikant die MIF abhängige Migration von Monozyten/Makrophagen

MIF wurde zunächst als ein von aktivierten T-Lymphozyten produzierter Faktor beschrieben der die zufällige Migration von Makrophagen aus einem Kapillarröhrchen heraus inhibieren kann (Bloom BR 1966; David 1966). Damals war jedoch nicht bekannt, ob MIF die Migration von Makrophagen direkt inhibiert oder aber eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen ausübt und so deren ungerichtete Migration aus einer Kapillare verhindert (Bloom BR 1966; David 1966; Weiser 1989).

Später wurde bekannt, dass MIF im Zusammenhang mit verschiedenen Immunzellaktivitäten steht (Metz 1997; Swope 1999) und die Migration und Proliferation verschiedener Zelltypen insbesondere von Monozyten und Makrophagen beeinflussen kann (Lacey 2003). Außerdem wirkt MIF chemotaktisch auf vaskuläre glatte Muskelzellen (Schrans-Stassen 2005) und Keratinozyten aus Ratten (Abe 2000). Die durch MIF vermittelte Rekrutierung von mononukleären Zellen wurde auch mit der Progression von Glomerulonephritis und Arthritis in Verbindung gebracht (Lan 1997; Gregory 2004).

Das ribosomale Protein S19 kann durch die Plasma Transglutaminase (Faktor XIIIa) zu einem kovalenten Homodimer verknüpft werden (Nishiura 1996). Dieses Homodimer wirkt *in vitro* chemotaktisch auf Monozyten und rekrutiert zirkulierende Monozyten hin zu apoptotischen Läsionen, indem es während einer rheumatoiden Arthritis von apoptotischen Zellen in die extrazelluläre Flüssigkeit frei gegeben wird und dann an den C5a Rezeptor auf Monozyten bindet. Das RP S19 Monomer weist jedoch keine solche Wirkung auf (Nishiura 2005). Übereinstimmend mit diesen Befunden zeigte eine monomere RP S19 Präparation in dieser Arbeit keine chemotaktische Wirkung auf Monozyten.

5.3 Das ribosomale Protein S19 wird nicht neddyliert

Ein weiterer bekannter Interaktionspartner von MIF ist Jab1/CSN5. MIF bindet intrazellulär an die Jab1/CSN5 Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN) (Kleemann 2000), einem hoch konservierten Proteinkomplex, der in die Ubiquitin vermittelte Proteindegradation involviert ist (Cope 2002; Wolf 2003; Wei 2008). Jab1/CSN5 besitzt innerhalb des CSN

Diskussion

Holokomplexes eine spezifische Metalloprotease Aktivität, die für die DeNEDDylierung von Cullin 1, einer Komponente des SCF Ubiquitin E3 Ligasekomplexes, verantwortlich ist. (Cope 2002). Die NEDDylierung von Cullin 1 moduliert die Ubiquitin Ligase Aktivität des SCF-Komplexes, was zu einer erhöhten Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von Substraten führt (Pan 2004). Davon ausgehend, dass die Konjugation von NEDD8 an Cullin 1 die Ubiquitin Ligase Aktivität des SCF-Komplexes *in vivo* fördert, wird Jab1/CSN5 ein Einfluss bei einer Anzahl von Entwicklungsprozessen und zellulären Prozessen über die Kontrolle der Ubiquitin und Proteasom abhängigen Proteolyse zugeschrieben (Cope 2002; Wolf 2003). MIF seinerseits nimmt durch seine Bindung an JAB1/CSN5 Einfluß auf die optimale Zusammensetzung und Funktion von Cull1-enthaltenden SCF-Komplexen (Nemajerova 2007) und kann somit indirekt Einfluss auf den Ubiquitylierungsstatus von abzubauenen Proteinen nehmen.

Neben schon bekannten Substraten für die NEDDylierung, wie den Proteinen der Cullin Familie, sowie dem Transkriptionsfaktor p53, konnte gezeigt werden, dass auch ribosomale Proteine mit NEDD8 konjugiert werden (Xirodimas 2008).

Durch die Kombination von Proteomics und *in vivo* NEDDylierungstests wurde die Konjugation von NEDD8 an verschiedene ribosomale Proteine, jedoch nicht RP S19 nachgewiesen. In weiterführenden Experimenten konnte eine NEDDylierung jedoch nicht für alle Kandidatenproteine bestätigt werden (Xirodimas 2008). Da es falsch positive Kandidaten gab, konnte folglich auch nicht ausgeschlossen werden, dass falsch negative Kandidatenproteine wie RP S19 übersehen wurden. Intrazelluläres MIF bindet über ein nur 16 Aminosäure langes Peptid (MIF 50-65) an einen Kernbereich der sogenannten Kerndomäne von JAB1/CSN5, die nicht mit der Metalloprotease-Domäne überlappt, die für die DeNEDDylierung der Culline in SCF E3 Ligasen verantwortlich ist (Burger-Kentischer 2005). Der Verlust von MIF verstärkt in p53^{-/-} Mäusen deren Phänotyp, d.h. MIF^{-/-} 53^{-/-} Doppelknockout Mäuse sind noch anfälliger gegenüber der Entwicklung von Tumoren als p53^{-/-} Mäuse und zeigen zudem ein noch breiteres Tumorspektrum (Nemajerova 2007). Dieser Phänotyp konnte auf den fehlerhaften SCF-abhängigen Abbau von Schlüsselfaktoren des Zellzyklus wie Cdc25A, E2F1 und DP1 zurückgeführt werden, der zu genetischer Instabilität führt. Diese Wirkung von MIF ist von der Assoziation mit JAB1/CSN5 abhängig. So konnten in Zellen der Doppelknockout Tiere weder NEDD8 konjugiertes Cullin 1 noch Cullin1/Skp1-Komplexe nachgewiesen werden. MIF scheint also über die Bindung an JAB1/CSN5 und die Regulierung der Cullin1 NEDDylierung für eine optimale Zusammensetzung und Aktivität von SCF E3 Ligasen zu sorgen. Da die Möglichkeit bestand,

dass mit RP S19 ein weiterer Faktor existiert, der durch Modulation seiner NEDDylierung reguliert werden könnte, sollte hier gezielt überprüft werden, ob RP S19 *in vivo* nicht doch ein NEDDylierungssubstrat darstellt. Wogegen für das ribosomale Protein L11, welches als Positivkontrolle fungierte, der Nachweis einer Konjugation mit NEDD8 mittels *Western Blot* nach Kotransfektion von Zellen mit L11 und NEDD8 gelang, war im Falle von RP S19 jedoch keine mit NEDD8 konjugierte Form nachweisbar.

In allen Transfektionsexperimenten wurde beobachtet, dass RP L11 stärker exprimiert wird als RP S19. Dies könnte mit dem unterschiedlichen NEDDylierungsstatus beider ribosomaler Proteine zusammenhängen, denn Xirodimas et al. konnten zeigen, dass neddylierte ribosomale Proteine stabiler sind als nicht neddylierte (Xirodimas 2008).

5.4 Einfluss von RP S19 Punktmutationen auf die Bindung von MIF

Bei der Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) handelt es sich um eine seltene kongenitale Krankheit, die im Zusammenhang mit Mutationen in verschiedenen ribosomalen Proteinen steht (Gustavsson 1998; Draptchinskaia 1999). Dabei weisen 25% der Patienten mit DBA eine heterozygote Mutation im Gen des ribosomalen Proteins S19 auf (Draptchinskaia 1999; Willig 1999). Die Ausschaltung oder Punktmutation eines *rp s19* Allels blockiert in humanen und Hefezellen die Maturation der ribosomalen 40S Untereinheit im Nukleus, da die Prozessierung der präribosomalen 18S RNA gestört ist. Ähnliche Effekte wurden in humanen Zellen beobachtet, in denen mit Hilfe von siRNA das RP S19 Gen ausgeschaltet worden ist (Leger-Silvestre 2005; Choessel 2007; Flygare 2007; Idol 2007). Bei DBA Patienten ist die Expression von RP S19 mRNA und Protein während der terminalen Erythrozytendifferenzierung erniedrigt. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass der Reifungsarrest von erythroiden Vorläuferzellen bei Patienten mit DBA während des frühen Stadiums der Erythrozyt Differenzierung stattfindet (Da Costa 2003). Somit ist anzunehmen, dass Mutationen in einem RP S19 Allel, die zu einer Erniedrigung der Proteinexpressionsrate führen, ursächlich mit der Induzierung von Defekten in der ribosomalen Biogenese zusammenhängen.

Die auch in dieser Studie eingesetzten drei Missensmutanten (W52R, R62W, R101H) zeigten in vorhergegangenen Studien (Angelini 2007) nach transienter Transfektion in HEK 293T Zellen eine dem Wildtyp vergleichbare Proteinexpressionsrate. Nach einer stabilen Transfektion dieser Punktmutanten in HEK 293T Zellen zeigten jedoch die zwei Mutanten R62W und R101H eine im Vergleich zum Wildtyp RP S19 stark erhöhte Degradationsrate und somit eine stark verkürzte biologische Halbwertszeit des Proteins. Jedoch assoziiert

Diskussion

keines der mutierten RP S19 Proteine mit dem Ribosom oder der 40S Untereinheit. In weiteren Studien zeigten alle drei Mutanten inklusive des Wildtyps eine klare nukleoläre Lokalisation (Da Costa 2003) oder das Expressionsniveau von allen drei Punktmutanten in humanen K562 Erythroleukämie Zellen und in hämatopoetischen Progenitorzellen war im Vergleich zum Wildtyp massiv erniedrigt (Kuramitsu 2007). Die Konzentration der Mutante R62W wurde durch die Inhibition der proteasomalen Degradation durch MG132 etwas erhöht, während es dadurch bei der Expression von W52R und R101H RP S19 zu keiner Veränderung kam.

Da durch die Herunterregulierung von RP S19 durch siRNA ein Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase induziert wird, hat eine verminderte Expression an RP S19 Protein aufgrund einer schnelleren Degradation bei Mutationen einen ähnlichen Effekt. Tatsächlich wird ein Arrest in der G0/G1 Phase in humanen hämatopoetischen Progenitorzellen durch Mutationen im RP S19 Gen induziert, was zu einer gestörten Entwicklung in einigen Erythroidzelllinien führt. Dabei stellt die unzureichende Regulierung des Zellzyklus in hämatopoetischen Zellen wahrscheinlich einen kritischen Wendepunkt in der Ausbildung einer ernsten Anämie dar (Kuramitsu 2007).

Der Einfluss von Mutationen, die bei DBA Patienten im RP S19 Gen vorkommen, auf die Bindung von RP S19 an PIM-1, wurde bereits erwähnt (Chiocchetti 2005). Die Kinase PIM-1 interagiert mit RP S19, was zur Phosphorylierung von RP S19 *in vitro* führt. Natürliche, bei DBA Patienten vorkommende Mutationen verändern die Bindung von RP S19 an PIM-1. Die Punktmutante RP S19-R62W führt zu einer stärkeren Bindung von RP S19 an PIM-1, was dazu führen könnte, dass beide Proteine für ihre anderen Funktionen nicht mehr im gleichen Maße zur Verfügung stehen (Chiocchetti 2005).

Einen ähnlich wichtigen Einfluss könnte eine Mutation im RP S19 Protein auf die Bindung an den proinflammatorischen Modulator MIF haben. Die Affinität der RP S19 Mutanten im Vergleich zum RP S19 Wildtyp an MIF wurde mit Hilfe der Ko-Immunopräzipitation mit anschließender Detektion im Western Blot untersucht. Angenommen wurde dabei, dass eine reduzierte Affinität auch zu einer erniedrigten Kopräzipitation von MIF bzw. RP S19 führt. Tatsächlich führte der Austausch von zwei Aminosäuren im RP S19 Protein (W52R und R62W) zu einer deutlich geringeren Bindung von RP S19 an MIF wogegen die Mutante R101H ein unklares Bild zeigte, da die Kopräzipitation mal ähnlich stark wie beim Wildtyp war, ein anderes Mal jedoch deutlich geringer ausfiel. Die Mutanten W52R und R62W liegen im so genannten Mutations *Hotspot*, einer Genregion zwischen den für die Aminosäuren 52 bis 62 kodierenden Nukleotiden im RP S19 Gen. Viele Punktmutationen, die bei DBA

gefunden wurden liegen in dieser Genregion. Offensichtlich ist dieser Bereich des Proteins ebenfalls für die Bindung von RP S19 an MIF wichtig.

Die verminderte Bindung der zwei Punktmutanten von RP S19 an MIF könnte einen Einfluss auf verschiedene Funktionen von MIF bei Patienten mit DBA haben. Oder anders formuliert: MIF könnte eine Rolle in der Pathophysiologie der DBA spielen. So wird MIF neben seinen pro-inflammatorischen Funktionen ebenso eine Rolle im Zellzyklus verschiedener Zelltypen (Takahashi 1998; Morrison 2001), in der Karzinogenese (Fingerle-Rowson 2003), als auch in der Regulierung der SCF Ubiquitin Ligase Aktivität (Nemajerova 2007) zugeschrieben. Interessanterweise fungiert auch das ribosomale Protein L26 als Regulator des Zellzyklus und induziert einen Arrest in der G1 Phase bei *Drosophila* (Takagi 2005).

5.5 Identifikation der MIF Interaktionsdomäne im ribosomalen Protein S19

Zwar wurden in den vergangenen zehn Jahren eine Reihe von membranständigen und intrazellulären Interaktoren von MIF beschrieben (siehe Einleitung), aber mit nur einer Ausnahme (JAB1/CSN5,(Burger-Kentischer 2005)) wurden die interagierenden Domänen - weder auf Seiten des Interaktors noch auf Seiten von MIF - näher charakterisiert. Eine Batterie von amino- und carboxyterminalen Verkürzungsmutanten von RP S19, die bereits von Da Costa et.al. für die Suche nach potenziellen nukleären Lokalisationssequenzen eingesetzt wurden (Da Costa 2003), wurden daher erneut verwendet, um die Bereiche im RP S19 Protein zu identifizieren, die für die Interaktion mit MIF notwendig sind.

RP S19

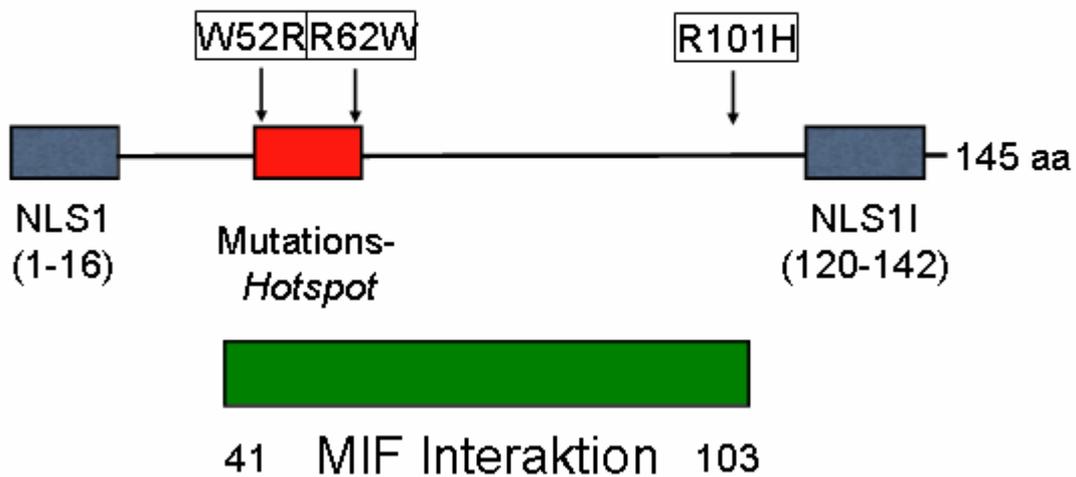


Abbildung 19: Schema RP S19 Protein

Schematische Darstellung des RP S19 Proteins mit den beiden *nuclear localisation sequences* I und II (NLS, blau), dem beschriebenen Mutations-Hotspot (rot) und der MIF-Interaktionsdomäne (grün, siehe unten).

Nach der Proteinsynthese werden die ribosomalen Proteine in den Nukleus und dort in den Nukleolus importiert, wo sie zusammen mit rRNA Molekülen die kleine und die große ribosomale Untereinheit bilden. Diese werden dann in das Zytoplasma exportiert, wo sie an mRNAs binden und funktionelle Ribosomen ausbilden. Es wurden zwei nukleoläre Lokalisationssignale im RP S19 Protein identifiziert, eines im NH₂-terminalen und eins im COOH-terminalen Bereich (siehe Abb.19). Die Aminosäuren V15 und G127 spielen hierbei eine essentielle Rolle, da Proteine mit den Missens-Mutationen V15F und G127Q, die in Patienten mit DBA gefunden wurden, nicht mehr in den Nukleus transportiert werden. Außerdem sinkt das Expressionsniveau dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp spezifisch um mehr als 90% (Da Costa 2003).

Zur Bestimmung der MIF Bindedomäne im RP S19 Protein wurden mit Hilfe einer Ko-Immunopräzipitation Unterschiede in der Bindungsstärke der RP S19 Verkürzungsmutanten im Vergleich zum Wildtyp Protein untersucht. Eine Reihe von Verkürzungsmutanten wurden in COS7 Zellen im Vergleich zum Wildtyp nur sehr schwach exprimiert (15-145 und 1-61) oder waren nicht stabil (1-142). Ganz eindeutig war jedoch, daß die Verkürzungsmutanten 1-22 und 1-40 am aminoterminalen Ende sowie 104-145 am carboxyterminalen Ende nur noch eine geringe Bindung an MIF zeigten. Damit erscheinen die Aminosäuren 41-103 für die Interaktion mit MIF notwendig zu sein. Folglich zeigen auch die beiden Verkürzungsmutanten 43-145 und 14-145, die diesen Abschnitt des Proteins enthalten, eine

Diskussion

Affinität zu MIF, die dem Wildtyp vergleichbar (43-145) oder sogar höher ist (14-145). Die Verkürzungsmutante 14-145 zeigte mehrfach eine stärkere Ko-Präzipitation von MIF als der Wildtyp. Offenbar verhindert eine oder mehrere der ersten 13 Aminosäuren eine noch stärkere Interaktion mit MIF. Sehr aufschlußreich ist der Vergleich der beiden Verkürzungsmutanten 1-100 und 43-145. Wogegen die Mutante 1-100 nur eine moderate Bindung zeigt, bindet die Mutante 43-145 ähnlich stark wie der Wildtyp. Dies kann vermutlich nicht auf die Aminosäuren 104-145 zurückgeführt werden, da diese Verkürzungsmutante so gut wie keine Bindung mehr zeigt. Damit scheinen die Aminosäuren 101-103 eine besondere Rolle bei MIF-Bindung zu spielen.

In Abbildung 20 wurde versucht die Ergebnisse dieser Arbeit zu visualisieren. Da vom humanem RP S19 Protein keine hochauflösende Kristallstruktur vorliegt, haben Gregory et. al die Struktur von RP S19 aus dem Archaeon *Pyrococcus abyssi* (Pa RP S19) bestimmt (Gregory 2007). Das Vorkommen von RP S19 ist auf Archae und Eukaryonten beschränkt, wobei Pa RP S19 und humanes Protein 36% Identität und 57% Ähnlichkeit haben. Daher kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine eine sehr ähnliche Faltung aufweisen.

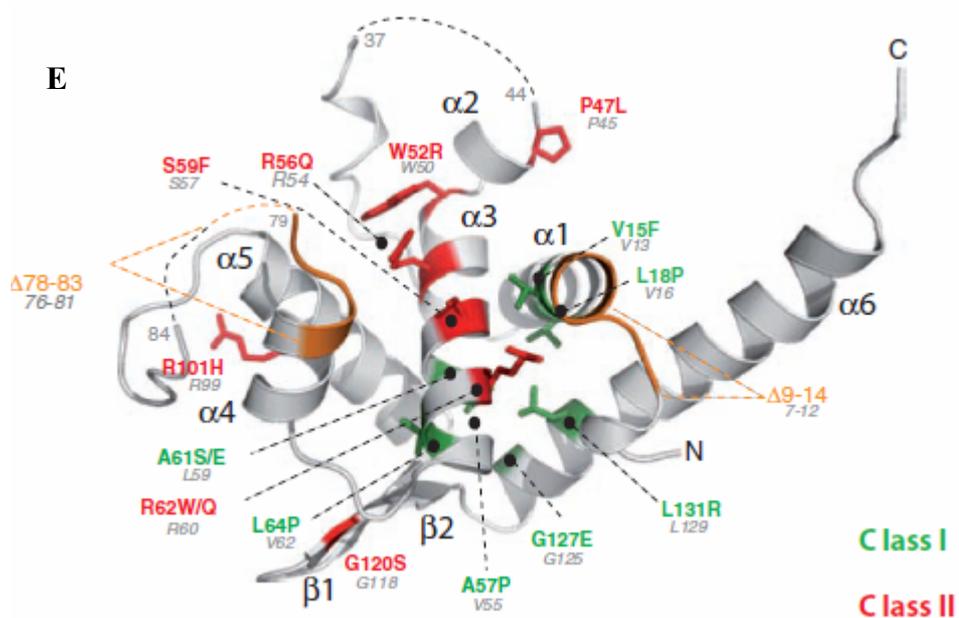
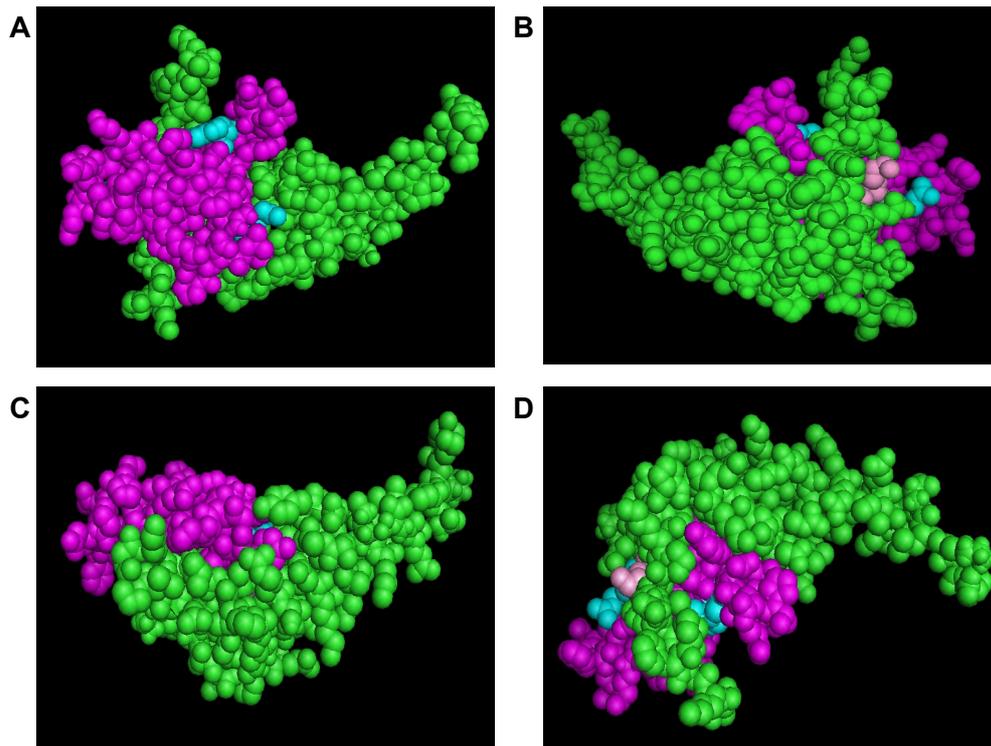


Abbildung 20: Struktur des RP S19 Proteins

(A-D) Kalottendarstellung der Struktur des RP S19 Proteins aus *Pyrococcus abyssi* (mit PyMol erstellt). Die putative Bindedomäne für MIF (Reste 41-103) ist lila dargestellt. Türkis sind die Aminosäuren eingefärbt, die homolog zu den humanen Aminosäurepositionen W52, R62 und R101 sind: die Reste 102 und 103 sind rosa eingefärbt. (A) zeigt das Molekül der gleichen Perspektive wie (E). In (B) ist das Molekül um 180° um eine senkrechte Achse gedreht. (C) und (D) zeigen das Molekül um eine horizontale Achse um 90° nach oben (C) bzw. um 180° gedreht (D).

(E) Schematische Darstellung der Kristallstruktur des RP S19 Proteins aus *Pyrococcus abyssi* mit Klasse I Mutationen (grün) und Klasse II Mutationen (rot) (siehe Text) (Gregory 2007)

Analysen von RP S19 ergaben, dass der sogenannte *Hotspot*, in dem viele der Missense Mutanten, die bei Patienten mit DBA gefunden wurden liegen, eine wichtige Rolle bei einigen Funktionen des RP S19 Proteins einnimmt (Gregory 2007). Auffällig ist dabei, dass es zwei verschiedene Klassen von Mutationen im RP S19 Protein gibt (siehe Abb.20E). Bei der ersten Klasse handelt es sich um Mutationen, die die Faltung von RP S19 beeinträchtigen. Die zweite Klasse von Mutationen, zu denen die verwendeten Punktmutanten W52R und R62W und R101H gehören, betrifft Reste, die auf der Oberfläche von RP S19 lokalisiert sind (rot markierte Mutationen in Abbildung 20E) und somit auch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinträchtigen können. Interessant dabei ist, dass die zweite Klasse von Mutationen stärker konserviert ist, als die Mutationen der ersten Klasse. Darüberhinaus sind Proteine mit Mutationen der zweiten Klasse stabiler (Gregory 2007).

Wie in Abbildung 20A-D dargestellt wurde, liegt die putative Interaktionsdomäne (lila gekennzeichnet) ebenso wie die drei in türkis eingefärbten Punktmutationen W52R, R62W und R101 freiliegend auf der Oberfläche der RP S19 Proteinstruktur. Dies unterstützt die erlangten Erkenntnisse über die essentielle Rolle dieser Region (Aminosäure 41-103) im RP S19 Protein bei der Interaktion mit dem pro-inflammatorischen Zytokin MIF.

5.6 Nachweis von RP S19 in humanem Blutplasma

RP S19 ist nicht nur ein Bestandteil der 40S Untereinheit des Ribosoms und somit ein integraler Bestandteil der Translationsmaschinerie, sondern es kommt auch in freier Form im Zytosol vor (Soulet 2001). Es weist, wie andere ribosomale Proteine auch, extraribosomale Funktionen auf und interagiert mit anderen Proteinen. Das RP S19 Monomer wird von apoptotischen Zellen in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt (Nishimura 2001) und ist bei Arthritis in synovialen Läsionen nachweisbar (Nishiura 1996; Horino 1998). Das Vorkommen von freiem RP S19 im Zytosol oder in extrazellulären Flüssigkeiten, neben seiner Präsenz im Ribosom, sind starke Indizien für die These, dass RP S19 auch *in vivo* an MIF binden und seine biologischen Aktivitäten beeinflussen kann. Das ribosomale Proteine in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt werden können, zeigt auch das Beispiel des ribosomalen Proteins L4, welches bereits im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom nachgewiesen wurde (Chatterjee 2006). Eine erhöhte MIF-Konzentration im Blut wird dazu mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich unter anderem um Sepsis (Joshi 2000; Lehmann 2001), pulmonale Tuberkulose (Yamada 2002), rheumatoide Arthritis, Typ-2 Diabetes (Yabunaka 2000) und Arteriosklerose (Burger-Kentischer 2002). Der Nachweis von

Diskussion

RP S19 im Blut würde also die Hypothese stützen, dass es biologische Aktivitäten von MIF hemmen kann.

Vor 20 Jahren wurde zum ersten Mal von einem chemotaktischen Faktor im Blutplasma berichtet, der jedoch im Serum fehlt. Es stellte sich dann heraus, dass es sich um das Homodimer des ribosomalen Proteins S19 handelt, welches während der Koagulation von Blut aus einer durch die Transglutaminase-Reaktion des Koagulationsfaktors XIIIa katalysierten, intermolekularen Quervernetzung zwischen Gln137 und Lys122 entstehen soll (Nishiura 1999). Das RP S19 Homodimer wird in apoptotischen Zellen gebildet und dann extrazellulär freigesetzt (Horino 1998; Nishimura 2001). Es wurde bereits in synovialen Läsionen von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie in atherosklerotischen Läsionen der Aorta nachgewiesen (Nishiura 1996; Shi 2005). Nur das Homodimer, nicht jedoch das Monomer, wirkt dabei als Antagonist für den Rezeptor des Komplementfaktors C5a und inhibiert so die C5a induzierte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (Nishiura 1998; Shrestha 1999; Oda 2008). Semba et al. konnten auch vor kurzem RP S19 Monomer in humanem Blutplasma sowie in geringeren Mengen auch in humanem Serum nachweisen (Semba 2010). Anders als bei Semba et al. beschrieben, gelang der Nachweis von RP S19 Monomer im Blutplasma in dieser Arbeit nicht. Bei einer Nachweisgrenze von etwa 5ng rekombinanten RP S19 war es zum einen nicht möglich monomeres RP S19 im Blutplasma zu detektieren und zum anderen zeigte sich beim Zusatz von rekombinantem RP S19 ein eklatanter Verlust des Proteins im Laufe der von Semba et al. beschriebenen Prozessierungsschritte (siehe 4.6 Ergebnisse). Der Grund für die fehlende Reproduzierbarkeit des Nachweises von monomeren RP S19 kann in der Sensitivität der Nachweismethode begründet sein. Im Gegensatz zu Semba et al. (Semba 2010), die die Bindung eines mit Biotin gekoppelten anti RP S19 Antikörpers an das RP S19 Monomer mit Hilfe eines Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplexes visualisiert hatten, wurde in dieser Studie ein weniger sensitiver anti RP S19 Antikörper (siehe 3.1.9.1.) verwendet. Die Konzentration von monomeren RP S19 im Blutplasma wird auf ungefähr 200ng/ml eingeschätzt (persönliche Mitteilung Tetsuro Yamamoto, Kumamoto University, Japan). Für MIF wurden Konzentrationen von 0,5-1ng/ml im Blut, sowohl im Plasma als auch im Serum von gesunden Probanden nachgewiesen. Bei vielen verschiedenen Krankheiten wie auch bei Übergewicht zeigt sich eine erhöhte Konzentration von MIF, die auf 2ng/ml und bis zu 20ng/ml im Blut steigen kann (Shimizu 1999; Joshi 2000; Mizue 2000; Lehmann 2001; Bozza 2004; Dandona 2004; Muramaki 2006; Xia 2009). Hier wurde gezeigt, dass ein fünffacher Überschuss an RP S19 ausreicht, um den Glucocorticoid-*overriding* Effekt von MIF signifikant zu

Diskussion

inhibieren. Dies bedeutet, dass eine Menge von 2,5-5 ng/ml RP S19 bei gesunden Probanden oder 37,5 ng/ml RP S19 bei erhöhten Plasmaspiegeln von MIF, wie zum Beispiel bei Sepsispatienten, ausreichen könnte, um die proinflammatorischen Wirkungen von MIF zu hemmen. Und tatsächlich scheint der RP S19 Spiegel in der Zirkulation hierfür auszureichen.

6 Zusammenfassung

Der Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor (MIF) ist ein pleiotroper Immunmodulator, der unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen, wie Infektionen, Sepsis und Autoimmunerkrankungen eine kritische Rolle übernimmt. MIF bindet an eine Reihe von Molekülen wobei sich die Funktionen von MIF und Interaktor gegenseitig beeinflussen können. Die genauen molekularen Mechanismen blieben dabei bis heute oftmals ungeklärt. Zum besseren Verständnis der biologischen Rolle von MIF wurde nach weiteren intrazellulären Interaktionspartnern von MIF gesucht und so die Bindung von MIF an das ribosomale Protein RP S19 gefunden (Filip 2009). Für viele ribosomale Proteine, wie auch Translations- und Elongationsfaktoren, wurden extraribosomale Funktionen also Funktionen außerhalb der Proteinbiosynthese nachgewiesen. Deshalb sollte untersucht werden in welchem Maße die Bindung von RP S19 an MIF dessen biologische Funktionen, wie die Aufhebung der antiinflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden - *glucocorticoid overriding* Effekt genannt - oder die chemotaktische Wirkung auf Makrophagen und Monozyten beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass der *glucocorticoid overriding* Effekt von MIF, auf mit LPS stimulierten Monozyten, durch Zugabe von RP S19 teilweise wieder aufgehoben werden kann. Damit fungiert RP S19 extraribosomal als ein endogener Inhibitor der proinflammatorischen Aktivität von MIF. Da die chemotaktische Wirkung von MIF auf aus humanem Blut isolierten Monozyten nur schwach und nicht signifikant erhöht zur Negativkontrolle ausfiel, ließ sich hier keine Aussage über den Einfluß von RP S19 treffen.

Einige ribosomale Proteine werden mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein NEDD8 konjugiert, was zu einer erhöhten Stabilität dieser Proteine führt. Deshalb sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob RP S19 ebenfalls mit NEDD8 konjugiert vorliegt. Nachfolgend sollte ggf. überprüft werden, ob die Konjugation Einfluss auf die Stabilität von RP S19 und damit auch auf die Wirkung von RP S19 auf MIF hat. Im Gegensatz zu RP L11 als positiver Kontrolle konnte jedoch keine Konjugation von NEDD8 an RP S19 in kultivierten Zellen nachgewiesen werden NEDD8 scheint somit keinen Einfluss auf die ribosomalen oder extraribosomalen Funktionen von RP S19 zu haben.

Durch den Einsatz von RP S19 Punkt- und Verkürzungsmutanten sollte der für die Bindung an MIF essentielle Bereich im RP S19 Molekül charakterisiert werden, um ein besseres Verständnis des molekularen Zusammenspiels beider Moleküle zu erhalten. Zwei *missense* Mutanten (RP S19-W52R und R62W) wurden im Vergleich zum Wildtyp in der

Zusammenfassung

Koimmunopräzipitation mit Anti MIF Antikörpern signifikant weniger mitgefällt, wogegen die Ergebnisse für die Mutante R101H stark variierten. Die beiden für die missense Mutationen verantwortlichen Punktmutationen liegen im so genannten *Hotspot*, einer Genregion zwischen den für die Aminosäuren 52 bis 62 kodierenden Nukleotiden im RP S19 Gen. In dieser Region liegen viele Mutationen, die bei Patienten mit Diamond-Blackfan-Anämie gefunden wurden. Offensichtlich ist diese Region auch für die Bindung von RP S19 an MIF wichtig. Weitere Koimmunopräzipitationsexperimente mit N- und C-terminalen Verkürzungsmutanten lassen den Schluss zu, dass die Region zwischen den Aminosäuren K41 und V103 für die Interaktion mit MIF notwendig ist. Diese schließt auch den *Hotspot* mit ein.

MIF ist in geringen Mengen in der Zirkulation nachweisbar. Auch für RP S19 wurde dies kürzlich im Western Blot gezeigt, sodass eine biologisch relevante Interaktion im Blut oder auch anderen Körperflüssigkeiten realistisch erscheint. In dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, den publizierten RP S19 Nachweis zu wiederholen. Zwar verbesserte die Entfernung der Immunglobuline aus humanem Serum den Hintergrund, auf der anderen Seite wurde durch Zusatz von rekombinantem Protein deutlich, dass die beschriebenen Aufreinigungsschritte zu einem massiven Verlust von RP S19 führten und damit den Nachweis erschwerten statt ihn zu ermöglichen.

In Zukunft erscheint die Untersuchung der inhibierenden Wirkung von RP S19 auf MIF Funktionen im Tiermodell interessant. Angesichts der Vielzahl an Autoimmunerkrankungen für die MIF mitverantwortlich scheint, könnte RP S19 einen therapeutisch interessanten endogenen Modulator des proinflammatorischen Zytokins MIF darstellen.

7 Literatur

- Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R., Metz, C.N. (2001). "Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor." J Immunol **166**(2): 747-753.
- Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. (2000). "Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultures fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1500**(1): 1-9.
- Angelini, M., Cannata, S., Mercado, V., Gibello, L., Santoro, C. Dianzani, I., Loreni, F. (2007). "Missense mutations associated with Diamond-Blackfan anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome." Human Molecular Genetics **16**(14): 1720-1727.
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R., (1996). "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation." Proc Natl Acad Sci USA **93**(15): 7849-7854.
- Ball, S. (2011). "Diamond Blackfan anemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 487-491.
- Baugh, J. A., Bucala, R. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor." Crit Care Med **30**(1): 27-35.
- Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C., Dubiel, W. (2001). "COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system." EMBO J **20**(7): 1630-1639.
- Beishuizen, A., Thijs, L.G., Haanen, C., Vermes, I. (2001). "Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2811-2816.
- Bendrat, K., Al-Abed, Y., Callaway, D.J., Peng, T., Calandra, T., Metz, C.N., Bucala, R. (1997). "Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor." Biochemistry **36**(49): 15356-16362.
- Benigni, F., Atsumi, T.G., Calandra, T., Metz, C., Echterbacher, B., Peng, T., Bucala, R. (2000). "The inflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle." J Clin Invest **106**(10): 1291-1300.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manoque, K.R., Cerami, A., Bucala, R. (1993). "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia." Nature **365**(6448): 756-759.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., Weber, C. (2007). "MIF is a noncognate ligand of chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." Nature Medicine **13**(5): 587-596.
- Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A., Bucala, R. (1994). "Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Biochemistry **33**(47): 14144-14155.
- Beutler, B., Rietschel, E.T. (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nature Rev Immunol **3**(2): 169-176.
- Bloom BR, B. B. (1966). "Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity." Science **153**(3731): 80-82.
- Bozza, F. A., Gomes, R.N., Japiassú, A.M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Bozza, M.T. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor correlate with fatal outcome in sepsis." Shock **22**(4): 309-313.

- Bozza, M., Kolakowski, L.F. Jr., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., David, J.R., Gerard, C. (1996). "Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes." Genomics **27**(3): 412-419.
- Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., David, J.R. (1999). "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis." J Exp Med **189**(2): 341-346.
- Bucala, R. (1996). "MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response." FASEB J **10**(14): 1607-1613.
- Burger-Kentischer, A., Finkelmeier, D., Thiele, M., Schnucker, J., Gieger, G., Tovar, G.E., Bernhagen, J. (2005). "Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is dependent of the JAMM motif." FEBS Lett **579**(7): 1693-1701.
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H.E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J., Ihling, C. (2002). "Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis." Circulation **105**(13): 1561-1566.
- Calandra, T. (1994). "Macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor." J Exp Med **179**: 1895-1902.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R. (1995). "MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production." Nature **377**(6544): 68-71.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R. (1994). "The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor." J Exp Med **179**(6): 1895-1902.
- Calandra, T., Bucala, R. (1995). "Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock." J Inflamm **47**(1-2): 39-51.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D.L., Pugin, J., Metz, C.N., Hültner, L., Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., Glauser, M.P. (2000). "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor." Nature Medicine **6**(2): 164-170.
- Calandra, T., Roger, T. (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity." Nature Rev Immunol **3**(10): 791-800.
- Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N., Bucala, R. (1998). "Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by endotoxins of Gram-positive bacteria." Proc Natl Acad Sci USA **95**(19): 11383-11388.
- Campagnoli, M. F., Ramenghi, U., Armiraglio, M., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Avondo, F., Pavesi, E., Fribourg, S., Gleizes, P.E., Loreni, F., Dianzani, I. (2008). "RPS19 Mutations in Patients With Diamond-Blackfan Anemia." Human Mutation **29**(7): 911-920.
- Cayli, S., Kluug, J., Chapiro, J., Fröhlich, S., Krasteva, G., Orel, L., Meinhardt, A. (2009). "COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/valosin-containing protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP." J Biochem **284**(50): 34944-34953.
- Chatterjee, M., Mohapatra, S., Ionan, A., Bawa, G., Ali-Fehmi, R., Wang, X., Nowak, J., Ye, B., Nahhas, F.A., Lu, K., Witkin, S.S., Fishman, D., Munkarah, A., Morris, R., Levin, N.K., Shirley, N.N., Tromp, G., Abrams, J., Draghici, S., Tainsky, M.A. (2006). "Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays." Cancer Res **66**(2): 1181-1190.

Literatur

- Chauchereau, A., Georgiakaki, M., Perrin-Wolff, M., Milgrom, E., Loosfelt, H. (2000). "JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1." J Biol Chem **275**(12): 8540-8548.
- Chiocchetti, A., Gibello, L., Carando, A., Aspesi, A., Secco, P., Garelli, E., Loreni, F., Angelini, M., Biava, A., Dahl, N., Dianzani, U., Ramenghi, U., Santoro, C., Dianzani, I. (2005). "Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein." Haematologica **90**(11): 1453-1462.
- Choesmel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Crétien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L., Gleizes, P.E. (2007). "Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia." Blood **109**(3): 1275-1283.
- Churchill, W. H. J., Piessens W.F., Sulis, C.A., David, J.R. (1975). "Macrophages activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells." J Immunol **115**(3): 781-786.
- Cope, G. A., Deshaies, R.J. (2002). "COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases." Cell **114**(6): 663-671.
- Cornwall, D. G., Kruger, F.A. (1961). "Molecular complexes in the isolation and characterization of plasma lipoproteins." J Lipid Res **2**: 110-134.
- Da Costa, L., Narla, G., Willig, T.N., Peters, L.L., Parra, M., Fixler, J., Tchernia, G., Mohandas, N. (2003). "Ribosomal protein S19 (RPS19) expression during erythroid differentiation." Blood **101**(1): 318-324.
- Da Costa, L., Tchernia, G., Gascard, P., Lo, A., Meerpohl, J., Niemeyer, C., Chasis, J.A., Fixler, J., Mohandas, N. (2003). "Nucleolar localisation of RPS19 protein in normal cells and mislocalisation due to mutations in the nucleolar location signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology." Blood **101**(12): 5039-5045.
- Dandona, P., Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Tripathy C., Hofmeyer, D., Chaudhuri, A. (2004). "Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5043-5047.
- Daun, J. M., Cannon, J.G. (2000). "Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α ." Am J Pathol **279**(3): 1043-1049.
- David, J. R. (1966). "Delayed-hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell free-substances formed by lymphoid cell-antigen interaction" Proc Natl Acad Sci USA **56**(1): 72-77.
- De Jong, Y. P., Abadia-Molina, A.C., Satoskar, A.R., Clarke, K., Rietdijk, S.T, Faubion, W.A., Mizoguchi, E., Metz, C.N., Alsahli, M., tenHove, T., Lubetsky, J.B., Farrell, R.J., Michetti, P., van Deventer, S.J., Lolis, E., David, J.R., Bhan, A.K., Terhorst, C. (2001). "Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF." Nature immunol **2**(11): 1061-1066.
- Deutsch, J. C. (1997). "Determination of p-hydroxyphenylpyruvate, p-hydroxyphenyllactate and tyrosine in normal human plasma by gas chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **690**(1-2): 1-6.
- Donnelly, S. C., Haslett, C., Reid, P.T., Grant, I.S., Wallace, W.A., Metz, C.N., Bruce, L.J., Bucala, R. (1997). "Regulatory role of macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome." Nature Medicine **3**(3): 320-323.
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., Dahl, N. (1999). "The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anemia." Nat Genet **21**(2): 169-175.
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., Kutok, J.L., Ebert, B.L. (2011).

Literatur

- "Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells." Blood **117**(9): 2567-2576.
- Eickhoff, R., Wilhelm, B., Renneberg, H., Wennemuth, G., Bacher, M., Linder, D., Bucala, R., Seitz, J., Meinhardt, A. (2001). "Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa." Mol Med **7**(1): 27-35.
- Embade, N., Fernandez-Ramos, D., Varela-Rey, M., Beraza, N., Sini, M., Gultierrez de Juan, V., Woodhoo, A., Martinez-Lopez, N., Rodriguez-Iruretagoyena, B., Bustamante, F.J., de la Hoz, A.B., Carracedo, A., Xirodimas, D.P., Rodriguez, M.S., Lu, S.C., Mato, J.M., Martinez-Chantart, M.L. (2012). "Murine double minute 2 regulates Hu Antigen R stability in human liver and colon cancer through NEDDylation." Hepatology **55**(4): 1237-1248.
- Ferro, A., Carvalho, A.L., Teixeira-Castro, A., Almeida, C., Tome, R.J., Cortes, L., Rodrigues, A.J., Logarinho, E., Sequeiros, J., Macedo-Ribeiro, S., Maciel, P. (2007). "NEDD8:a new ataxin-3 interactor." Biochim Biophys Acta **1773**(11): 1619-1627.
- Filip, A. M., Klug, J., Cayli, S., Fröhlich, S., Henke, T., Lacher, P., Eickhoff, R., Bulau, P., Linder, M., Carlsson-Skwirut, C., Leng, L., Bucala, R., Kraemer, S., Bernhagen, J., Meinhardt, A. (2009). "Ribosomal protein S19 interacts with macrophage migration inhibitory factor and attenuates its pro-inflammatory function." J Biochem **284**(12): 7977-7985.
- Fingerle-Rowson, G., Kaleswarapu, D.R., Schlander, C., Kabgani, N., Brocks, T., Reinart, N., Busch, R., Schütz, A., Lue, H., Du, X., Liu, A., Xiong, H., Chen, Y., Nemajerova, A., Halleck, M., Bernhagen, J., Leng, L., Bucala, R. (2009). "A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation." Mol Cell Biol **29**(7): 1922-1932.
- Fingerle-Rowson, G., Koch, P., Bikoff, R., Lin, X., Metz, C.N., Dhabhar, F.S., Meinhardt, A., Bucala, R. (2003). "Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids *in vivo*." Am J Pathol **162**(1): 47-56.
- Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C.N., Forsthuber, T.G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Müller, W., Bucala, R. (2003). "The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting." Proc Nati Acad Sci USA **100**(16): 9354-9359.
- Flygare, J., Karlsson, S. (2007). "Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits." Blood **109**(3): 980-986.
- Flygare, J., Kiefer, T., Miyake, K., Utsugisawa, T., Hamaguchi, I., Da Costa, L., Richter, J., Davey, E.J., Matsson, H., Dahl, N., Wiznerowicz, M., Trono, D., Karlsson, S. (2005). "Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia." Blood **105**(12): 4627-4634.
- Gando, S., Nishihira, J., Kobayashi, S., Morimoto, Y., Nanzaki, S., Kemmotsu, O. (2001). "Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome." Intensive Care Med **27**(7): 1187-1193.
- Gao, F., Cheng, J., Shi, T., Yeh, E.T. (2006). "Neddylated of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFκB-dependent transcription." Nat Cell Biol **8**(10): 1171-1177.
- Gregory, J. L., Aquissa-Touré, A.H., Pinaud, N., Legrand, P., Gleizes, P.E., Fribourg, S. (2007). "Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: structure and function analysis of RP S19." Nucleic Acids Res **35**(17): 5913-5921.

Literatur

- Gregory, J. L., Laech, M.T., David, J.R., Yang, Y.H., Dacumos, A., Hickey, M.J. (2004). "Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice." *Arthritis Rheum* **50**(9): 3023-3034.
- Guillano, D. (2002). "Conservation of long-range synteny and microsynteny between the genomes of two distantly related nematodes." *Genome Biol.* **3**(10).
- Gustavsson, P., Garelli, E., Draptchinskaia, N., Ball, S., Willig, T.N., Tentler, D., Dianzani, I., Punnett, H.H., Shafer, F.E., Cario, H., Ramenghi, U., Glomstein, A., Pfeiffer, R.A., Goringe, A., Olivieri, N.F., Smibert, E., Tchernia, G., Elinder, G., Dahl, N. (1998). "Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity." *Am J Hum Genet* **63**(5): 1388-1395.
- Hermanowski-Vosatka, A., Mundt, S.S., Ayala, J.M., Goyal, S., Hanlon, W.A., Czerwinski, R.M., Wright, S.D., Whitman, C.P. (1999). "Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration." *Biochemistry* **38**(39): 12441-12449.
- Horino, K., Nishiura, H., Ohsako, T., Shibua, Y., Hiroaka, T., Kitamura, N., Yamamoto, T. (1998). "A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells." *Lab Invest* **78**(5): 603-617.
- Hudson, J. D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., Beach, D.H. (1999). "A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity." *J Exp Med* **190**(10): 1375-1382.
- Idol, R. A., Robledo, S., Du, H.Y., Crimmins, D.L., Wilson, D.B., Ladenson, J.H., Bessler, M., Mason, P.J. (2007). "Cells depleted for RPS19, a protein associated with Blackfan Diamond anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production." *Blood Cells Mol Dis* **39**(1): 35-43.
- Jaworsky, D. C., Jasinskas, A., Metz, C.N., Bucala, R., Barbour A.G. (2001). "Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*." *Amblyomma americanum Insect Mol Biol* **10**(4): 323-331.
- Jeffery, C. J. (2009). "Moonlighting proteins--an update." *Mol Biosyst* **5**(4): 345-350.
- Jing, L., Bu, M. (2011). "Role of macrophage migration inhibitory factor in glucocorticoid release and glucocorticoid receptor functions in rats." *Ann Clin Lab Sci* **41**(1): 14-19.
- Joshi, P. C., Poole, G.V., Sachdev, V., Zhou, X., Jones, Q. (2000). "Trauma patients with positive cultures have higher levels of circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF)." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **107**(1-2): 13-20.
- Jung, H., Kim, T., Chae, H.Z., Kim, K.T., Ha, H. (2001). "Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant Protein PAG by direct interaction." *J Biol Chem* **276**(18): 15504-15510.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Yeh, E.T. (1997). "Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein." *J Biol Chem* **272**(45): 28557-28562.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J. (2000). "Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1." *Nature* **408**(6809): 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R.W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Jüttner, S., Brunner, H., Bernhagen, J. (1998). "Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase." *J Mol Biol* **280**(1): 85-102.
- Kleemann, R., Rorsman, H., Rosengren, E., Mischke, R., Mai, N.T., Bernhagen, J. (2002). "Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration

- inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants." Eur J Biochem **267**(24): 7183-7193.
- Koebnick, H., Grode, L., David, J.R., Rohde, W., Rolph, M.S., Mittrücker, H.W., Kaufmann, S.H. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*." Proc Natl Acad Sci USA **99**(21): 13681-13686.
- Kozak, C. A., Adamson, M.C., Buckler, C.E., Segovia, L., Paralkar, V., Wistow, G. (1995). "Genomic cloning of mouse MIF and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes." Genomics **27**(3): 405-411.
- Kudrin, A., Scott, M., Martin, S., Chung, C.W., Donn, R., McMaster, A., Ellison, S., Ray, D., Binks, M. (2006). "Human macrophage migration inhibitory faktor: a proven immunomodulatory cytokine?" J Biol Chem **281**(14): 29641-29651.
- Kuramitsu, M., Hamaguchi, I., Takuo, M., Masumi, A., Momose, H., Takizawa, K., Mochizuki, M., Naito, S., Yamaguchi, K. (2007). "Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells." Br J Haematol **140**(3): 348-359.
- Lacey, D., Sampey, A., Mitchell, R., Bucala, R., Santos, L., Leech, M., Morand, E. (2003). "Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor." Arthritis Rheum **48**(1): 103-109.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lai, K. N., Leung, J.C., Metz, C.N., Lai, F.M., Bucala, R., Lan, H.Y. (2003). "Role of macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome." J Pathol **199**(4): 496-508.
- Lan, H. Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D.J., Metz, C.N., Meinhardt, A., Bucala, R., Atkins, R.C. (1997). "The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in rat." J Exp Med **185**(8): 1455-1465.
- Lan, H. Y., Mu, W., Yang, N., Meinhardt, A., Nikotic-Paterson, D.J., Nq, Y.Y., Bacher, M., Atkins, R.C., Bucala, R. (1996). "*De novo* renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis." Am J Pathol **149**(4): 1119-1127.
- Lan, H. Y., Yang, N., Brown, F.G., Isbel, N.M., Nikolic-Paterson, D.J., Mu, W., Metz, C.N., Bacher, M., Atkins, R.C., Bucala, R. (1998). "Expression of macrophage migration inhibitory factor in human renal allograft rejection." Transplantation **16**(11): 1465-1471.
- Lan, H. Y., Yang, N., Nikolic-Paterson, D.J., Yu, X.Q., Mu, W., Isbel, N.M., Metz, C.N., Bucala, R., Atkins, R.C. (2000). "Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis." Kidney Int **57**(2): 499-509.
- Leech, M., Metz, C.N., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S.R., Bucala, R., Morand, E.F. (1999). "Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of pro-inflammatory function and regulation by glucocorticoids." Arthritis Rheum **42**(8): 1601-1608.
- Leger-Silvestre, I., Caffrey, J.M., Dawaliby R., Alvarez-Arias, D.A., Gas, N., Bertolone, S.J., Gleizes, P.E., Ellis, S.R. (2005). "Specific role for yeast homologs of the Blackfan Diamond anemia-associated Rps19 protein in Ribosome Synthesis." J Biol Chem **280**(46): 38177-38185.
- Lehmann, L. E., Novender, U., Schroeder, S., Pietsch, T., von Spiegel, T., Putensen, C., Hoefft, A., Stüber, F. (2001). "Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis." Intensive Care Med **27**(8): 1412-1415.

- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., Bucala, R. (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." *J Exp Med* **197**(11): 1467-76.
- Li, T., Santock<yte, R., Shen, R.F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C., Chock, P.B. (2006). "A general approach for investigating enzymatic pathways and substrates for ubiquitin-like modifiers." *Arch Biochem Biophys* **453**(1): 70-74.
- Li, Y., Lu, C., Xing, G., Zhu, Y., He, F. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor directly interacts with hepatopoietin and regulates the proliferation of hepatoma cell" *Exp Cell Res* **300**(2): 379-387.
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., Xiong, Y. (2002). "NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120 (CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases." *Mol Cell* **10**(6): 1511-1518.
- Loftus, S. J., Liu, G., Carr, S.M., Munro, S., La Thangue, N.B. (2012). "NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription." *EMBO Rep* **13**(9): 811-818.
- Lohrum, M. A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., Vousden, K.H. (2003). "Regulation of MDM2 activity by the ribosomal Protein L11." *Cancer Cell* **3**(6): 577-587.
- Lubetsky, J. B., Swope, M., Dealwis, C., Blake, P., Lolis, E. (1999). "Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity." *Biochemistry* **38**(22): 7346-7354.
- Lue, H., Karpuniotu, A., Fingelre-Rowson, G., Roger, T., Leng L., Thiele, M., Calandra, T., Bucala, R., Bernhagen, J. (2006). "Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity." *Cell Signal* **18**(5): 688-703.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF); mechanisms of action and role in disease." *Microbes Infect* **4**(4): 449-460.
- Lutsch, G., Stahl, J., Kärigel, H.J., Noll, F., Bielka, H. (1990). "Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver." *Eur J Cell Biol* **51**(1): 140-150.
- Lv, J., Huang, X.R., Klug, J., Fröhlich, S., Lacher, P., Meinhardt, A., Lan, H.Y. (2013). "Ribosomal Protein S19 is a novel therapeutic agent in inflammatory kidney disease." *Clin Sci* **124**:627-637.
- Makita, H., Nishimura, M., Miyamoto, K., Nakano, T., Tanino, Y., Hirokawa, J., Nishihira, J., Kawakami, Y. (1998). "Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation." *Am J Respir Crit Care Med* **158**(2): 573-579.
- Marechal, V., Elenbaas, B., Taneyhill, L., Piette, J., Mechali, M., Nicolas, J.C., Levine, A.J., Moreau, J. (1997). "Conservation of structural domains and biochemical activities of the MDM2 protein from *Xenopus laevis*." *Oncogene* **14**(12): 1427-1433.
- Matsson, H., Davey, E.J., Draptchinskaia, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Levéen, P., Forsberg, E., Kartsson, S., Dahl, N. (2004). "Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation." *Moll Cell Biol* **24**(9): 4032-4037.
- Matsumoto, K., Kanmatsuse, K. (2001). "Increased production of macrophage migration inhibitory factor by T cells in patients with IgA nephropathy." *Am J Nephrol* **21**(6): 455-464.
- Merk, M., Baugh, J., Zierow, S., Leng, L., Pal, U., Lee, S.J., Ebert, A.D., Mizue, Y., Trent, J.O., Mitchell, R., Nickel, W., Kavathas, P.B., Bernhagen, J., Bucala, R. (2009). "The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor." *J Immunol* **182**(11): 6896-6906.

Literatur

- Merk, M., Zierow, S., Leng, L., Das, R., Du, X., Schulte, W., Fan, J., Lue, H., Chen, Y., Xiong, H., Chagnon, F., Bernhagen, J., Lolis, E., Mor, G., Lesur, O., Bucala, R. (2011). "The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Proc Natl Acad Sci USA **108**(34): E577-E585.
- Metz, C. N., Bucala, R. (1997). "Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response." Adv Immunol **66**: 197-223.
- Mikulowska, A., Metz, C.N., Bucala, R., Holmdahl, R. (1997). "Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type-II-induced arthritis in mice." J Immunol **158**(11): 5514-5517.
- Miller, E. J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R., Young, L.H. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart." Nature **451**(7178): 578-582.
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Finherle-Rowson, G., Baugh, J., David, J, Bucala, R. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response." Proc Natl Acad Sci USA **99**(1): 345-350.
- Mitchell, R. A., Metz, C.N., Peng, T., Bucala, R. (1999). "Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF).Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action." J Biol Chem **274**(25): 18100-18106.
- Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., Lane, S.J., Craft, J., Nishihira, J., Donnelly, S.C., Zhu, Z., Bucala, R. (2005). "Role of macrophage migration inhibitory factor in asthma." Proc Natl Acad Sci USA **102**(40): 14410-14415.
- Mizue, Y., Nishihira, J., Miazaki, T., Fujiwara, S., Chida, M., Nakamura, K., Kikuchi, K., Mukai, M. (2000). "Quantification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) using the one-step sandwich enzyme immunosorbent assay:elevated serum MIF concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of MIF in erythrocytes." Int J Mol Med **5**(4): 397-403.
- Moniz, H., Gastou, M., Leblanc, T., Hurtaud, C., Crétien, A., Lécluse, Y., Raslova, H., Larghero, J., Croisille, L., Faubladiet, M., Bluteau, O., Lordier, L., Tchernia, G., Vainchenker, W., Mohandas, N., Da Costa, L. (2012). "Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL 11 and RPS 19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro." Cell Death Dis **3**(e356).
- Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., Herrlich, P. (2001). "The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44." Genes Dev **15**(8): 968-980.
- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions." Endocr Rev **5**(1): 25-44.
- Murakami, H., Akbar, S.M., Matsui, H., Horiike, N., Onji, M. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis." Clin Exp Immunol **128**(3): 504-510.
- Murakami, H., Akbar, S.M., Matsui, H., Onji, M. (2001). "Macrophage migration inhibitory factor in the sera and the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis:clinical implications and pathogenic significance." Eur J Clin Invest **31**(4): 337-343.
- Muramaki, M., Miyake, H., Yamada, Y., Hara, I. (2006). "Clinical utility of serum macrophage migration inhibitory factor in men with prostate cancer as a novel biomarker of detection and disease protection." Oncol Rep **15**(1): 253-257.

- Nathan, C. (1973). "Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions." *J Exp Med* **137**: 275-290.
- Nathan, C. F., Karnovsky, M.L., David, J.R. (1971). "Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes" *J Exp Med* **133**(6): 1356-1376.
- Nemajerova, A., Mena, P., Fingerle-Rowson, G., Moll, U.M., Petrenko, O. (2007). "Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice." *EMBO J* **26**(4): 987-997.
- Nilno, M., Ogata, A., Kikuchi, S., Tashiro, K., Nishihira, J. (2000). "Macrophage migration inhibitory factor in cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease." *J Neurol Sci* **179**(S 1-2): 127-131.
- Nishimura, T., Horino, K., Nishiura, H., Shibuya, Y., Hiraoka, T., Tanase, S., Yamamoto, T. (2001). "Apoptotic cells of an epithelial cell line, AsPC-1, release monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer." *J Biochem* **129**(3): 445-454.
- Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K., Bucala, R. (1995). "Localisation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary-gland." *Mol Med* **1**(7): 781-788.
- Nishiura, H., Shibuya, Y., Matsubara, S., Tanase, S., Kambara, T., Yamamoto, T. (1996). "Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein." *J Biol Chem* **271**(2): 878-882.
- Nishiura, H., Shibuya, Y., Yamamoto, T. (1998). "S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a." *Lab Invest* **78**(12): 1615-1623.
- Nishiura, H., Tanase, S., Shibuya, Y., Futa, N., Sakamoto, T., Higginbottom, A., Monk, P. (2005). "S19 ribosomal protein dimer augments metal-induced apoptosis in mouse fibroblastic cell line by ligation of the C5a receptor." *J Cell Biochem* **94**(3): 540-553.
- Nishiura, H., Tanase, S., Shibuya, Y., Nishimura, T., Yamamoto, T. (1999). "Determination of the cross-linked residues in homo-dimerization of S19 ribosomal protein concomitant with exhibition of monocyte chemotactic activity." *Lab Invest* **79**(8): 915-923.
- Noguchi, K., Okumura, F., Takahashi, N., Kataoka, A., Karmiyama, T., Todo, S., Hatakeyama, S. (2011). "TRIM40 promotes neddylation of IKK γ and is downregulated in gastrointestinal cancers." *Carcinogenesis* **32**(7): 995-1004.
- Noh, E. H., Hwang, H.S., Hwang, H.S., Min, B., Im, E., Chung, K.C. (2012). "Covalent NEDD8 Conjugation Increases RCAN1 Protein Stability and Potentiates Its Inhibitory Action on Calcineurin." *PLoS One* **7**(10).
- Oda, Y., Tokita, K., Ota, Y., Li, Y., Taniguchi, K., Nishino, N., Takagi, K., Yamamoto, T., Nishiura, H. (2008). "Agonistic and antagonistic effects of C5a-chimera bearing S19 ribosomal protein tail portion on the C5a receptor of monocytes and neutrophils, respectively." *J Biochem* **144**(3): 371-381.
- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M., Nishihira, J. (2000). "Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis." *J Biol Chem* **275**(1): 444-450.
- Onodera, S., Nishiura, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanake, S., Minami, A. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor upregulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts, Relevance to intracellular signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(10): 7865-7874.
- Onodera, S., Tanji, H., Suzuki, K., Kaneda, K., Mizue, Y., Sagawa, A., Nishihira, J. (1999). "High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints." *Cytokine* **11**(2): 163-167.

Literatur

- Orru, S., Aspesi, A., Armiraglio, M., Caterino, M., Loreni, F., Ruoppolo, M., Santoro, C., Dianzani, I. (2007). "Analysis of the ribosomal Protein S19 Interactome." Mol Cell Proteomics **6**(3): 382-393.
- Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonico, E., Shtiegman, K., Marmor, M.D., Kochupurakkal, B.S., Katz, M., Lavi, S., Cesareni, G., Yarden, Y. (2006). "Conjugation of Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases." J Biol Chem **281**(31): 21640-21651.
- Pan, Z. Q., Kentsis, A., Dias, D.C., Yamoah, K., Wu, K. (2004). "Nedd8 on cullin:building an expressway to protein destruction." Oncogene **23**(11): 1985-1997.
- Paralkar, V., Wistzow, G. (1994). "Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Genomics **19**(1): 48-51.
- Pastrana, D., Raghavan, N., FitzGerald, P., Eisinger, S.W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R.P., Bickel, C., Scott, A.L. (1998). "Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor." Infect Immun **66**(12): 5955-5963.
- Petrenko, O., Fingerle-Rowson, G., Peng, T., Mitchell, R.A., Metz, C.N. (2003). "Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation." J Biol Chem **278**(13): 11078-11085.
- Qi, D., Hu, X., Wu, X., Merek, M., Leng, L., Bucala, R., Young, L.H. (2009). "Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion." J Clin Invest **119**(12): 3807-3816.
- Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Björk, P., Jacobsson, L., Rorsman, H. (1997). "The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase." FEBS Lett **417**(1): 85-88.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C.N., Rorsman, H. (1996). "The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction." Mol Med **2**(1): 143-149.
- Rossi, A. G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A.P., Rahman, I., Metz, C.N., Bucala, R., Donnelly, S.C. (1998). "Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in Asthma." J Clin Invest **101**(12): 2869-2874.
- Ryu, J. H., Li, S.H., Park, J.W., Lee, B., Chun, Y.S. (2011). "Hypoxia-inducible factor α subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent." J Biol Chem **286**(9): 6963-6970.
- Sakai, Y., Masamune, A., Satoh, A., Nishihira, J., Yamagiwa, T., Shimosegawa, T. (2003). "Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis." Gastroenterology **124**(3): 725-736.
- Sato, A., Uinuk-ool, T.S., Kuroda, N., Mayer, W.E., Takezaki, N., Dongak, R., Figueroa, F., Cooper, M.D., Klein, J. (2003). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes; implications for its evolutionary origin." Dev Comp Immunol **27**(5): 401-412.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schober, A., Bernhagen, J., Thiele, M., Zeiffer, U., Knarren, S., Roller, M., Bucala, R., Weber, C. (2004). "Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **109**(3): 380-385.
- Schrans-Stassen, B. H., Lue, H., Sonnemans, D.G., Bernhagen, J., Post, M.J. (2005). "Stimulation for vascular smooth muscle cell migration by macrophage migration inhibitory factor." Antioxid Redox Signal **7**(9-10): 1211-1216.

- Schuster, J., Fröjmark, A.S., Nilsson, P., Badhai, J., Virtanen, A., Dahl, N. (2010). "Ribosomal protein S19 binds to its own mRNA with reduced affinity in Diamond-Blackfan anemia." Blood Cells Mol Dis **45**(1): 23-28.
- Selvi, E., Tripodi, S.A., Catenaccio, M., Lorenzini, S., Chindamo, D., Manganelli, S., Romagnoli, R., Ietta, F., Paulesu, L., Miracco, C., Cintonino, M., Marcolongo, R. (2003). "Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis." Ann Rheum Dis **62**(5): 460-464.
- Semba, U., Chen, J., Ota, Y., Jia, N., Arima, H., Nishimura, H., Yamamoto, T. (2010). "A plasma protein indistinguishable from ribosomal protein S19: conversion to a monocyte chemotactic factor by a factor XIIIa-catalyzed reaction on activated platelet membrane phosphatidylserine in association with blood coagulation." Am J Pathol **176**(3): 1542-1551.
- Shen, L., Hu, J., Lu, H., Wu, M., Qin, W., Wan, D., Li, Y.Y., Gu, J. (2003). "The apoptosis-associated protein BNIPL interacts with two cell proliferation-related proteins, MIF and GFER." FEBS Lett **540**(1-3): 86-90.
- Shi, L., Tsurusaki, S., Futa, N., Sakamoto, T., Matsuda, T., Nishino, N., Kunitomo, R., Kawasuji, M., Tokoita, K., Yamamoto, T. (2005). "Monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in atherosclerotic vascular lesion." Virchows Archiv **447**(4): 747-755.
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., Bucala, R. (2006). "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex." Immunity **25**(4): 595-606.
- Shimizu, T. (1999). "Increased production of Macrophage migration inhibitory factor by PBMCs of atopic dermatitis." J. Allergy Clin. Immunol. **104**: 659-664.
- Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A., Mizue, Y., Nishihira, J. (1997). "Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis." Biochem Biophys Res Commun **240**(1): 173-178.
- Shrestha, A., Horini, K., Nishiura, H., Yamamoto, T. (1999). "Acquired immune response as a consequence of the macrophage-dependent apoptotic cell clearance and role of the monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in this connection." Lab Invest **79**(12): 1629-1642.
- Son, A., Kato, N., Horibe, T., Matsuo, Y., Mochizuki, M., Mitsui, A., Kawakami, K., Nakamura, H., Yodoi, J. (2009). "Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Antioxid Redox Signal **11**(10): 2595-2605.
- Soulet, F., Al Saati, T., Roga, S., Amalric, F., Bouche, G. (2001). "Fibroblast Growth Factor-2 Interacts with Free Ribosomal Protein S19." Biochem Biophys Res Commun **289**(2): 591-596.
- Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, I., Suzuki, M., Nishihira, J. (1997). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase." J Struct Biol **120**(1): 105-108.
- Swope, M. D., Lolis, E. (1999). "Macrophage migration inhibitory factor; cytokine, hormone, or enzyme?" Rev Physiol Biochem Pharmacol **139**: 1-32.
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., Kastan, M.B. (2005). "Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin." Cell **123**(1): 49-63.
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Oshima, T., Une, Y., Todo, S. (1998). "Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth." Mol Med **4**(11): 707-714.

Literatur

- Tjandra, K., Kubes, P., Rioux, K., Swain, M.G. (1996). "Endogenous glucocorticoids inhibit neutrophil recruitment to inflammatory sites in cholestatic rats." *Am J Nephrol* **270**(5 Pt 1): 821-825.
- Um, J. W., Han, K.A., Im, E., Oh, Y., Lee, K., Chung, K.C. (2012). "Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin." *J Neurosci Res* **90**(5): 1030-1042.
- Vincenti, M. P., White, L.A., Schroen, D.J., Benbow, U., Brinckerhoff, C.E. (1996). "Regulating expression of the gene for matrix metalloprotease-1 (collagenase): mechanism that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**(4): 391-411.
- Wada, H., Yeh, E.T., Kamitani, T. (1999). "Identification of NEDD8-conjugation site in human cullin-2." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 100-105.
- Wadgaonkar, R., Dudek, S.M., Zaiman, A.L., Linz-McGillem, L., Verin, A.D., Nurmukhambetova, S., Romer, L.H., Garcia, J.C. (2005). "Intracellular interaction of myosin light chain kinase with macrophage migration inhibitory factor (MIF) in endothelium." *J Cell Biochem* **95**(4): 849-858.
- Wadkaonkar, R., Dudek, S.M., Zaiman, A.L., Linz-McGillem, L., Verin, A.D., Nurmukhambetova, S., Romer, L.H., Garcia, J.C. (2005). "Intracellular interaction of myosin light chain kinase with macrophage migration inhibitory factor (MIF) in endothelium." *J Cell Biochem* **95**(4): 849-858.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J.A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C-N., Nicod, P., Bucala, R. (1997). "Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(9): 4782-4787.
- Watson, I. R., Blanch, A., Lin, D.C., Ohh, M., Irwin, M.S. (2006). "Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function." *J Biol Chem* **281**(45): 34096-34103.
- Wei, N., Serino, G., Deng, X.W. (2008). "The COP9 signalosome: more than a protease." *Trends Biochem Sci* **33**(12): 592-600.
- Weiser, W., Temple, P.A., Wittek-Giannotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., David, J.R. (1989). "Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(19): 7522-7526.
- Willig, T. N., Draptchinskaia N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., Orfali, K., Gustavsson, P., Garelli, E., Brusco, A., Tiemann, C., Pérignon, J.L., Bouchier, C., Cicchiello, L., Dahl, N., Mohandas, N., Tchernia, G. (1999). "Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond-Blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression." *Blood* **94**(12): 4294-4306.
- Wilson, D. M., Deutsch, W.A., Keller, M.R. (1994). "Drosophila ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites." *J Biol Chem* **269**(41): 25359-25364.
- Wistow, G. J., Shaughnessy, M.P., Lee, D.C., Hodin, J., Zelenka, P.S. (1993). "A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens." *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(4): 1272-1275.
- Wolf, D. A., Zhou, C., Wee, S. (2003). "The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?" *Nat. Cell. Biol.* **5**(12): 1029-1033.
- Wool, I. G. (1996). "Extraribosomal functions of ribosomal proteins." *Trends Biochem Sci* **21**(5): 164-165.
- Xia, H. H., Yang, Y., Chu, K.M., Gu, Q., Zhang, Y.Y., He, H., Wong, W.M., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Yuen, M.F., Chan, A.O., Wong, B.C. (2009). "Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer." *Cancer* **115**(23): 5441-5449.

Literatur

- Xirodimas, D. P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T., Lane, D.P. (2004). "Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity." Cell **118**(1): 83-97.
- Xirodimas, D. P., Sundqvist, A., Nakamura, A., Shen, L., Botting, C., Hay, R.T. (2008). "Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway." EMBO Rep **9**(3): 280-286.
- Yabunaka, N., Nishihira, J., Mizue, Y., Tsuji, M., Kumagai, M., Ohtsuka, Y., Imamura, Y., Asaka, M. (2000). "Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type-2-diabetes." Diabetes Care **23**(2): 256-258.
- Yamada, G., Shijubo, N., Takagi-Takahashi, Y., Nishihira, J., Mizue, Y., Kikuchi, K., Abe, S. (2002). "Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis." Clin Immunol **104**(2): 123-127.
- Yeh, E. T., Gong, L., Kamitani, T. (2000). "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles." Gene **248**(1-2): 1-14.
- Zang, M., Aman, P., Grubb, A., Panagopoulos, I., Hindemith, A., Rosengren, E., Rorsman, H. (1995). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase." FEBS Lett **373**(3): 203-206.
- Zhang, S., Lin, R., Zhou, Z., Wen, S., Lin, L., Chen, S., Shan, Y., Cong, Y., Wang, S. (2006). "Macrophage migration inhibitory factor interacts with HBx and inhibits its apoptotic activity." Biochem Biophys Res Commun **342**(2): 671-679.

8 Publikationen

Filip, A. M., Klug, J., Cayli, S., Fröhlich, S., Henke, T., Lacher, P., Eickhoff, R., Bulau, P., Linder, M., Carlsson-Skwirut, C., Leng, L., Bucala, R., Kraemer, S., Bernhagen, J., Meinhardt, A. (2009). "Ribosomal protein S19 interacts with macrophage migration inhibitory factor and attenuates its pro-inflammatory function." J Biochem **284**(12): 7977-7985.

Lv, J., Huang, X.R., Klug, J., Fröhlich, S., Lacher, P., Meinhardt, A., Lan, H.Y. (2013). "Ribosomal Protein S19 is a novel therapeutic agent in inflammatory kidney disease." Clin Sci **124**:627-637.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Meinhardt für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für den gewährten wissenschaftlichen Freiraum, sowie für seine kontinuierliche Unterstützung.

Herrn Dr. Jörg Klug gilt mein besonderer Dank für seine vielseitigen hilfreichen Ratschläge, der Korrektur der Arbeit, die interessanten weitreichenden Diskussionen, und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Die stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Lösungsvorschläge haben zum großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.Y. Lan für die Möglichkeit des Aufenthalts in seinem Labor bedanken.

Besonders möchte ich mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Meinhardt für die herzliche Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Besonders dankbar bin ich für die Freundschaften, die sich während meiner Zeit mit aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Meinhardt entwickelt haben. Sie haben vor allem die anstrengenden Momente mit viel Verständnis und Humor erleichtert.

Ich bedanke mich bei Pawel Szczesniak für die Hilfe mit Pymol bei Abbildung 20.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Thomas und Erika Lacher sowie meinem Bruder Jan, die mich immer in der Durchführung meiner beruflichen Wünsche bestärkt haben und ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung ich mein Studium und meine Promotion nicht hätte realisieren können.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den vom mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder ich habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift