

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Die Regulation der Sekretion des *macrophage migration
inhibitory factor* durch Nitrit im myokardialen
Ischämie-/Reperfusionsschaden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna-Elena Mull

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Pohl, J., Hendgen-Cotta, U.B., Rammos, C., Luedike, P., Mull, E., Stoppe, C., Jülicher, K., Lue, H., Merx, M.W., Kelm, M., Bernhagen, J., Rassaf, T.,

Targeted intracellular accumulation of macrophage migration inhibitory factor in the reperfused heart mediates cardioprotection.

Thromb Haemost, 2015 Dec 22; 115(1): 200-212 [Epub 2015 Aug 27]

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion des *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) im Rahmen des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R-Schadens) und dessen Regulation durch Nitrit untersucht. Eine Rolle im I/R-Schaden stellen die in der frühen Reperfusionsphase entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar [1, 2]. ROS können durch die Oxidoreduktasefunktion von intrazellulär vorliegendem MIF verringert werden [3]. Durch die Applikation von exogenem Nitrit mit konsekutiver S-Nitrosierung von MIF wird diese Oxidoreduktasefunktion deutlich gesteigert, welches die kardioprotektive Wirkung von MIF verstärkt [4].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Kardioprotektion von über Nitrit modifiziertem MIF nicht nur durch eine Konformationsänderung des Proteins, sondern auch durch eine Beeinflussung der MIF-Sekretion begründet werden kann.

Um die isolierte Sekretion der Kardiomyozyten zu betrachten, wurde die MIF-Sekretion *in vitro* an *heart-like-1*-Zellen (HL1-Zellen) untersucht. Nach Induktion einer Hypoxie mittels Hypoxiekammer wurden die MIF-Konzentrationen während der Reoxygenierung intrazellulär und extrazellulär mittels *Western Blot* bestimmt. Äquivalent dazu wurden *in vivo* Untersuchungen an Wildtypmäusen (WT-Mäusen) und MIF-*knockout*-Mäusen (*Mif*^{-/-}-Mäusen) in der myokardialen I/R mittels *Western Blot* und ELISA durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Gruppe mit Nitrit behandelt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. In beiden Modellen konnte gezeigt werden, dass die Applikation exogenen Nitrits höhere intrazelluläre MIF-Konzentrationen durch eine verzögerte Sekretion in der frühen Reoxygenierungs-/Reperfusionsphase zur Folge hatte. Mithilfe der Chemilumineszenzdetektion (CLD) konnte gezeigt werden, dass exogenes Nitrit in hypoxischen Zellen zum reaktiven Stickstoffmonoxid (NO) reduziert wird. NO steht dann zur S-Nitrosierung von MIF zur Verfügung, so dass die verringerte Sekretion von MIF durch diese Proteinmodifikation erklärt werden kann.

Anhand gesenkter Wasserstoffperoxidkonzentrationen (H₂O₂-Konzentrationen) konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhten intrazellulären MIF-Konzentrationen über eine Reduktion des ROS-Spiegels einen konsekutiven Schutz vor Proteinoxidation bewirkten. Mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC-Färbung) konnte zudem eine Infarktgrößenminderung nach Applikation von exogenem Nitrit *in vivo* demonstriert werden.

Zusammenfassend bedingt die Applikation exogenen Nitrits eine verzögerte Sekretion von MIF in der frühen Phase der Reoxygenierung/Reperfusion und wirkt somit kardioprotektiv.

Abkürzungen

AAR	<i>area at risk</i> (ischämisches Gewebe)
ABCA1	<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	adenosinmonophosphataktivierte Proteinkinase
AP1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BAD	Bcl2-assoziiierter Agonist des Zelltods
CALC	Cys57-Ala-Leu-Cys60
CD74	<i>cluster of differentiation 74</i>
CK	Kreatinkinase
CKM	<i>creatine kinase, muscle</i>
CLD	Chemilumineszenzdetektor
CO₂	Kohlenstoffdioxid
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2
CXCR	CXC-Motiv-Rezeptor
CXXC	Cys-Xaa-Xaa-Cys
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK 1/2	<i>extracellular-signal regulated Kinase 1 und 2</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Kälberserum)
G	Gewicht des Schnittes bei der Infarktgrößenbestimmung
H/R	Hypoxie/Reoxygenierung
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HEK-Zellen	<i>human-embryonic-kidney-Zellen</i>
HL1-Zellen	<i>heart-like-1-Zellen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

I	Fläche des Infarkts bei der Infarktgrößenbestimmung
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN	Interferon
Jab1/CSN5	<i>cJun-N-Terminal activation domain binding</i> Protein 1/die fünfte Untereinheit des <i>constitutive photomorphogenesis</i> 9
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharide
LV	linker Ventrikel
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
Mif^{-/-}	MIF- <i>knockout</i>
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NP40	Nonylphenylpolyethylenglycol
O₂⁻	Hyperoxid-Anion
ONOO⁻	Peroxynitrit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	perkutane Koronarintervention
pCO₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
RIPA-Puffer	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSNOs	S-Nitrosothiole
SD	Standardabweichung
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler

Src-Tyrosinkinase	<i>sarcoma</i> -Tyrosinkinase
t	Probenentnahmezeitpunkte der <i>in vitro</i> -Versuche
TLR4	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TPOR	Thiol-Protein-Oxidoreduktasen
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
WT	Wildtyp

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Myokardiale Ischämie/Reperfusion	1
1.1.1	Die Pathophysiologie des I/R-Schadens	2
1.1.2	Protektive Strategien.....	4
1.2	Der <i>macrophage migration inhibitory factor</i>	6
1.2.1	Entdeckung / Historisches.....	6
1.2.2	Struktur	6
1.2.3	Molekulare Mechanismen	7
1.2.4	Die Rolle von MIF in Krankheitsprozessen	10
1.3	Die Beeinflussung der MIF-Produktion und -Sekretion.....	12
1.4	Nitrit und Stickstoffmonoxid	13
1.4.1	Reduktion von Nitrit.....	13
1.4.2	Stickstoffmonoxid und S-Nitrosierung	14
1.5	Das Zusammenwirken von Nitrit und MIF	15
2	Ziele dieser Arbeit	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Materialien.....	18
3.1.1	Zellart.....	18
3.1.2	Versuchstiere	18
3.1.3	Chemikalien, Lösungen, Gase	18
3.1.4	Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	20
3.1.5	Marker, Membran, Gelart.....	21
3.1.6	Antikörper.....	21
3.1.7	Rekombinante Proteine	22
3.1.8	Kits.....	22
3.1.9	Geräte	22
3.1.10	Software.....	24
3.2	Methoden – <i>in vitro</i>	25
3.2.1	Zellkultur	25
3.2.2	Hypoxiemodell	26
3.2.3	Etablierung des H/R-Modells mittels Blutgasanalyse.....	27
3.2.4	Hypoxieversuche	29
3.2.5	Zellviabilität nach Hypoxie.....	31
3.2.6	<i>Western Blot</i>	32
3.2.7	Das Prinzip des Chemilumineszenzdetektors	34
3.3	Methoden – <i>in vivo</i>	36

3.3.1	<i>in vivo</i> -Mausmodell	36
3.3.2	Entnahme der Mäuseherzen	37
3.3.3	Gewinnung der Mäuseherzproben	37
3.3.4	MIF-Maus- <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	38
3.3.5	Troponinbestimmung	39
3.3.6	Wasserstoffperoxidassay	39
3.3.7	Akonitaseassay	39
3.3.8	Bestimmung der Infarktgrößen	40
4	Ergebnisse	42
4.1	<i>In vitro</i>	42
4.1.1	Nitritreduktion durch Kardiomyozyten	42
4.1.2	Beeinflussung der MIF-Sekretion durch exogenes Nitrit	43
4.1.3	Effekt von Nitrit auf die Viabilität von Kardiomyozyten	46
4.2	<i>In vivo</i>	48
4.2.1	Beeinflussung der MIF-Sekretion durch Nitrit	48
4.2.2	Effekt von Nitrit auf den Herzmuskel mittels Troponinbestimmung	49
4.2.3	Kardioprotektive Funktionen von MIF durch Beeinflussung der intrazellulären Signalwege	50
4.2.4	Reduzierung der Infarktgrößen durch Nitrit und MIF	53
5	Diskussion und Schlussfolgerung	55
5.1	Nitritreduktion durch hypoxische Kardiomyozyten	55
5.2	Verzögerte MIF-Sekretion durch Nitritbehandlung	56
5.3	Kardioprotektive Effekte von MIF	59
5.3.1	Proteinfunktionserhaltung durch reduzierte H ₂ O ₂ -Spiegel	59
5.3.2	Die Infarktgröße wird durch MIF und exogenes Nitrit reduziert	62
5.4	Ausblick	63
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	65

1 Einleitung

1.1 Myokardiale Ischämie/Reperfusion

Einer Erhebung des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2012 zufolge stellt der akute Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [5]. Bei diesem Krankheitsbild entsteht durch den Verschluss einer Koronararterie eine Ischämie [6]. Aufgrund der gestörten Blutversorgung kann das Myokard nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden [6]. Wegen der aus der Ischämie resultierenden Hypoxie muss sich der Stoffwechsel der Kardiomyozyten umstellen [6]. Dieses kann eine Verschiebung der Elektrolyte, eine Störung der myokardialen Erregung und somit auch eine gestörte Herzmuskelkontraktion zur Folge haben [6]. Nach vier Stunden kann ein Gewebsuntergang, der durch freigesetzte Enzyme und freie Radikale bedingt ist, erkennbar werden [6].

Als Therapie des Myokardinfarkts mit einer ST-Streckenhebung wird in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) eine möglichst schnelle perkutane Koronarintervention (PCI) angestrebt [7]. Die dabei durchgeführte Revaskularisierung lässt die Reperusionsphase beginnen, in der die Herzmuskelzellen durch das eröffnete Gefäß wieder mit sauerstoffreichem Blut versorgt werden können [6-8].

Trotz der somit wieder normalisierten Durchblutung des Myokards kann sich jedoch ein sogenannter Reperusions Schaden entwickeln [2]. Dieser kann ca. 50 % der endgültigen Infarktgröße ausmachen [9]. Einerseits können sich, durch den vermehrten Zelluntergang begünstigt, reversible Arrhythmien und ein sogenanntes reversibles *stunning* ausbilden [2, 6, 10]. Der Begriff des *stunnings* bezeichnet eine postischämische, also eine in der Reperusionsphase auftretende ventrikuläre Dysfunktion in Form einer Bewegungslosigkeit der Myokardzellen, bei der die Zellen nicht irreversibel geschädigt werden [10]. Andererseits können irreversible Reperusions Schäden mikrovaskulär und myokardial auftreten [2]. Anschließend kann zusätzlich eine Vernarbung erkennbar werden [6].

In der Postinfarktphase findet das sogenannte *remodeling* statt, welches ventrikuläre Umbauvorgänge beschreibt und letztlich zu einer Ventrikeldilatation, einer systolischen Funktionseinschränkung oder einer Hypertrophie führen kann [6].

Folglich stellt der Ischämie/Reperusions-Schaden (I/R-Schaden) ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, dessen pathophysiologische Mechanismen erst ansatzweise nachvollzogen wurden. Da der Reperusions Schaden einen erheblichen Teil

der finalen Infarktgröße ausmacht, muss versucht werden, ihm kardioprotektiv entgegenzuwirken [9].

1.1.1 Die Pathophysiologie des I/R-Schadens

Durch die Ischämie und die Reperfusion entstehen eine Reihe subzellulärer Veränderungen.

Zunächst entwickelt sich durch Hypoxie aus einem aeroben in anaeroben Stoffwechsel [11]. Dadurch nehmen in den Kardiomyozyten die Adenosintriphosphat- (ATP-), Kreatinphosphat- und Glykogenreserven langsam ab und es fehlt die Energie zur Kontraktion, was einen Herzstillstand nach sich ziehen kann [12]. Im anaeroben Stoffwechsel fällt vermehrt Laktat an und akkumuliert durch das Ausbleiben der Durchblutung [11]. Zusätzlich häufen sich weitere anfallende Stoffe wie Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Kohlenstoffdioxid (CO_2), Acetyl-CoA und Carnitin an [11]. Der intrazelluläre pH fällt während eines Myokardinfarkts ab und führt zu einer anschließenden Aktivierung des Natrium-Protonen-Antiporters [13]. Dieser Natrium-Protonen-Antiporter kann jedoch wegen des abnehmenden Protonengradienten im Laufe der Ischämie nicht weiter arbeiten [14]. Dies liegt zum einen daran, dass sich durch die fehlende Durchblutung extrazellulär viele Protonen ansammeln, und zum anderen daran, dass die Natrium-Kalium-ATPase wegen des Energiemangels den Natriumgradienten nicht wie gewohnt aufrechterhalten kann [13].

Wenn der Gradient jedoch durch die schnell angestrebte Reperfusion wieder hergestellt wird, sodass es zu einer Wiederaufnahme der Arbeit des Antiporters kommt, kann der anschließende Transport von Natriumionen über den Natrium-Kalzium-Austauscher zu einer zytosolischen Kalziumüberladung führen [13]. Auch die Kalzium-ATPase kann das Kalzium wegen des Energiemangels nicht zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportieren, was zusätzlich einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bedingt [15]. Der starke Kalziumanstieg im Zytosol findet dabei vor allem in der frühen Phase der Ischämie statt, da der Kalziumeinstrom bei einer verlängerten Ischämie nachlässt [13]. Diese Kalziumüberladung im Zytoplasma birgt die Gefahr von Arrhythmien und auch die Gefahr des myokardialen *stuntings*, die zu den reversiblen Reperfusionsschäden gezählt werden [2, 13].

Des Weiteren umgeben reversibel geschädigte Myokardzellen die irreversibel geschädigte Zone und formen vor allem in der frühen Reperfusionsphase durch die kalziuminduzierte Muskelkontraktion sogenannte Kontrakturbänder [10, 11, 16, 17].

Insgesamt fallen somit aufgrund des Energiemangels vermehrt Kalzium und Natrium im Zytosol an und das Membranpotential wird gestört [10]. Die charakteristische Zellschwellung wird zum einen osmotisch durch die Elektrolytverschiebung und zum anderen durch die Permeabilitätsveränderungen bedingt [10]. Zusätzlich wird für die explosionsartige Zellschwellung in der Reperfusion eine sarkolemmale Ursache angenommen [10].

Überdies aktiviert Kalzium die Phosphatasen, Proteasen und Nukleasen, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen [18, 19]. Zur ROS-Produktion trägt auch der vermehrte Abbau des ATPs zu Adenosinmonophosphat (AMP) und anschließend zu Adenosin/Inosin bei [20]. Durch die Xanthinoxidase, die sowohl im hypoxischen als auch im normoxischen Gewebe existiert, wird dieses Abbauprodukt vor allem während der Ischämie weiter über Hypoxanthin zu Harnsäure abgebaut, wobei als Nebenprodukt zusätzlich Sauerstoffradikale entstehen [20].

Die Reperfusionsphase kann in einen frühen und einen späten Abschnitt unterteilt werden [2]. Vor allem die frühe Phase der Reperfusion trägt maßgeblich zur ROS-Bildung bei [1]. Hierbei sind gerade die ersten fünf Minuten der Reperfusion mit dem sogenannten oxidativen *burst*, einem raschen Anstieg des ROS-Spiegels, als kritisch anzusehen [2]. Die ROS-Bildung wird dabei unter anderem durch die wiederhergestellte Elektronentransportkette begünstigt [2]. Durch Zelluntergang führen die vermehrt generierten ROS, die toxisch auf die Zellen wirken, zu einer Vergrößerung des Infarktareals [2, 11]. Somit stellen sie eine irreversible Form des Reperfusionsschadens, den letalen myokardialen Reperfusionsschaden, dar [2, 11].

Darüber hinaus lagert sich das Kalzium vermehrt in den Mitochondrien ein [19]. Dies führt zu einer unkontrollierten ROS-Produktion, der Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) und außerdem zu Peroxidationen und Membranschäden während der Reperfusion [2, 9, 19].

Schließlich konnten auch eine Schwellung der Mitochondrien, eine Aggregation des Chromatins und bei längerer Ischämie auch eine irreversible Schädigung der sarkolemmalen Membranen beobachtet werden [15]. So entwickelt sich ein oxidatives Umfeld, welches Lipidperoxidation, Proteinoxidation und mitochondriale DNA-Schäden fördert und letztlich Apoptose induziert [10, 19].

Das durch die Hypoxie veränderte Milieu sorgt zusätzlich über den Schaden der sarkolemmalen Membran für die Aktivierung des Komplementsystems und somit für Inflamationsprozesse, welche vor allem ein Kennzeichen der späten

Reperusionsphase darstellen [2, 21]. Durch die Aktivierung von Phospholipasen werden Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene freigesetzt [11]. Dadurch werden neutrophile Granulozyten und Monozyten angelockt, die wiederum Makrophagen aktivieren [11]. Die angelockten neutrophilen Granulozyten besitzen eine NADPH-Oxidase, welche als weitere Quelle von ROS bekannt ist [9].

Auch das Endothel wird durch die Hypoxie zunehmend geschädigt [11]. So bilden sich zum Beispiel vermehrt Adhäsionsmoleküle, an denen eine Interaktion mit Granulozyten stattfindet [10, 11]. Hierdurch wird die Mikrozirkulation gestört und das sogenannte *no reflow*-Phänomen entsteht [10, 11]. Dies ist ein Zeichen des irreversiblen Reperfusionsschadens [2].

Obwohl die schnelle Reperfusion beim Vorliegen eines ST-Hebungsinfarkts die Therapie erster Wahl ist, dürfen also die Gefahren des Reperfusionsschadens – wie zum Beispiel die gerade in der frühen Reperusionsphase stattfindende ROS-Produktion oder aber die in der späten Reperusionsphase einsetzende Inflammation – nicht unterschätzt werden [2, 9].

1.1.2 Protektive Strategien

In jedem Gewebe gibt es natürlich vorkommende antioxidative Enzyme wie zum Beispiel die Katalase, die Superoxiddismutase und die Glutathion-Peroxidase [22]. Im Falle des I/R-Schadens sind diese Enzyme jedoch zum einen wegen des Energiemangels nicht voll funktionsfähig, zum anderen wird deren Kapazität überschritten [10, 22]. Somit ist eine Therapie mit Antioxidantien ein möglicher Ansatz, dem Reperfusionsschaden entgegenzuwirken. So wurde zum Beispiel Patienten vor der Reperfusion eine Infusion des Wirkstoffs Edaravone, welcher ursprünglich der Neuroprotektion diene, verabreicht, um in diesem Ansatz dessen antioxidative Wirkung als Radikalfänger auszunutzen [23]. Dabei konnte in einer Langzeit-*Follow-up*-Studie gezeigt werden, dass zwölf Monate nach der Reperfusion eine verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion und eine geringere Rehospitalisationsrate der Edaravonegruppe gegenüber der Kontrollgruppe bestanden [23]. Edaravone schien in dieser Studie aber weder in der akuten noch in der chronischen Phase die Ejektionsfraktion gegenüber der Kontrollgruppe zu verbessern [23]. Bislang erhielt diese Therapie noch keinen Einzug in die alltägliche Behandlung des Reperfusionsschadens, da hierzu vorab noch weitere Untersuchungen an größeren Stichproben erfolgen müssten [23].

Ein anderer Ansatzpunkt wäre der, der Bildung von ROS frühzeitig während der Ischämie entgegen zu wirken. Dabei kann zum Beispiel die während der Ischämie ROS produzierende Xanthinoxidase durch Oxypurinol blockiert werden [20]. Diese Blockierung verhinderte in *in vivo*-Studien die Bildung von 54 % der Sauerstoffradikalen verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Blockierung des Enzyms und hatte sowohl eine Verbesserung der myokardialen Funktion als auch eine der koronaren Durchblutung zur Folge [20]. Diese Ergebnisse wurden bisher jedoch nur an Mäuseherzen erzielt, weswegen dieser Ansatz im klinischen Alltag noch keine Therapiemöglichkeit darstellt [20]. Diesbezüglich wird jedoch diskutiert, dass dieser Ansatz beim Menschen weniger sinnvoll sein könnte, da in menschlichem Herzgewebe nur eine geringe Xanthinaktivität nachweisbar ist [24].

Ein weiterer Behandlungsansatz hat die Beeinflussung der veränderten Kalziumkonzentrationen zum Ziel. In einer Studie von Boden et al. aus dem Jahr 2000 wurde dafür nach thrombolytischer Therapie täglich der Kalziumantagonist Diltiazem genutzt [25]. Zwar besserte sich weder die Herztodrate noch die Reinfarktrate, die Notwendigkeit einer Revaskularisierung konnte jedoch reduziert werden [25].

Des Weiteren wurde versucht, dem Reperfusionsschaden mithilfe des Komplementantikörpers Pexelizumab antiinflammatorisch entgegenzuwirken, was sich jedoch nicht als protektiv erwies [26].

Andere Ansätze umfassten beispielsweise die experimentelle Durchführung einer Magnesiumtransfusion in der Reperusionsphase, was protektiv auf das Herz wirkte [9]. Der dem zugrundeliegende Mechanismus blieb jedoch unklar und auch klinische Anwendungen zeigten keinen eindeutigen Nutzen [9].

Eine milde Hypothermie von 33-35°C nach erfolgreicher Revaskularisierung erwies sich in *in vivo*-Experimenten zwar hinsichtlich der Infarktgröße als protektiv, aber die späteren klinischen Studien blieben ohne Erfolg [9].

Da all diese Ansätze in bisherigen Untersuchungen keine Reduktion des Reperfusionsschadens erzielen, wird in dieser Arbeit der kardioprotektiv wirkende *macrophage migration inhibitory factor* näher untersucht [4]. Dieser kann dem Reperfusionsschaden wie im Folgenden beschrieben auf mehreren Ebenen entgegenwirken.

1.2 Der *macrophage migration inhibitory factor*

1.2.1 Entdeckung / Historisches

Das Vorkommen und die Bedeutung des *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) wurden über mehrere Jahre erforscht. Dabei wurde zunächst die Sekretion von MIF aus T-Zellen entdeckt: MIF kontrolliert demnach die Migration der Makrophagen und aktiviert eine Oberflächenadhäsion oder auch die Phagozytose [27-29]. Anschließend wurde MIF 1993 als Hormon der Adenohypophyse identifiziert [30]. Neben der Bildung von MIF durch Makrophagen konnte MIF auch in Geweben wie Endothelzellen, glattmuskulären Zellen und in den hier näher untersuchten Kardiomyozyten nachgewiesen werden [31, 32]. Vor diesem Hintergrund kann MIF als ein ubiquitär vorkommendes Protein bezeichnet werden. Proinflammatorische Reize wie Lipopolysaccharide (LPS), Tumornekrosefaktor (TNF) - α und Interferon (IFN) - γ triggern die Sekretion von MIF [33]. Folglich spielt MIF in Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle.

Um genauere Funktionen von MIF in verschiedenen Krankheitsprozessen wie der Sepsis und dem hier näher untersuchten akuten Myokardinfarkt erforschen zu können, wurden 1999 die Gene der Maus so verändert, dass normale Mäuse, die sogenannten Wildtypmäuse (WT-Mäuse), mit MIF-*knockout*-Mäusen (Mif^{-/-}-Mäusen), die aufgrund des Fehlens von Exon 2, Intron 2 und Exon 3 MIF-defizient sind, verglichen werden können [34, 35].

1.2.2 Struktur

MIF besitzt ein Gewicht von ca. 12,5 kDa und besteht aus 114 Aminosäuren, die zu zwei antiparallelen α -Helices und sechs β -Strängen geformt sind [36]. Dabei bilden vier β -Stränge ein β -Faltblatt [36]. Da die MIF-Translation ohne eine N-terminale Signalsequenz beendet wird, ist anzunehmen, dass für MIF ein eigener Sekretionsmechanismus bestehen muss [37, 38].

MIF besitzt in seiner Struktur drei Cysteine [39, 40]. Das Cys81 liegt in einem hydrophilen Bereich von MIF [36]. Die beiden anderen Cysteine bilden ein zentrales CALC-Motiv mit Cys57-Ala-Leu-Cys60 im hydrophoben Bereich [36]. Cysteine sind intrinsisch nukleophil und unter physiologischen pH-Bedingungen reaktiv, was biochemische Funktionen wie Disulfidbildung, Protein-Protein-Interaktion,

Redoxkatalysation oder *redox signaling* ermöglicht [41]. Dies verschafft MIF ein großes Wirkungsspektrum.

1.2.3 Molekulare Mechanismen

MIF ist ein Protein mit vielfältigen Funktionen, die von der jeweiligen Struktur bestimmt und im Folgenden näher erläutert werden [42]. Dabei können intrazelluläre von extrazellulären Funktionen unterschieden werden.

1.2.3.1 Intrazelluläre Mechanismen

Die drei Cysteine von MIF zeichnen sich jeweils durch besondere Funktionen aus. Das zuvor erwähnte CALC-Motiv zwischen Cys57 und Cys60 sorgt für die Oxidoreduktaseaktivität von MIF [40]. Aufgrund dieser Oxidoreduktasefunktion gehört MIF zu der Gruppe der Thiol-Protein-Oxidoreduktasen (TPOR), der Thioredoxin-Protein-Superfamilie [39]. Die TPOR-Familie enthält eine Cys-Xaa-Xaa-Cys-Sequenz (CXXC-Sequenz), die katalytische Eigenschaften besitzt [39]. Aufgrund seiner Ähnlichkeit durch das CALC-Motiv mit der CXXC-Sequenz dieser Gruppe wird MIF zu dieser hinzugezählt [39]. MIF konnte hierbei eine Disulfidreduktaseaktivität nachgewiesen werden, welche Insulindisulfide mit dem Cofaktor GSH/Dihydroliponamid reduziert und somit in Zusammenhang mit der Redoxhomöostase der Zellen gebracht werden konnte [40]. Durch diese Oxidoreduktasefunktion greift MIF im Rahmen einer I/R schon früh kardioprotektiv auf der Ebene der ROS-Bildung ein und schützt so vor der Entstehung einer oxidativen Umgebung [3].

Cytochrom C ist ein Apoptosemarker für den in der Arbeit von Koga et al. herbeigeführten ischämischen Schaden [3]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei WT-Mäusen im Vergleich zu MIF-defizienten Mäusen aufgrund einer geringeren Schädigung der Mitochondrien weniger Cytochrom C ausgeschüttet wird [3]. Zudem konnte der oxidative Stress anhand der oxidierten Glutathion-Disulfid- und reduzierten Glutathionkonzentration ermittelt werden [3]. Die postischämische Reduktion zu Glutathion erfolgte dabei nur im Myokard der WT-Mäuse [3]. Dies zeigt, dass der zelluläre oxidative Stress postischämisch durch die Redoxaktivität von MIF deutlich reduziert wird [3]. An Cys60 besitzt MIF zudem eine Interaktionsoberfläche mit *cJun-N-Terminal activation domain binding*-Protein1/der fünften Untereinheit des *constitutive photomorphogenesis 9* (Jab1/CSN5) [43]. Über die Bindung von Jab1 hemmt MIF die c-Jun-N-terminale Kinasenaktivierung (JNK-Aktivierung) [43, 44].

Dies vermindert die Phosphorylierung von c-Jun und schützt somit vor Apoptose, indem der Bcl2-assoziierte Agonist des Zelltods (BAD) vermehrt phosphoryliert vorliegt und so antiapoptotische Faktoren binden kann [43, 44]. Eine stärkere Phosphorylierung durch JNK-Aktivierung resultiert somit in einem stärkeren proapoptotischen Effekt [44].

Außerdem wird die Aktivität des Aktivatorproteins 1 (AP1) über Protein-Protein-Interaktion an der aktiven Seite des MIF mit Jab1 reduziert, sodass antiapoptotische Wirkungen erzielt werden [43].

Nachweislich besteht eine Interaktion mit p53 über das dritte Cystein, Cys81 [45]. Jung et al. fanden hierbei 2008 heraus, dass die sonst apoptoseinduzierende Wirkung von p53 durch dessen Bindung an MIF gehemmt wird [45]. Zusätzlich liegt das Cys81, wie bereits erwähnt, in der α -Helix im hydrophilen Bereich [36]. Durch Substitution oder Modifikation an Cys81 wird dieser Bereich hydrophob, sodass eine Konformationsänderung des Proteins angenommen wird, die die Funktionsänderung von MIF herbeiführt [4, 46].

Zusammenfassend ist für diese Arbeit insbesondere die TPOR-Funktion des intrazellulären MIFs wegen deren ROS-Spiegel senkenden Wirkungen von Bedeutung.

1.2.3.2 Extrazelluläre Mechanismen und MIF-Rezeptoren

MIF kann in unterschiedlicher Weise auf die Zellen einwirken. Zum einen wirkt MIF autokrin auf dieselbe Zelle zurück, die diesen Faktor produziert und sekretiert hat [44]. Zum anderen nimmt MIF parakrin Einfluss auf die benachbarten Zellen [47, 48].

Die Wirkung des sezernierten MIF wird über mehrere Rezeptoren vermittelt, die teils als Komplexe interagieren [49]. Dabei wurden für MIF über Rezeptoren wie CD74, CD44 und CXCR2 nicht nur protektive, sondern auch apoptosesteigernde Eigenschaften festgestellt [48].

Der CD74-AMPK-Weg

CD74 ist ein MIF-Rezeptor, welcher eine Variante des Major Histokompatibilitätskomplexes II darstellt [50]. Er dient der Bindung an die Zelloberfläche und ist ein Homotrimer [50, 51]. Über CD74 kann MIF die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT (Proteinkinase B)-Signalwege aktivieren und so Einfluss auf Zellproliferation und Zellüberleben nehmen [49]. MIF aktiviert nach Ischämie über CD74 die adenosinmonophosphataktivierte Proteinkinase (AMPK) [47]. Die

regulierende Funktion von AMPK besteht in der Kontrolle der ATP-Produktion und des Energieverbrauchs [52]. Im Herzen wird zudem durch die AMPK die 6-Phosphofructo-2-kinase stimuliert und somit die Glykolyse angeregt [52]. Zusätzlich wird die Translokation von GLUT4 durch die AMPK-Aktivierung gesteigert, sodass vermehrt Glukose in die Zellen aufgenommen werden kann [53]. Diese erhöhte Glukoseaufnahme findet vor allem in der frühen Phase der Reperfusion statt [54]. Somit nimmt MIF unter ischämischen Bedingungen über den CD74-AMPK-Signalweg Einfluss auf die Glykolyse und die Glukoseaufnahme [47, 52, 53].

Auch wurde herausgefunden, dass MIF in der myokardialen Reperfusionsphase auch autokrin über den CD74-AMPK-Weg inhibierend auf die JNK-Aktivierung wirkt [44]. Außerdem führt die Aktivierung von AMPK zu einer vermehrten Fettsäureoxidation im postischämischen, reperfundierten Herzen [54, 55]. Genauso wie die erhöhte Glukoseaufnahme findet die verstärkte Fettsäureoxidation in der frühen Phase der Reperfusion statt [54]. Diese zunehmende Fettsäureoxidation kann zudem zu einer verminderten Oxidation von Glukose führen und somit auch schädigend wirken [54, 56]. AMPK hat somit sowohl protektive als auch nachteilige Effekte [54, 56].

Rezeptorkomplexe mit CD74

CD74 spielt für rezeptorvermittelte Wirkungen von MIF auch in Rezeptorkomplexen eine entscheidende Rolle.

MIF führt in T-Zellen und Fibroblasten über den *crosslink* zwischen CD74 und CXCR4 durch PI3K und Src zu einer JNK-Aktivierung [49]. Zudem führt dieser Rezeptoren-*crosslink* zu einer clathrinabhängigen Endozytose von MIF [57]. Wenn MIF daraufhin wieder intrazellulär vorliegt, hemmt es aber, wie oben beschrieben, die JNK-Aktivierung [44]. Somit scheint MIF hier teilweise entgegengesetzt und in einer Art Homöostase zu wirken.

Beim Menschen kann die Beeinflussung des JNK-Aktivierungswegs von der Expression von MIF abhängig sein [44]. Diese MIF-Expression unterliegt einem Polymorphismus, sodass von Mensch zu Mensch eine andere genetisch festgelegte Wirkung über den JNK-Weg möglich sein kann [44].

Zudem bildet CD74 zusammen mit CD44 einen Rezeptorkomplex für MIF [58]. Die Bindung von MIF an CD74 und zusätzlich an das Adhäsionsmolekül CD44 ist notwendig, um über Phosphorylierung zur Aktivierung der Src-Tyrosinkinase und somit zur Phosphorylierung der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) 1/2 zu führen, welche zur Untergruppe der MAPK gehört [58, 59]. ERK 1/2 reguliert Jab1 und p53

und nimmt dadurch Einfluss auf das Zellwachstum, die Apoptose und den Zellzyklus [59]. MIF spielt hierbei in der späten Phase der Aktivierung von ERK 1/2 nach oxidativem Stress eine Rolle [60]. ERK 1/2 aktiviert über Phosphorylierung beispielsweise die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2), dessen Produkt die Arachidonsäure darstellt, welche wiederum JNK aktiviert [59]. Somit scheint hier ein zweiter Weg zur Beeinflussung von JNK und somit der Apoptose zu existieren.

CXCR-Rezeptoren-vermittelte Inflammation

Rezeptorvermittelt spielt MIF auch in der Rekrutierung von Entzündungszellen während Inflamationsprozessen eine Rolle [61, 62]. Dabei ist eine wichtige Struktur des MIF das *N-like loop*, welches mit CXCR2 interagiert [62]. Vor allem die *core*-Region zwischen Aminosäure 46 und 57 ist hierbei entscheidend [62]. Über die MIF/CXCR2-Interaktion werden Leukozyten rekrutiert [62]. Als weiterer Rezeptor wird dabei CXCR4 diskutiert, durch den MIF als *noncognate*-Ligand sowohl für die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen als auch für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten sorgt [61]. Im Rahmen von Untersuchungen der Inflammation wurde auch eine Colokalisation von CD74 und CXCR2 nachgewiesen [61].

Wirkungen über den *Toll-like* Rezeptor 4

MIF wirkt auch über den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4), dessen Ausschaltung beim Herzen das *remodeling* vermindert und die ventrikulären Funktionen verbessert [63]. MIF führt über den TLR4 nach I/R zu einer vermehrten Apoptose und einer schlechteren Herzfunktion [63, 64].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass extrazelluläres MIF sowohl in apoptotischen als auch in inflammatorischen Vorgängen regulierend wirken kann [59, 61].

1.2.4 Die Rolle von MIF in Krankheitsprozessen

Dem Zytokin MIF konnten unterschiedliche Funktionen in diversen Krankheitsprozessen nachgewiesen werden [42].

Wie bereits beschrieben besitzt MIF inflammatorische Funktionen [61, 62]. So wurde zum Beispiel eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten durch chemotaktische Wirkung von MIF in der Lunge beobachtet [34]. MIF spielt auch in der Sepsis und myokardialen Dysfunktion eine Rolle [65]. Nachgewiesen ist dabei, dass MIF bei

Endotoxämie nach Stimulation durch LPS vermehrt durch die Hypophyse ausgeschüttet wird [30]. Die Gabe von Anti-MIF-Antikörpern kann vor Endotoxämie und somit potentiell auch vor Sepsis schützen [30]. Diese frühe Neutralisierung von MIF wirkt zusätzlich protektiv gegenüber myokardialer Dysfunktion, indem inflammatorische Prozesse und Apoptose über Reduzierung der mitochondrialen Cytochrom C-Ausschüttung vermindert werden [65].

MIF kommt zudem in Gefäßprozessen eine entscheidende Bedeutung zu. So wurde zum einen eine Korrelation der Größe eines Aneurysmas mit erhöhten MIF-Werten und zum anderen eine Interaktion zwischen MIF und Jab1 in diversen Stadien der Atherosklerose beschrieben [31, 66]. Weitere Arbeiten zeigten an Doppel-*knockout*-Mäusen, die sowohl MIF-defizient als auch *low-density*-Lipoproteinrezeptor-defizient sind, eine geringere Proliferation der Zellen an einer atherosklerotischen Läsion des Gefäßes und somit eine geringere Gefäßwanddicke [67]. Somit konnten artherosklerotische Veränderungen in MIF-defizienten Mäusen reduziert werden [67].

Die von MIF vermittelte Wirkung auf das Herz stellt sich wie folgt dar:

Der im Myokardinfarkt relevante ROS-Anstieg wurde in der Arbeit von Fukuzawa et al. durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) simuliert, was zu einem MIF-Konzentrationsanstieg sowohl im Zellkulturmedium als auch intrazellulär in den Kardiomyozyten führte [60]. Dabei stieg jedoch die MIF-Konzentration extrazellulär ab 90 Minuten nach H_2O_2 -Stimulation an, wohingegen die intrazelluläre MIF-Konzentration nach 90 Minuten sank, sodass nachweislich nach extrazellulär eine Sekretion stattgefunden haben muss [60]. Zudem zeigten Takahashi et al. 2001, dass die MIF-Konzentrationen sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter H_2O_2 -Stimulation im Zellkulturmedium zunahmen [68]: Sie wiesen nach, dass die mRNA-Expression von MIF nach H_2O_2 -Stimulation anstieg [68]. In dieser Arbeit konnten auch bei Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte MIF-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden [68].

Nach einem ST-Hebungsinfarkt steigt die MIF-Konzentration im Plasma schneller an als der im Klinikalltag verwendete Myokardinfarktmarker Troponin und korreliert zusätzlich mit der Größe des infarzierten Areals [69]. Chan et al. nahmen in ihrer Arbeit an, dass MIF aus dem Myokard stammt, da neben dem Anstieg im Plasma die MIF-Konzentration im Myokard absank [69]. Da MIF ein ubiquitär vorkommendes Protein ist, blieb dies in deren Arbeit eine Vermutung [31, 32, 69]. Somit könnte MIF auch als früher Marker eines ST-Hebungsinfarkts genutzt werden, mit dessen Hilfe zusätzlich

die Infarktgröße vorhergesagt werden könnte [69]. Zudem ist bekannt, dass MIF über AMPK die Glykolyse unter ischämischen Bedingungen steigert und darüber hinaus zu einem vermehrten Einbau von GLUT4 führt [47, 52, 53]. Somit kann MIF zusätzlich durch Beeinflussung des Energiestoffwechsels kardioprotektiv wirken [47].

MIF führt im Maus-I/R-Modell zu deutlich verkleinerten Infarktarealen, indem der ROS-Spiegel gesenkt wird [3]. Postischämisch wirkt MIF somit kardioprotektiv [3].

1.3 Die Beeinflussung der MIF-Produktion und -Sekretion

Sowohl die intrazelluläre MIF-Konzentration als auch die Sekretion von MIF können durch diverse Reize wie LPS, TNF- α und IFN- γ , aber auch durch Hypoxie oder H₂O₂ beeinflusst werden [33, 60, 68].

Im Alter nimmt die MIF-Proteinexpression ab [70]. Dabei wird vermutet, dass die geringere Produktion von MIF auf den geringeren Nachweis des MIF-stimulierenden Transkriptionsfaktors hypoxieinduzierbarer Faktor (HIF)-1 α zurückzuführen ist [70]. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Hypoxie vermehrt produziert wird und so die Transkription von MIF verstärkt [71]. Die Sekretion von MIF nimmt auch nach Ischämie in der Reperfusionsphase zu, ist jedoch im Vergleich bei den jüngeren Herzen insgesamt höher als bei den älteren [70].

Ferner konnte festgestellt werden, dass bei erhöhtem ROS-Spiegel, wie zum Beispiel H₂O₂, eine höhere MIF-Konzentration vorlag [60, 68]. H₂O₂ induziert dabei über Proteinkinase C und tyrosinkinaseabhängige Wege die Produktion von MIF [68]. In der Studie von Fukazawa et al. 2002 konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre MIF-Konzentration nach H₂O₂-Stimulation zunächst anstieg und dann nach 90 Minuten abfiel [60]. Von diesem Zeitpunkt an fand man jedoch eine erhöhte extrazelluläre MIF-Konzentration vor, sodass in diesem Zeitraum eine Sekretion stattgefunden haben musste [60]. Diese Studie lieferte auch Hinweise darauf, dass die MIF-Sekretion von der Proteinkinase C abhängt [60]. Außerdem konnte nach Hypoxie eine erhöhte MIF-Konzentration in Kardiomyozyten aufgezeigt werden [68].

Ohne eine hydrophobe N-terminale Signalsequenz für den Golgi-Apparat wird angenommen, dass MIF einen eigenen Sekretionsmechanismus besitzen muss [37, 38, 72]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MIF über den nichtklassischen Weg über sogenannte ABC-Transporter sekretiert wird [38]. Merk et al. stellten 2009 trotzdem eine Interaktion zwischen MIF und p115 fest [72]. p115 ist

eigentlich als ein mit dem Golgi-Apparat assoziiertes Protein für den Transfer vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat zuständig [73]. MIF wird jedoch nicht vom Golgi-Apparat abhängig sekretiert und geht seinen Weg auch nicht über das ER [38]. Dennoch konnten Merk et al. zeigen, dass genau diese Interaktion mit p115 die Sekretion von MIF beeinflusst [72]. Wird die Bindung dieser beiden Proteine inhibiert, wird weniger MIF sekretiert [72]. Dies scheint somit eine weitere Funktion von p115 aufzuzeigen [72].

Ein anderer Weg, über den die MIF-Sekretion moduliert wird, verläuft über das Jab1 [74, 75]. In diesen Untersuchungen bewirkte die Ausschaltung der Interaktion zwischen MIF und Jab1 eine stärkere Sekretion von MIF, wobei die intrazelluläre MIF-Konzentration nur marginal sank und dadurch der MIF-vermittelte autokrine Akt-Signalweg reguliert werden konnte [74, 75]. Auch stellten Lue et al. fest, dass die Interaktion zwischen MIF und Jab1 von dem vorhandenen MIF-Spiegel abhängt [74]. Somit spielt Jab1 im Zusammenhang mit MIF nicht nur im ERK 1/2-Signalweg und in der Hemmung der JNK-Aktivierung eine Rolle, sondern beeinflusst auch die MIF-Sekretion [43, 59, 74, 75].

1.4 Nitrit und Stickstoffmonoxid

1.4.1 Reduktion von Nitrit

Nitrit kann durch unterschiedliche Reaktionen zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert werden. So wird es über die azidische Disproportionierung zu salpetriger Säure umgewandelt, aus der dann NO und weitere Stickoxide entstehen können [76]. Diese Art der Reduzierung findet im Magen statt, da der dort herrschende pH-Wert von 2 hierfür die optimalen Bedingungen schafft. Diese Bildung von NO kann gastroprotektive Wirkungen unterstützen [77].

Ein weiterer Mechanismus, in dem als Nebenprodukt Nitrit zu NO reduziert werden kann, ist zum Beispiel das Enzym Xanthinoxidoreduktase, welches pH-, nitritkonzentrations- und anoxieabhängig ist [78]. Die Xanthinoxidase ist, wie bereits erwähnt, eigentlich für die Umwandlung von Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure verantwortlich [79]. Sie befindet sich im Intestinum und in der Leber, zudem wurde aber auch eine hohe Aktivität derselben in Endothelzellen nachgewiesen [79].

Des Weiteren wird Nitrit durch Hämproteine wie Hämoglobin und Myoglobin zu NO reduziert [80-84]. In der zugrunde liegenden Reaktion wird das Eisen ($\text{Fe}^{\text{II}+}$) des

desoxygenierten Myoglobins zu $\text{Fe}^{\text{III}+}$, also zu Metmyoglobin, reduziert [84]. Dabei wird das Nitrit vorübergehend an das Eisen gebunden und anschließend als NO wieder freigesetzt [82, 84]. Diese Freisetzung von NO wird durch das Desoxygenierungslevel von Myoglobin und der Nitritkonzentration verstärkt [84]. Ähnlich verhält es sich auch beim desoxygenierten Hämoglobin [81, 84]. Bezüglich der kardialen I/R wird aber gerade das desoxygenierte Myoglobin als wichtigste Quelle der Nitritreduktion zu NO angesehen [82].

1.4.2 Stickstoffmonoxid und S-Nitrosierung

Die NO-Synthese kann sich auf zwei verschiedenen Wegen vollziehen: auf dem NO-Synthase-abhängigen (NOS-abhängigen) und dem NO-Synthase-unabhängigen (NOS-unabhängigen) Weg. NOS katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu Citrullin, wobei als Nebenprodukt NO entsteht. NOS-unabhängig wird NO zum Beispiel, wie zuvor beschrieben, durch Hämproteine oder azidische Disproportionierung aus Nitrit synthetisiert [82].

Hendgen-Cotta et al. konnten 2008 zeigen, dass aus Nitrit generiertes NO die ROS-Produktion verringert, wodurch die Infarktgröße *in vivo* an Mäuseherzen um 61 % gesenkt werden konnte [82]. Nachweislich trägt NO auch dazu bei, die Akonitaseaktivität in Abhängigkeit von Myoglobin in der Reperfusion zu erhalten [82]. Außerdem ist NO ein wichtiges Radikal, das zum Beispiel zur S-Nitrosierung von verschiedenen Proteinen in diversen Spezies führt [85]. Dabei bedeutet S-Nitrosierung, dass NO mit einem reaktiven Cysteinthiol reagiert und S-Nitrosothiole (RSNOs) entstehen können [86]. Bei Hypoxie wird NO durch reaktive Sauerstoffspezies wie das Hyperoxid-Anion (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-), sodass anschließend RSNOs entstehen können [87]. Auch über die vorübergehende Bindung von NO an Eisen-Schwefel-Cluster oder an das zentrale Eisenatom der Hämproteine können anschließend RSNOs gebildet werden [82, 87-90]. Eine Transnitrosierung bezeichnet dabei die Übertragung von einem thiolgebundenen NO auf ein weiteres Thiol [91]. Diese Transnitrosierung hat wegen der Bildung der RSNOs für die Verteilung des NO-Pools eine wichtige Bedeutung [90].

Rassaf et al. konnten 2002 zeigen, dass eine Infusion mit NO über Umwandlung zu Nitrit zu einem Anstieg der RSNOs im Plasma führt [92]. Zudem konnte demonstriert werden, dass dieser Anstieg der RSNOs bei noch nicht erfolgter Separation des Plasmas von den Blutzellen weniger stark ausfiel [92]. Eine intravenöse Gabe von NO führte

dabei *in vivo* bei Menschen zu einer Vasodilatation [92]. Zudem wurde aus den Ergebnissen dieser Studie geschlossen, dass RSNOs eine Transportform von NO darstellen [92]. Die S-Nitrosierung kann aber auch Einfluss auf Proteinkomplexe haben und somit deren Funktionen beeinflussen. So zeigten Shiva et al. 2007, dass *in vivo* eine Nitritbehandlung zu S-Nitrosierung an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette führt [93]. Außerdem wurde in ihrer Studie festgestellt, dass Komplex II eine höhere Respirationsrate postanoxisch nach Nitritbehandlung aufwies und einen höheren Anteil an der ATP-Bildung zurückerlangte [93]. Dies stellte ein Zeichen für einen geringeren mitochondrialen Schaden dar [93]. Außerdem wurde gezeigt, dass Nitrit die Öffnung der mPTP und somit die Ausschüttung von Cytochrom C verhinderte, sodass Cytochrom C keine Apoptose induzieren konnte [93].

1.5 Das Zusammenwirken von Nitrit und MIF

In der Untersuchung des Zusammenwirkens von Nitrit und MIF konnte in der Arbeit von Lüdike et al. eine Modifikation an Cys81 durch Nitrit nachgewiesen werden [4]. Supplementiertes Nitrit wird dabei in einem reperfundierten Herz durch das desoxygenierte Myoglobin zu NO reduziert und bewirkt ausschließlich am Cys81 des MIFs eine posttranslationale S-Nitrosierung [4]. Durch diese Modifikation nimmt die Redoxaktivität von MIF zu, was auf eine Konformationsänderung schließen ließ [4]. Am Beispiel des Herzens resultiert also aus der S-Nitrosierung von MIF eine verstärkte kardioprotektive Wirkung, da die Infarktgröße nachweislich reduziert werden konnte [4].

Ramos et al. konnten 2014 zeigen, dass die Verabreichung von Nitrat, welches durch Bakterien im Mund zu Nitrit reduziert wird, zu einer verbesserten vaskulären Funktion führen kann [94-96]. Dabei wurden von dem u.a. auch proinflammatorisch wirkenden MIF geringere Plasmakonzentrationen unter Einnahme von Nitrat festgestellt [96].

Das weitere Zusammenwirken von Nitrit und MIF wird in dieser Arbeit untersucht.

2 Ziele dieser Arbeit

Bekannt ist, dass MIF durch seine Oxidoreduktasefunktion kardioprotektive Eigenschaften über die Reduktion des ROS-Spiegels mediert [40]. Ebenso wurde bereits gezeigt, dass die durch Nitrit vermittelte *S*-Nitrosierung von MIF zu einer Verstärkung dieser Funktion von MIF und somit zu einem verstärkten kardioprotektiven Effekt führt [4].

Es wäre möglich, dass die *S*-Nitrosierung von MIF durch eine verringerte Sekretion zu einer erhöhten intrazellulären MIF-Konzentration führt. Die durch die Akkumulation von MIF verstärkte Senkung des ROS-Spiegels könnte so eine verstärkte Protektion des Myokards bewirken, da die Oxidoreduktasefunktion dem intrazellulären MIF zugeschrieben wird. Nitrit würde somit über zwei Wege positiven Einfluss auf die kardioprotektiven Eigenschaften von MIF nehmen.

Da MIF aus unterschiedlichen Zellen ausgeschüttet werden kann und es bei einem *in vivo*-Modell nicht auszuschließen wäre, dass die veränderten Plasmakonzentrationen zum Beispiel durch die Hypophyse hervorgerufen worden wären, wird in dieser Arbeit der Ansatz eines *in vitro*-Modells als geeignet erachtet [30]. Als ein direkter Nachweis der Produktion und Sekretion von MIF werden dabei die *heart-like-1*-Zellen (HL1-Zellen) untersucht. Diese verwendeten HL1-Zellen stammen aus einem Tumor des Herzvorhofs und besitzen die gleichen Eigenschaften wie Kardiomyozyten [97]. Mithilfe des Hypoxie/Reoxygenierungs-Modells (H/R-Modells) soll in dieser Arbeit versucht werden, die beim Myokardinfarkt vorherrschende Ischämie und die durch die Intervention eingeleitete Reperfusion *in vitro* nachzubilden. Eine Ischämie *in vitro* zu erzeugen ist nicht möglich, da die Kardiomyozyten isoliert in Claycomb-Medium vorliegen und somit nicht über Blutgefäße mit Sauerstoff versorgt werden. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit eine Hypoxie des Mediums mittels Begasung mit 5 % CO₂/95 % Stickstoff in einer Hypoxiekammer induziert. So soll die Beeinflussung der Sekretion von MIF an Kardiomyozyten durch Applikation exogenen Nitrits im H/R-Modell genauer untersucht werden.

Zudem ist von Interesse, ob der zugrunde liegende Mechanismus der *S*-Nitrosierung, die Reduktion von Nitrit zu NO, auch in HL1-Zellen nachgewiesen werden kann und somit einen möglichen Weg zur Beeinflussung der Sekretion darstellt.

Zu untersuchen ist auch, ob in *in vivo*-Versuchen ein äquivalenter Nachweis der veränderten MIF-Konzentrationen durch Applikation exogenen Nitrits in einem Ischämie/Reperfusions (I/R)-Modell erzielt werden kann. Darüber hinaus wird in dieser

Arbeit der Einfluss von MIF und Nitrit auf die Infarktgröße und Proteinfunktionen *in vivo* untersucht, um so Rückschlüsse auf die Auswirkung der vermuteten erhöhten intrazellulären MIF-Konzentrationen nach Behandlung mit exogenem Nitrit ziehen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellart

Die *in vitro*-Versuche wurden an *heart-like-1*-Kardiomyozyten (HL1-Kardiomyozyten) durchgeführt. Diese waren ein freundliches Geschenk von Prof. Dr. W. C. Claycomb des *Health Sciences Centers* der *Louisiana State University School of Medicine* in New Orleans, Louisiana, USA. Die Versuche wurden zwischen den Passagen 56 und 70 durchgeführt.

3.1.2 Versuchstiere

Die *in vivo*-Experimente wurden durch meine Arbeitsgruppe an Mäusen des Stamms C57BL/6 mit männlichem Phänotyp durchgeführt. Die Wildtypmäuse (WT-Mäuse) wurden in der Uniklinik RWTH Aachen aufgezogen. Die männlichen MIF-*knockout*-Mäuse (Mif^{-/-}-Mäuse) wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf gehalten [35]. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere 12 ± 2 Wochen alt.

Das entsprechende Aktenzeichen lautet 8.87-50.10.35.08.348 LANUV.

3.1.3 Chemikalien, Lösungen, Gase

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Antifoam B Emulsion	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, D
Antioxidant	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Betaisodonna	Mundipharma, Limburg, D
BSA Stocklösung	Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA
Buprenorphin	Reckitt Benckiser, Heidelberg, D
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, D
CO ₂ 5 % / N ₂ 95 %	Linde, Düsseldorf, D
DC TM Protein Assay Reagenz A	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
DC TM Protein Assay Reagenz B	Bio-Rad Laboratories GmbH,

DC TM Protein Assay Reagenz S	München, D Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Ca ²⁺ -free and Mg ²⁺ -free)	PAA The cell culture company, Cölbe, D
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	VWR, Langenfeld, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Fibronectin (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Gelatin from bovine skin	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Heparin Natrium 25 000	Ratiopharm, Ulm, D
Isofluran (1,2 vol %) (Forene)	Abb Vie, Wiesbaden, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Jodine	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Kaliumjodid	Merck, Darmstadt, D
Ketamin (45 mg/kg) (Ketanest)	Pfizer, Berlin, D
L-Ascorbic Acid, Sodium Salt	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
LDS Sample Buffer (4x) NuPAGE	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamine, 200 mM	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
MES(20x) SDS Running Buffer NuPAGE	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, US
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natrium Chlorid 2M AnalAR Normapur	VWR, Langenfeld, D
Natriumchlorid 0,9 %	Braun, Melsungen, D
Natriumdeoxycholate	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt, D
N-Ethylmaleimide (NEM) (100mM) 34115	Merck, Darmstadt, D
Calbiochem	
Neutral Red Solution Accustain	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Nonylphenylpolyethylenglycol (NP40)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Norepinephrine ((±)-Arterenol)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D

O ₂ 100 %	Linde, Düsseldorf, D
Penicillin-Streptomycin (104 U/ml P und 104 µg/ml S)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Potassiumhexacyanoferrat (800 mM)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Quecksilber (Mercuricchloride)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Salzsäure (HCl) AVS Titrationorm	VWR, Langenfeld, D
Sample Reducing Agent (10x) NuPAGE	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, US
Sulfanilamid	Merck, Darmstadt, D
Super Signal West Femto-Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA
Super Signal West Pico-Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA
Transfer Buffer (20x) NuPAGE	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypanblue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)(0.05% trypsin in 0.02 % EDTA-Na)	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Tween 20	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Urethan	Sigma-Aldrich® , Taufkirchen, D
Xylazin (Rompun 10 mg/kg)	Bayer, Leverkusen, D

3.1.4 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Cell Culture Flasks 25 cm ² , Cell star, bio-one	VWR, Langenfeld, D
Cell Culture Flasks 75 cm ² , Cell star, bio-one	VWR, Langenfeld, D
Cryovials, 2 ml roundbottom	E&K Scientific, Santa Clara, USA
Dreiwegehahn	Braun, Melsungen, D
DynaMag – 2 Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

Freezingcontainer Nalgene	Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA
Injekt-F 1 ml	Braun, Melsungen, D
Millex-GP, 0,22 µm, Polyethersulfon, 33 mm, gamma-sterilisiert	Merck, Darmstadt, D
Mullkompressen steril	Hartmann, Heidenheim, D
Nahtmaterial: Seide 7.0 Prolene	Ethicon, Norderstedt, D
Petrischale, 15x60 mm, Greiner, bio-one	VWR, Langenfeld, D
Silikonschlauch	Reichert Chemietechnik, Heidelberg, D
<i>Six-Well</i> -Platte, Cell star, bio-one	VWR, Langenfeld, D
Spatel	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Thoraxspanner	Fine Science Tool, Heidelberg, D
Venenverweilkanüle 20 G	Braun, Melsungen, D

3.1.5 Marker, Membran, Gelart

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Magic-Marker XP Western Standard LC 5602	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Nitrocellulose Membrane, Filter Paper Sandwich 0,2 µm Pore Size	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel, 15 Well	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel 10 Well	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel, 15 Well	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
SeeBlue Plus2 Prestained Standard (1x) LC 5925	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.6 Antikörper

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller	Verdünnung
Anti-MIF, ab7207aus Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000

Anti-MIF, sc-20121aus Kaninchen, polyklonal	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg, D	1:1000
Anti- α -Tubulin, ab4074aus Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Anti- β -Aktin, ab8224aus Mäusen, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Produktname	Bezugsquelle/Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP Sekundär-AK, sc-2004	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg, D	1:5000
Ziege anti-Maus IgG-HRP Sekundär-AK, sc2005	Santa cruz Biotechnology, Heidelberg, D	1:5000

3.1.7 Rekombinante Proteine

Das rekombinante MIF war ein freundliches Geschenk von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen vom Lehrstuhl für Biochemie und molekulare Zellbiologie der Uniklinik RWTH Aachen.

3.1.8 Kits

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Akonitase Assay Kit Itemnr. 70552	Cayman Chemicals, Michigan, USA
Amplex® Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay Kit A22188	Life Technologies, Carlsbad, USA
MIF-Mouse ELISA Itemnr. E90698Mu	USCN Life Science inc., Houston, USA
Creatine Kinase, Muscle (CKM) ELISA Kit Produkt Nr. ABIN415530	Antikörper online, Aachen, D

3.1.9 Geräte

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Beatmungsgerät Inspira	Hugo-Sachs Elektronik, Havard Apparatus, March, D
Blutgasanalysator Rapid Lab 860	Siemens (Bayer), Leverkusen, D Mit freundlicher Unterstützung der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

CLD Analysator Typ CLD 88 NO	Ecophysics, Hürth, D
Electrocardiogram (ECG) Amplifier Module (ECGA)	Hugo-Sachs Elektronik, Havard Apparatus, March, D
Flow Laboratories BSB 6a	Gelaire, Sydney, AUS
Heizblock Test Tube Heater SHTD	Stuart Scientific, Stone, UK
homogen plus Homogenisator	Schütt-biotec, Göttingen, D
Hot Box System; Modular Incubator Chamber	Billups-Rothenberg, San Diego, USA
Illumination for Stereo Microscopy KL 1500 LCD	Schott, Jena, D
Image Quant 4000 Lumineszent Image Analyzer	GE Healthcare, München, D
Inkubator	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Electron, Thermo Fisher Scientific inc. , Waltham, USA
Magnetrührer Typ RCT	IKA®, Staufen, D
Mausventilator MiniVent	Hugo-Sachs Elektronik, Havard Apparatus, March, D
Micro Ventilator-03	UNO, Zevenaar, NL
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, D
Mikroskop MS5	Leica, Wetzlar, D
Millipore Milli-Q	Merck, Darmstadt, D
NO-Chemilumineszenz Analysator 88e	Ecophysics, Hürth, D
pH-Meter Lab 870	Schott, Jena, D
Photometer Fluorstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, D
Pipettboy Accurpette	VWR, Langenfeld, D
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
Power Pac 300/200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Rotator Typ Autonux 1	Bonz & Sohn GmbH, Lohnhof, D
Stickstofftank 35HC	Taylor Wharton, Husum, D
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, D
Vortexer M8 1	IKA®, Staufen, D
Wärmebad GFL	Gesellschaft für Labortechnik,

Wärmebad Typ 1012	Burgwedel, D Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D
X-Cell I Blot Module	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
X-Cell II Blot Module	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
X-Cell Sure Lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Zentrifuge Mikro 200R	Hettichzentrifugen, Tuttlingen, D
Zentrifuge Rotina 35R	Hettichzentrifugen, Tuttlingen, D

3.1.10 Software

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Graph Pad Prism 5	Graph Pad inc., San Diego, USA
Image J	Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, USA
Omega 3.00R2	BMG Labtech, Ortenberg, D
Omega Data Analysis Mars Data Analysis Software	BMG Labtech, Ortenberg, D
Origin 7	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Power Chrome 280	eDAQ, Sydney, AUS

3.2 Methoden – *in vitro*

3.2.1 Zellkultur

Die HL1-Zellen stammen aus einem Tumor des Herzvorhofs der Maus [97]. HL1-Zellen besitzen typische Charakteristika von embryonalen, atrialen Herzmuskelzellen [97]. Bei ihnen konnte kardiales Myosin, Desmin, Aktin und Connexin 43 nachgewiesen werden [97]. HL1-Zellen sind kontraktionsfähig und besitzen morphologisch, biochemisch und elektrophysiologisch kardiale Eigenschaften [97]. Wie nachfolgend beschrieben, erfolgte die Behandlung der HL1-Zellen gemäß des Protokolls von Prof. Dr. W. C. Claycomb, welcher die Kultivierung der HL1-Zellen etablierte [97].

Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden mit Claycomb-Medium, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 100 U/l Penicillin/Streptomycin, 0,1 mM Norepinephrin und 2 mM L-Glutamin supplementiert wurde (supplementiertes Claycomb-Medium), kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO₂ und 37°C im Wärmeschrank.

Splitten und Überführen auf Zellkulturflaschen

Nach 3 bis 4 Tagen waren die Zellen konfluent angewachsen, sodass sie unter sterilen Bedingungen 1:2 gesplittet werden konnten. Nach Entfernen des Mediums aus der konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurde diese zunächst mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde der Flaschenboden mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zuerst 1 min und anschließend erneut 2 min im Wärmeschrank behandelt. Nach Überprüfung der kompletten Ablösung der Zellen wurde zum Stoppen der Reaktion in gleicher Menge supplementiertes Claycomb-Medium hinzugefügt. Diese Suspension, in der die abgelösten Zellen enthalten waren, wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Flasche wurde mit supplementiertem Medium gewaschen, um die übrigen Zellen in das Zentrifugenröhrchen pipettieren zu können. Nach 5 min Zentrifugation bei 500×g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde in supplementiertem Claycomb-Medium aufgenommen.

Frische Zellkulturflaschen wurden für 1 h mit einer 0,02 % Gelatine / 0,5 % Fibronektin-Lösung bei 37°C beschichtet. Die Zellen konnten dann gleichmäßig auf die

vorbereiteten Zellkulturflaschen gesplittet werden, indem jeweils die gleiche Menge der in Claycomb-Medium aufgenommenen Zellen auf die neuen Flaschen überführt wurde.

Gleichmäßiges Aussäen auf *Six-Well*-Platten

Das Splitten auf *Six-Well*-Platten für die Versuche folgte dem gleichen Prinzip: Pro *Well* wurden 0,5 ml Gelatine / Fibronectin aufgetragen und nach mindestens 1 h Inkubation wurde die Platte nach vorsichtigem Absaugen mit supplementiertem Claycomb-Medium befüllt. Eine kleine Probe des im Medium aufgenommenen Zellpellets wurde im Verhältnis 1:4 mit Trypanblau angefärbt und die darin enthaltenen Zellen wurden unter dem Mikroskop mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach der folgenden Formel wurde die Zellkonzentration berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Zählquadrate}}$$

Daraufhin konnten $0,5 \times 10^6$ Zellen gleichmäßig in jedes *Well* ausgesät werden.

Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in gleicher Weise wie zuvor beschrieben von der Flasche abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde jedoch nun in 1,5 ml Einfriermedium – bestehend aus 95 % FBS und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) – aufgenommen. Dies wurde in ein *Cryovial* gefüllt und für mindestens 6 h bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurde das *Cryovial* für 1 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen in erwärmtes Claycomb-Medium aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei $500\times g$ wurde der Überstand abgesaugt. Daraufhin konnte das Zellpellet in supplementiertes Claycomb-Medium aufgenommen und anschließend in die vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt werden. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und mit frischem, supplementiertem Claycomb-Medium versorgt.

3.2.2 Hypoxiemodell

Die HL-1 Zellen werden nicht wie das Herz über Blut, sondern über das Claycomb-Medium mit Nährstoffen versorgt.

Um wie im Falle eines Herzinfarkts die durch Durchblutungsstörungen bedingte Ischämie nachzubilden, musste dem Zellkulturmedium Sauerstoff entzogen werden. Die Reperfusionsphase nach Wiedereröffnung des verschlossenen Herzgefäßes entspricht *in vitro* der Reoxygenierungsphase.

Die Hypoxie wurde dabei mithilfe einer Hypoxiekammer induziert, in der die zu untersuchenden Zellen und Medien in *Six-Well*-Platten oder Petrischalen auf einem Gittergestell platziert werden konnten.

Eine mit autoklaviertem Wasser befüllte Petrischale wurde auf den Boden der Hypoxiekammer gestellt, um dieselbe Luftfeuchtigkeit wie im Inkubator auch in der Hypoxiekammer zu gewährleisten und somit gleiche Bedingungen in der hypoxischen Gruppe wie in der normoxischen Kontrollgruppe zu schaffen. Die Kammer wurde durch eine große Stahlringklemme dicht verschlossen. Anschließend wurde die Kammer mit 20 l/min 5 % CO₂ / 95 % Stickstoff begast, womit die hypoxischen Bedingungen hergestellt wurden. Nach 5 min wurde zunächst der Ausfluss- und direkt danach der Zuflussschlauch des Gases durch eine Klemme verschlossen, um während des gesamten Versuchszeitraums eine konstante Hypoxie in der Kammer zu gewährleisten. Die Hypoxiekammer wurde anschließend im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Die Reoxygenierungsphase wurde im Inkubator bei 37°C unter Standardinkubationsbedingungen induziert, indem die Hypoxiekammer wieder eröffnet wurde.

3.2.3 Etablierung des H/R-Modells mittels Blutgasanalyse

Zunächst mussten die hypoxischen Bedingungen im Nährmedium der Zellen nach Begasung der Hypoxiekammer nachgewiesen werden.

Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben über einen Schlauch mit Kanüle und Dreiwegehahn entnommen. Dabei musste die Kammer während der laufenden hypoxischen Inkubation nicht geöffnet werden, sodass die Bedingungen in der Hypoxiekammer nicht durch die Probenentnahme beeinflusst wurden (vgl. Abb. 1D). Die Proben wurden vor Beginn der Hypoxie sowie 1 h, 3 h und 24 h nach Hypoxiebeginn entnommen (vgl. Abb. 1A). Dies wurde zum einen aus Petrischalen durchgeführt, die lediglich unsupplementiertes Claycomb-Medium enthielten; zum anderen wurde Medium auf dieselbe Art aus mit Zellen konfluent bewachsenen Petrischalen untersucht. Bei der Entnahme musste darauf geachtet werden, dass der Totraum des Schlauchs verworfen und die beim ersten Aufziehen entstehenden

Luftblasen mittels des Dreiwegehahns entfernt wurden, um Verfälschungen der Werte in der Blutgasanalyse zu verhindern.

Ergebnisse der Blutgasanalyse der Hypoxiekammeretablierung

Unter Hypoxie versteht man eine Senkung des Sauerstoffpartialdrucks unter den Normalwert. Im Menschen beträgt der normale arterielle Sauerstoffpartialdruck 65-100 mmHg, der pH-Wert liegt zwischen 7,35 und 7,45.

Bei der Etablierung der Hypoxiekammer konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffpartialdruck bei zellfreiem Medium schon nach 1 h sank (MW $\pm$ SD: 210,2 $\pm$ 24,3 vs. 78,7 $\pm$ 5,1 mmHg, n=2-3) und ab 3 h der gleiche Sauerstoffpartialdruck wie nach 24 h bestimmt werden konnte (MW $\pm$ SD: 50,5 $\pm$ 6,0 vs. 46,5 $\pm$ 6,9 mmHg, n=2-3) (vgl. Abb. 1B). Dabei zeigte der pH-Wert konstante Ergebnisse (MW $\pm$ SD: 7,3 $\pm$ 0,1 basal vs. 7,2 $\pm$ 0,0 nach 24 h, n=2-3) (vgl. Abb. 1B).

Im Vergleich hierzu wurde in zellbewachsenen Petrischalen schon nach 1 h ein gesenkter Sauerstoffpartialdruck gefunden (MW $\pm$ SD: 193,5 $\pm$ 11,5 mmHg vs. 48,2 $\pm$ 6,3 mmHg, n=3), welcher auch nach 24 h nachgewiesen werden konnte (MW $\pm$ SD: 47,1 $\pm$ 14,2 mmHg, n=3). Somit entspricht dieser Sauerstoffpartialdruck von 47,1 mmHg deutlich niedrigeren Werten und damit hypoxischen Bedingungen. Der pH-Wert fiel in Petrischalen mit Zellrasen ab (MW $\pm$ SD: basal 7,4 $\pm$ 0,1 vs. nach 24 h 6,9 $\pm$ 0,2, n=3) (vgl. Abb. 1C).

Beim Menschen betragen die Referenzwerte des Bikarbonats 22-26 mmol/l und der Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂) 32-45 mmHg.

Das Bikarbonat konnte ohne Zellen im Medium nicht beeinflusst werden (MW $\pm$ SD: basal 17,6 $\pm$ 4,9 vs. nach 24 h 17,9 $\pm$ 1,8 mmol/l, n=2-3). Der pCO₂ zeigte ohne Zellen eine Anstiegstendenz (MW $\pm$ SD: basal 36,9 $\pm$ 16,9 vs. nach 24 h 42,7 $\pm$ 4,3 mmHg, n=2-3) (vgl. Abb. 1E). Mit Zellen im Medium stieg der pCO₂ geringfügig an (MW $\pm$ SD: basal 34,1 $\pm$ 4,5 vs. nach 24 h 41,6 $\pm$ 7,0 mmHg, n=3) (vgl. Abb. 1F). Das Bikarbonat stieg mit Zellen im Medium anfänglich (MW $\pm$ SD: basal 14,4 $\pm$ 1,1 vs. nach 1 h 16,6 $\pm$ 0,2 mmol/l, n=3) und erreichte nach 24 h wieder niedrigere Werte (MW $\pm$ SD: 7,4 $\pm$ 2,1 mmol/l, n=3) (vgl. Abb. 1F).

Somit konnte gezeigt werden, dass durch diesen Versuchsaufbau hypoxische Bedingungen für die Kardiomyozyten geschaffen werden konnten.

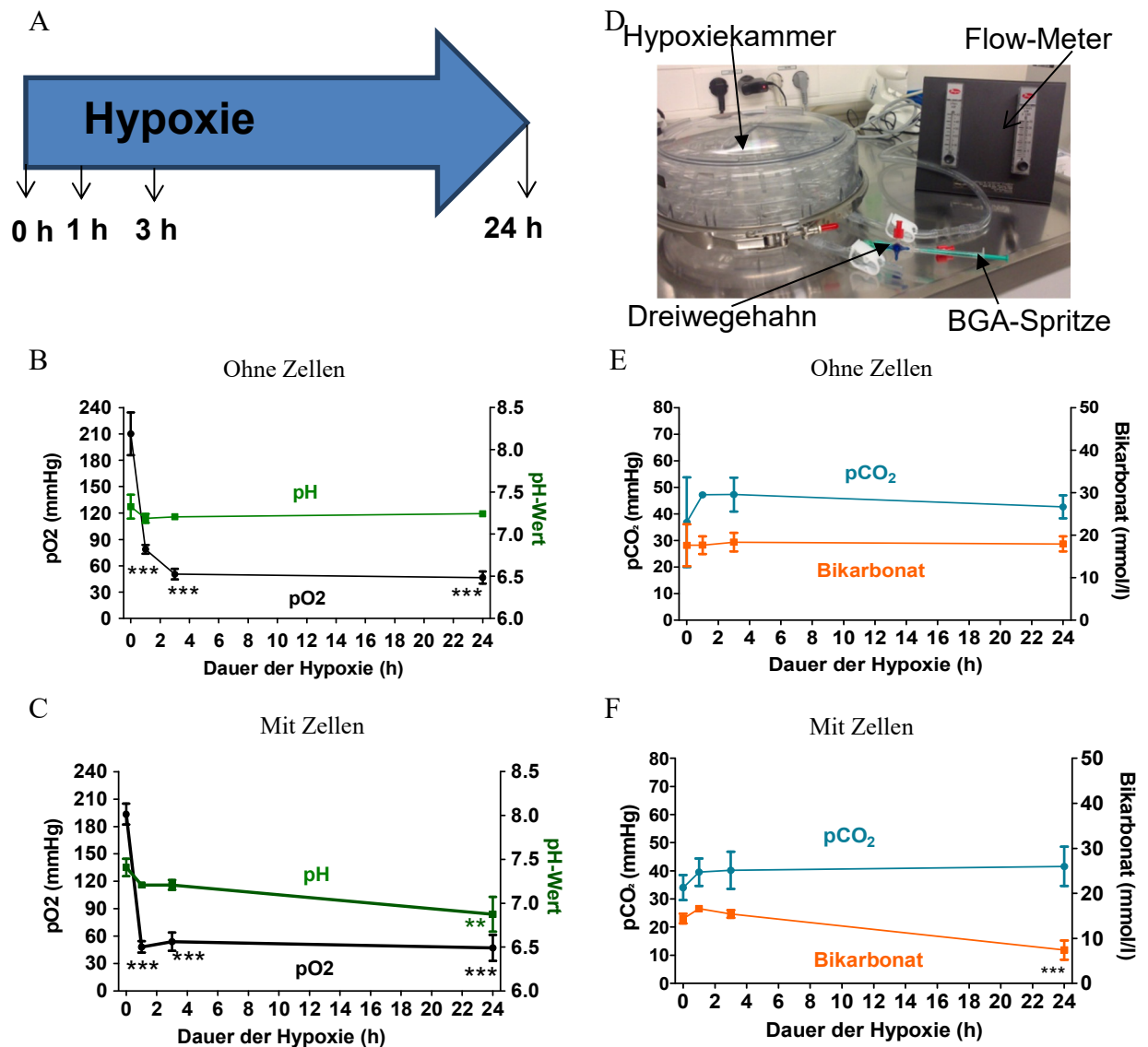


Abb. 1: Etablierung des Hypoxiemodells. (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) des Claycomb-Mediums sinkt im Verlauf der Hypoxie ab, während sich der pH-Wert nicht ändert (n=2-3, p<0.001, MW ± SD). (C) Das Medium mit HL1-Zellen zeigt während der Hypoxie sowohl ein Absinken des pO₂- als auch des pH-Wertes (n=3, **p<0.01, ***p<0.001, MW ± SD). (D) Aufnahme der Hypoxiekammer mit Abnahmesystem für die Blutgasanalysen. (E) Darstellung des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (pCO₂) und des Bikarbonats ohne Zellen während der Hypoxie, in deren Verlauf der pCO₂ ansteigt und das Bikarbonat konstant bleibt (n=2-3, p=n.s., MW ± SD). (F) Das Medium mit HL1-Zellen zeigt einen leichten Anstieg des pCO₂ und nach einem primären Anstieg ein Absinken des Bikarbonats im zeitlichen Verlauf der Hypoxie (n=3, ***p<0,001, MW ± SD).

3.2.4 Hypoxieversuche

Wie oben beschrieben wurden die Zellen für die Hypoxieversuche zur Probenentnahme auf *Six-Well*-Platten überführt. In drei *Wells* der *Six-Well*-Platten wurden je 1 ml

unsupplementiertes Medium pro *Well* als Kontrollgruppe und in weitere drei je 1 ml unsupplementiertes Medium mit einer finalen Nitritkonzentration von 50 μ M als Nitritgruppe pipettiert [82]. Die Hypoxiebedingungen wurden wie oben beschrieben induziert. Sowohl die mit *Six-Well*-Platten bestückte Hypoxiekammer als auch die *Six-Well*-Platten unter normoxischen Bedingungen wurden im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Beendigung der 12 h Hypoxie und zum Vergleich nach 12 h Normoxie begann die Probenentnahme [98]. Die Proben wurden direkt nach der Hypoxie (t1) sowie nach 1 h (t2) und nach 2 h (t3) Reoxygenierung entnommen (vgl. Abb. 2). Unter normoxischen Bedingungen wurden nach 12 h (t1), nach 13 h (t2) und nach 14 h (t3) Normoxie Proben gewonnen (vgl. Abb. 2).

Dabei wurden auch die Überstände der Kontroll- und der Nitritgruppe, jeweils sowohl die der normoxischen als auch die der hypoxischen Gruppe, zu den einzelnen Zeitpunkten abgenommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt.

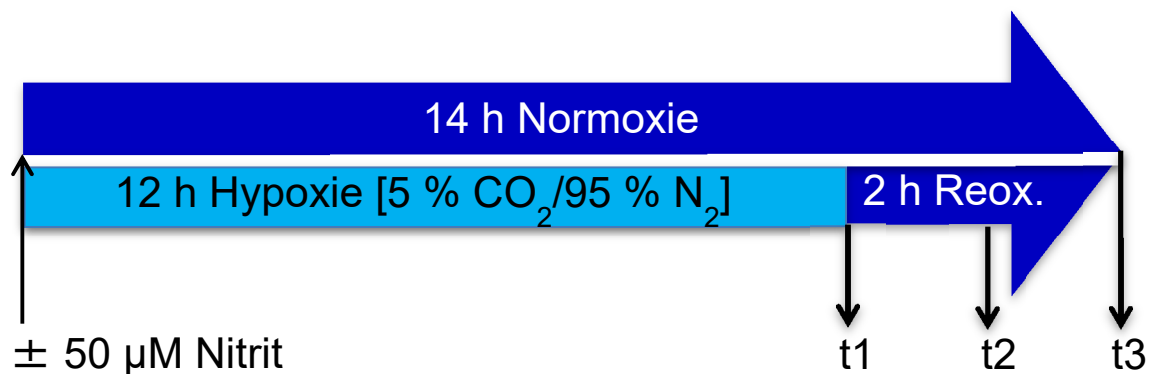


Abb. 2: Schematische Darstellung der Probenentnahme *in vitro*

Zellprobengewinnung

Um die Zellen von den *Six-Well*-Platten zu lösen, wurden sie, wie zuvor beschrieben, mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 500×g zentrifugiert. Für die MIF-Bestimmung mittels *Western Blot* wurden die Zellen in RIPA-Puffer (1 % NP40, 0,5 % Natriumdesoxycholate, 0,1 % SDS, 98,4 % PBS, 1:100 PPI) aufgenommen und 30-40 min bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße bei 4°C, 14.000 rpm 30 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei -20°C eingefroren.

3.2.5 Zellviabilität nach Hypoxie

Die Zellviabilität stellt den Anteil der Hypoxie überlebenden Zellen an der gesamten Zellpopulation dar. Um das Überleben der Zellen nach einem Hypoxieversuch zu untersuchen, wurden zunächst 400.000 Zellen/*Well* zu 80-90 % konfluent anwachsen gelassen. Dabei wurden jeweils drei *Wells* gleich behandelt. Einerseits wurde hierbei Medium mit Nitritendkonzentrationen von 1 mM, 100 μ M und 10 μ M und andererseits zur Kontrolle unsupplementiertes Medium verwendet. Die *Six-Well*-Platten wurden für 12 h in der Hypoxiekammer im Wärmeschrank inkubiert und anschließend für 1 h reoxygeniert.

3.2.5.1 Neutralrotmethode

Eine Methode zur Bestimmung des Überlebens von Zellen ist die Neutralrotmethode, bei der sich der Farbstoff Neutralrot in Lysosomen noch lebender Zellen einlagert [99]. Die Aufnahme erfolgt durch Endozytose des kationischen Farbstoffs und intralysosomaler Anlagerung an anionische lysosomale Membrananteile [99]. Durch die Ionenfalle – die Umwandlung des Neutralrots durch den sauren pH in Lysosomen zum Ion – kann Neutralrot das Lysosom nicht mehr verlassen und färbt dieses rot [99]. Tote Zellen besitzen keine funktionsfähigen Lysosomen mehr, sodass diese nicht angefärbt werden. Dadurch kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden und so die Zellviabilität bestimmt werden [99].

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1%ige, steril filtrierte Neutralrotgebrauchslösung verwendet. Diese wurde für 75 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach mindestens 1 h Lufttrocknung wurde die kalte Neutralrotextraktionslösung, bestehend aus 99 % Isopropanol und 1 % 1M Salzsäure, in die *Wells* pipettiert. Als *blank* (Leerwert) diente in Doppelbestimmung die Neutralrotextraktionslösung auf einer 96-*Well*-Platte. Die Proben aus den *Six-Well*-Platten wurden in Doppelbestimmung auf die 96-*Well*-Platte pipettiert und bei 540 nm im Photometer gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA Bonferroni-Post-hoc-Test* der Software *Graph Pad Prism*.

3.2.5.2 Kreatinkinase-enzyme-linked immunosorbent assay

Die Messung der Kreatinkinaseaktivität wurde mithilfe des Kreatinkinase-enzyme-linked immunosorbent assay (*ELISA*) mit Proben des Überstands nach Reoxygenierung gemäß des Protokolls des *Creatine Kinase, Muscle (CKM) ELISA Kits* durchgeführt. Die Kreatinkinase wird bei Untergang des Myokards aus den Zellen freigesetzt. In

dieser Arbeit dient die Konzentration der Kreatinkinase als ein weiterer Nachweis der Viabilität der Zellen, da bei stärkerem Zelluntergang auch erhöhte Kreatinkinasekonzentrationen gefunden werden können. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C. Die Proben und Standardlösungen wurden in den Wells der Mikrotitrierplatte aufgetragen. Nach 2 h konnte zunächst mit der Inkubation mit Detektionsreagenz A für 1 h und nach dreimaligem Waschen mit der Inkubation mit Detektionsreagenz B für 30 min fortgefahren werden. Anschließend erfolgte ein fünfmaliger Waschvorgang. Die Inkubation mit der Substratlösung wurde für 15-25 min durchgeführt. Nach Hinzufügen der Stopplösung konnte die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 440 nm detektiert werden. Die weitere statistische Auswertung erfolgte zum Vergleich der Kontrollgruppe und der mit exogenem Nitrit behandelten Gruppe mittels eines *unpaired T-Test*.

3.2.6 Western Blot

3.2.6.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellproben wurde der *Bio-Rad detergent compatible protein assay*, welcher eine modifizierte Methode nach Lowry darstellt, angewandt.

Eine Standardreihe wurde mit 2 mg/ml BSA und dem jeweiligen Puffer angefertigt. Die Standardreihe und Proben wurden in Dreifachbestimmung auf die 96-Well-Platte pipettiert. Gemäß des Protokolls wurde jeweils *Working-Reagenz A'* (aus 2 % Reagenz S und 98 % Reagenz A) und Reagenz B hinzugefügt. Nach 15 min lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen.

3.2.6.2 Probenaufbereitung für den Western Blot

Der Proteinbestimmung entsprechend wurde die gleiche Proteinmenge an Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, sodass eine Gesamtproteinmenge von 5,5-12 µg der Zellproben für den *Western Blot* verwendet werden konnte. Die unterschiedlichen Proteinmengen ergaben sich durch die mehrfachen Versuchsdurchgänge. Pro Versuchstag wurde dieselbe größtmögliche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen. Indem die Proteinbanden bei der späteren Auswertung auf den basalen Zeitpunkt des jeweiligen Versuchstages bezogen wurden, konnte die zeitliche Entwicklung der Proteinkonzentrationen trotz der unterschiedlichen Proteinmengen pro Ansatz

verglichen werden. Lithiumdodecylsulfat-Probenpuffer (LDS-Probenpuffer) wurde hinzugefügt, um unter denaturierenden Bedingungen Disulfidbrücken zu reduzieren und eine optimale Wirkung der Probenreduktionslösung (*sample reducing agent*) zu ermöglichen. Das *sample reducing agent* bewirkt durch das enthaltene Dithiothreitol, dass die Proteine bei der Gelelektrophorese weiterhin im reduzierten Zustand gehalten werden und dass dadurch eine genaue Auftrennung der Proteine gewährleistet werden kann. Nach 10 min Denaturierung bei 70°C wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Proben des Überstands wurden nach dem gleichen Prinzip aufbereitet. Dabei konnte lediglich eine Gesamtproteinmenge von 2,5-7 µg für den *Western Blot* eingesetzt werden, da im Überstand insgesamt nur geringe Proteinmengen nachgewiesen werden konnten. Hier wurden ebenfalls pro Versuchstag und *Western Blot* die gleichen Proteinmengen verwendet, um die spätere Konzentrationsentwicklung von MIF extrazellulär im Verlauf der Reperfusion nachvollziehen zu können.

3.2.6.3 Gelelektrophorese

Zur Proteinauftrennung wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli 1970 verwendet [100]. Dabei wurden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat denaturiert und über ein Netz aus Polyacrylamid mittels einer Spannung von 170 V aufgetrennt. Dazu wurde das *X-Cellsure-Lock* und 10%ige oder 12%ige *Bis-Tris-Gele* mit 10 oder 15 *Wells* verwendet.

Die Kammer wurde mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-*SDS running buffer* (MES-*SDS running buffer*) vorbereitet. Die innere Kammer, die von zwei Gelen begrenzt wurde, wurde mit Antioxidationsmittel versetzt. Jedes Well des Gels wurde zunächst gespült und anschließend je 10 µl der vorbereiteten Proben aufgetragen. Als Marker wurden *See Blue* und *Magic Marker* und zur Kontrolle rekombinantes MIF aufgetragen. Daraufhin erfolgte die Auftrennung bei 170 V für 60 min.

3.2.6.4 Blotting

Beim *Blotting* werden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies erfolgte in der *Blotting*-Kammer mithilfe des Transferpuffers, der aus 5 % Transferpuffer, 84,9 % Wasser, 10 % Methanol und 0,1 % Antioxidationsmittel bestand. Das Gel wurde mittels *Whatman*-Papieren und Schwämmen dicht auf die Nitrozellulosemembran geschichtet. Zum *Blotten* wurde die mit Transferpuffer gefüllte Kammer für 1 h an eine Spannung von 30 V angeschlossen.

3.2.6.5 Antikörperfärbung und Detektion

Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver, 5 % *Tris-Buffered Saline* (aus 200 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 2 mM Natriumchlorid) und 0,1 % *Tween 20* (TBS-T) auf dem Schüttler blockiert.

Über Nacht konnte anschließend die Membran mit MIF-Antikörper (1:1000) in 3 % BSA-Lösung bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Membran viermal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (1:1000), womit die Membran auf dieselbe Weise inkubiert wurde.

Die Membran wurde für 1 h mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (1:5000 in 3 % BSA) bei Raumtemperatur gefärbt. Daraufhin wurde erneut viermal mit TBS-T für je 10 min gewaschen.

Zur Detektion im *Image Quant* wurde das *Super Signal West Femto-Maximum Sensitivity Substrate* verwendet. Dies beruht auf dem Prinzip der Luminoloxidation durch das Enzym Meerrettichperoxidase des sekundären Antikörpers [101]. Dadurch wird Licht emittiert und kann so detektiert werden. Die Proteinbanden wurden mittels des Programms *ImageJ* vermessen. Die MIF-Banden der Zellproben wurden zur Auswertung auf die β -Aktin-Banden bezogen. β -Aktin stellt ein intrazelluläres Protein dar und ist somit unter physiologischen Bedingungen nicht extrazellulär zu finden. Bei der Bestimmung des extrazellulären MIF konnten deshalb die MIF-Banden nur auf das mit aufgetragene rekombinante MIF bezogen werden.

Die einzelnen Zeitpunkte wurden auf den ersten Entnahmezeitpunkt bezogen und die weitere statistische Auswertung erfolgte mittels *Graph Pad Prism* als *Two way-ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc*-Test.

3.2.7 Das Prinzip des Chemilumineszenzdetektors

Der reduktive Gasphasen-Chemilumineszenzdetektor (CLD) misst freies Stickstoffmonoxid (NO) über die Registrierung von Lichtquanten, die bei der Reaktion von NO mit Ozon freigesetzt werden [85]. In das durch Helium begaste Reaktionsgefäß wurden 40 ml Reduktionslösung injiziert [85]. Die Reduktionslösung bestand aus 45 mmol/l Kaliumjodid und 10 mmol/l Jod, welche zunächst für 15 min mithilfe eines Ultraschallbades in Millipore-Wasser aufgelöst und anschließend mit Essigsäure versetzt wurde [85]. Der untere Teil des Reaktionsgefäßes wurde mithilfe eines Wärmewasserbades auf 60°C erwärmt, der obere Teil mittels eines Kaltwasserbades auf

4°C gekühlt. Die durch die Reduktionslösung freigesetzten NO-Moleküle gelangten durch das Trägergas Helium zu einer Waschflasche, die mit 1 M Natriumhydroxidlösung gefüllt war, und wurden anschließend mittels Chemilumineszenz detektiert [85].

3.2.7.1 Nachweis der Nitritreduktion durch Kardiomyozyten

Die Fähigkeit von Kardiomyozyten, Nitrit zu NO zu reduzieren, wurde indirekt durch die Chemilumineszenzdetektion der NO-Konzentration mittels eines modifizierten Protokolls der CLD bestimmt.

Dazu wurde eine konfluent bewachsene T75 Flasche, wie oben beschrieben, trypsiniert und das Zellpellet in unsupplementiertem Medium aufgenommen.

Die Zellen wurden bei 37°C in das Reaktionsgefäß der CLD injiziert und mit Antifoam versetzt. Um hypoxische Bedingungen zu schaffen, wurde das Reaktionsgefäß für 15-20 min mit Argon begast. Anschließend wurde 100 µM Nitritlösung injiziert und 25 min mit der CLD detektiert (vgl. Abb. 3) [82]. Die Messung unter normoxischen Bedingungen erfolgte gleichermaßen, jedoch wurde hier ohne die Begasung mit Argon eine direkte Messung mittels CLD durchgeführt.

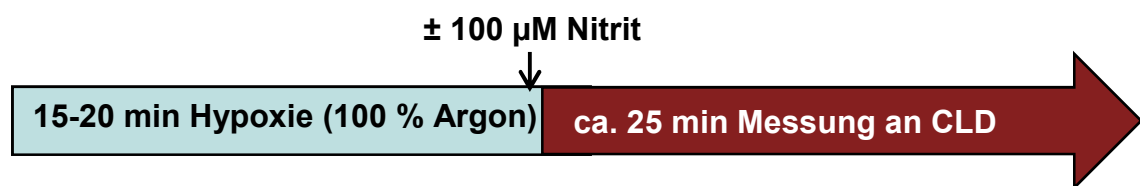


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs an der CLD

In 20 ml Reduktionslösung wurde eine Eichreihe gemessen, welche Konzentrationen zwischen 0 und 200 nM Natriumnitrit besaß. Das in PBS aufgelöste Natriumnitrit konnte mithilfe einer Hamilton-Spritze in das Reduktionsgefäß injiziert werden. Durch Dreifachbestimmung wurde aus den *area under the curve*-Werten (AUC-Werten) der Eichreihe mithilfe der *Power Chrome*-Software ein Graph erstellt. Die Steigung des Graphen diente der späteren Berechnung der NO-Produktion der Proben. Diese NO-Produktionswerte konnten auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen werden, welche mittels der oben beschriebenen Proteinbestimmung ermittelt wurde. Mittels des *unpaired T-Test* der Software *Graph Pad Prism* erfolgte die statistische Auswertung.

3.3 Methoden – *in vivo*

3.3.1 *in vivo*-Mausmodell

Um die *in vitro*-Versuche mit einem *in vivo*-Ansatz vergleichen zu können, wurden durch meine Arbeitsgruppe Mäuse gemäß des Protokolls zur myokardialen I/R operiert und die Herzproben mir zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden Wildtypmäuse (WT-Mäuse) des Stamms C57BL/6 im Alter von 12 ± 2 Wochen und mit einem mittleren Körpergewicht von 35 ± 9 g eingesetzt. Diese WT-Mäuse wurden in den weiteren Untersuchungen mit MIF-*knockout*-Mäusen (Mif^{-/-}-Mäusen) verglichen, denen das Exon 2, das Intron 2 und das Exon 3 des MIF-Gens entfernt wurden, sodass MIF-defiziente Mäuse entstanden. Diese MIF-defizienten Mäuse haben keinen veränderten Phänotyp und konnten somit im selben Alter von 12 ± 2 Wochen mit einem mittleren Körpergewicht von 32 ± 8 g für die weiteren Untersuchungen verwendet werden. Die Tiere wuchsen dafür in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf auf.

Zur Analgosedierung wurde den Mäusen 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin injiziert. Zur Relaxation wurden 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin verwendet, woraufhin eine orale Intubation durch eine Venenverweilkanüle erfolgte. Die Narkose wurde mit 33 % Sauerstoff / 2 % Isofluran bei 140 Atemzügen/min und 2 ml Atemzugvolumen während der Operation aufrechterhalten.

Nachdem die Haut mittels Betaisodona desinfiziert wurde, konnte der Thorax durch stumpfe Präparation der Pleura im vierten Interkostalraum und anschließend das Perikard nach Einbringung des Thoraxspanners eröffnet werden. Die so freigelegte linke Koronararterie wurde durch eine 7-0 Seide unterstochen. Die entstandene Schlaufe wurde durch einen Silikonschlauch unterlegt, sodass beim späteren Zuziehen des Knotens ein direkter Schaden des Gewebes verhindert werden konnte. Das Zuziehen des Knotens stellte den Beginn der Ischämiephase dar. Während der 30 min Ischämie wurde der Thorax provisorisch verschlossen und durch Bedeckung mit feuchter Gaze vor Austrocknung geschützt. Bei den mit exogenem Nitrit behandelten Herzen wurde 5 min vor dem Einleiten der Reperfusion 48 nmol Nitrit und bei den Kontrollherzen dasselbe Volumen an Natriumchloridlösung in den linken Ventrikel injiziert [4].

Die Reperfusionsphase begann nach Lockerung des Knotens. Für die Reperfusionszeit von 5 min wurde der Brustkorb nicht wieder verschlossen, sondern lediglich abgedeckt. Bei der Reperfusionszeit von 4 h wurde der Thorax über die drei Schichten Thorax,

Interkostalmuskulatur und Haut mit Nahtmaterial vernäht. Dann wurde die Narkose ausgeleitet und die Mäuse wurden extubiert. Die Versuchstiere wurden 10 min mit Raumluft beatmet. Zudem wurden 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin für die Analgesie verwendet.

3.3.2 Entnahme der Mäuseherzen

Um die Herzen der Mäuse näher analysieren zu können, wurden sie wie folgt entnommen: Durch eine Urethaninjektion von 1200 mg/kg Körpergewicht wurde die Maus in Narkose versetzt und durch 1000 IE/kg Körpergewicht Heparin antikoaguliert. Anschließend wurde sie durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Brustkorberöffnung konnte unterhalb des Sternums begonnen und nach axial durch Durchtrennung der Rippen fortgesetzt werden. Nach Abtrennung von Trachea, Aorta und Vena cava inferior und superior wurde das Herz mobilisiert. Unter mikroskopischer Kontrolle konnte das Herz von restlichen fremden Organanteilen, wie Thymus, Ösophagus, Lunge und Perikard, befreit werden. Die präparierten Herzen wurden anschließend sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3.3 Gewinnung der Mäuseherzproben

Die in Stickstoff gefrorenen Herzen wurden bei 4°C mittels des Schütt homogen-plus Homogenisators homogenisiert. Das Gewicht der Herzen wurde bestimmt und anschließend in Natriumchloridlösung im Verhältnis von 1:5 homogenisiert.

Dabei wurden die Herzen für die Untersuchung der kardialen MIF-Konzentrationen mittels *Western Blot* nach 5 min und 4 h Reperfusion entnommen (vgl. Abb. 4). Zur äquivalenten Bestimmung der MIF-Konzentration im Plasma wurde zu denselben Zeiten wie die Herzen auch das Plasma gewonnen.

Zur Bestimmung der Akonitaseaktivität und der H₂O₂-Produktion erfolgte die Probenentnahme der Herzen nach 5 min Reperfusion (vgl. Abb. 4).

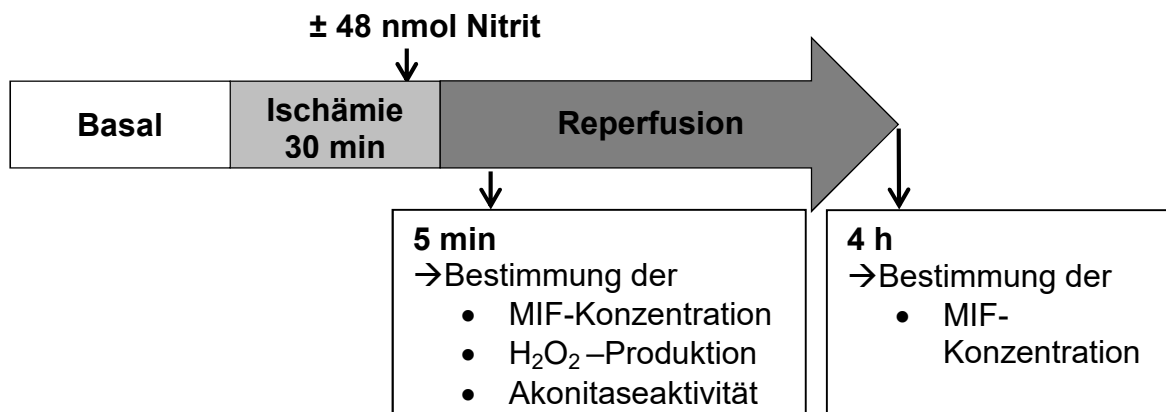


Abb. 4: Schematische Darstellung *in vivo*-I/R-Versuch

Die Herzlysate wurden, wie oben beschrieben, mittels *Western Blot* weiterverarbeitet. Dabei konnte eine Proteinmenge von 50 µg eingesetzt werden. Die MIF-Bande wurde dabei in Relation zur α -Tubulin-Bande (1:1000) gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc-Test* des *Software Graph Pad Prism*.

3.3.4 MIF-Maus-enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Bestimmung der MIF-Konzentrationen im Plasma wurde der MIF-Maus-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) mithilfe des Kits von *USCN Life Science Inc.* durchgeführt. Dafür wurde eine Standardreihe nach Protokoll zwischen 0 ng/ml und 10 ng/ml angefertigt. Die Proben und die Standardreihe wurden in Doppelbestimmung auf einer 96-Well-Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte luftdicht bei 37°C.

Anschließend wurden in die *Wells detection reagent A working solution* (50 % assay diluent A, 1 % detection reagent A) pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurde die aufgetragene Flüssigkeit verworfen. Die *Wells* wurden daraufhin dreimal mit einer 3,3%igen Waschlösung gewaschen. Die Flüssigkeit wurde anschließend sorgfältig entfernt und *detection reagent B* aufgetragen (50 % assay diluent B, 1 % detection reagent B). Nach 30 min luftdichter Inkubation bei 37°C wurde die 96-Well-Platte erneut fünfmal wie beschrieben gewaschen. Die Flüssigkeit wurde gründlich entfernt und Substratlösung in jedes *Well* pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 15 min unter ständiger Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit Stopplösung terminiert, sodass ein Farbumschlag von blau zu gelb erfolgte. Die

photometrische Messung erfolgte bei 450 nm, die weitere statistische Auswertung mittels der Durchführung eines *One way ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc*-Test mithilfe der Software *Graph Pad Prism*.

3.3.5 Troponinbestimmung

Zur Troponinbestimmung wurde den Mäusen unter Behandlung mit exogenem Nitrit und den Kontrollmäusen durch meine Arbeitsgruppe Blut aus der Arteria carotis entnommen. Nach einer Gerinnungsdauer von 30 min wurde das Serum nach zweifacher Zentrifugation bei $10,000\times g$ für 5 min bei 4°C gewonnen. Das Troponin wurde anschließend durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf als *high sensitive*-Troponin aus den Serumproben bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Graph Pad Prism* als *unpaired T-Test*.

3.3.6 Wasserstoffperoxidassay

Als Beispiel für gebildete ROS durch oxidativen Stress in Folge von I/R wurde die H_2O_2 -Konzentration bestimmt. Der H_2O_2 -Assay wurde nach dem *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*-Protokoll durchgeführt. Dem Assay liegt die Reaktion des *Amplex® Red Reagent* mit H_2O_2 von 1:1 zum rotfluoreszenten Oxidationsprodukt Resorufin zugrunde.

Dabei wurde eine Standardreihe von 0 bis 10 μM H_2O_2 verwendet. Die Proben wurden 1:5 verdünnt. Die Eichreihe und die Proben wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit der Reaktionslösung aus 32 % *Amplex® Red*-Stammlösung, 65 % Meerretichperoxidase und 3 % Reaktionspuffer inkubiert. Nach 30 min lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 560 nm im Photometer gemessen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Graph Pad Prism* als *One way ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc*-Test.

3.3.7 Akonitaseassay

Dieser Assay ermittelt die Aktivität des Enzyms Akonitase. Dieses ist sensitiv gegenüber oxidativem Stress, da sein typisches Eisen-Schwefel-Cluster durch ROS angegriffen und das Enzym dadurch inaktiviert werden kann [102-106].

Der Akonitaseassay wurde nach dem Protokoll des Akonitase-Kits von *Cayman Chemicals* durch meine Arbeitsgruppe durchgeführt. Das Herzhomogenat musste dafür zunächst bei $800\times g$ und bei 4°C zentrifugiert werden. Mithilfe der anschließenden

Proteinbestimmung konnten die Proteinkonzentrationen aller Proben auf 0,5 ng/ml verdünnt werden. Zu dieser verdünnten Probe wurden NADP-Reagenz, Isozitatdehydrogenase, Akonitasesubstratlösung und außerdem der Assaypuffer oder der Inhibitor gemäß dem Protokoll des verwendeten Kits hinzugefügt. Nachdem jedes *Well* auf diese Weise befüllt worden war, konnte die Messung der Absorption bei 37°C für 15 min einmal pro Minute bei 340 nm durchgeführt werden.

Die statistische Auswertung als *One way ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc-Test* wurde mittels *Graph Pad Prism* durchgeführt.

3.3.8 Bestimmung der Infarktgrößen

Die Infarktgrößenbestimmung wurde durch meine Arbeitsgruppe mithilfe zweier Färbungen aus *Evans Blue* und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC-Lösung) ermöglicht [82]. *Evans Blue* ist ein Farbstoff, der vitale Zellen blau einfärbt. Die TTC-Lösung dient der Rotfärbung des durch die Ischämie geschädigten Gewebes, denn nur die Zellen mit noch funktionsfähigen Mitochondrien reduzieren das farblose TTC zu dem rötlichen Formazan.

Dabei wurde eine 1%ige *Evans Blue*-Lösung über die Kanüle während erneuter Ligation der Koronararterie in die Aorta injiziert. Daraufhin wurde das Herz in Frischhaltefolie eingewickelt und bei -20°C für 1 h gefroren, um anschließend mithilfe einer Rasierklinge, an der Herzspitze beginnend, 1 mm dicke Querschnitte herzustellen. Hierbei wurden 5-7 Schnitte angefertigt und das Gewicht bestimmt.

In auf 37°C erwärmter 1%iger TTC-Lösung inkubierten die Herzschnitte für 5 min.

Durch diese Färbungen erscheint somit vitales Gewebe blau und ischämisch geschädigtes rot; infarziertes Gewebe blieb weiß.

Mithilfe der Software *Diskus* konnten die abfotografierten Herzschnitte videoplanimetrisch ausgewertet werden. Dabei wurde die rot gefärbte *area at risk* (AAR) auf die Fläche des linken Ventrikels (LV) bezogen und ein Produkt mit dem Gewicht des Schnittes (G) erstellt. Die Summe der einzelnen Produkte ergibt die komplette AAR (s. Formel).

Die exemplarische Formel zur AAR-Bestimmung lautet wie folgt:

$$\frac{I}{AAR} = \frac{\frac{I_1}{LV_1} \times G_1 + \frac{I_2}{LV_2} \times G_2 + \frac{I_3}{LV_3} \times G_3 + \frac{I_4}{LV_4} \times G_4 + \frac{I_5}{LV_5} \times G_5}{\frac{AAR_1}{LV_1} \times G_1 + \frac{AAR_2}{LV_2} \times G_2 + \frac{AAR_3}{LV_3} \times G_3 + \frac{AAR_4}{LV_4} \times G_4 + \frac{AAR_5}{LV_5} \times G_5} \times 100\%$$

Der statistischen Auswertung diente die *Graph Pad Prism*-Software *One way-ANOVA* mit *Bonferroni-Post-hoc*-Test.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro*

4.1.1 Nitritreduktion durch Kardiomyozyten

Zunächst wurde untersucht, ob Kardiomyozyten in der Lage sind, anorganisches Nitrit zu NO zu reduzieren. Eine solche NO-Entstehung könnte anschließend zu einer Modifikation von Proteinen und dadurch auch zu einer veränderten Sekretion von MIF führen.

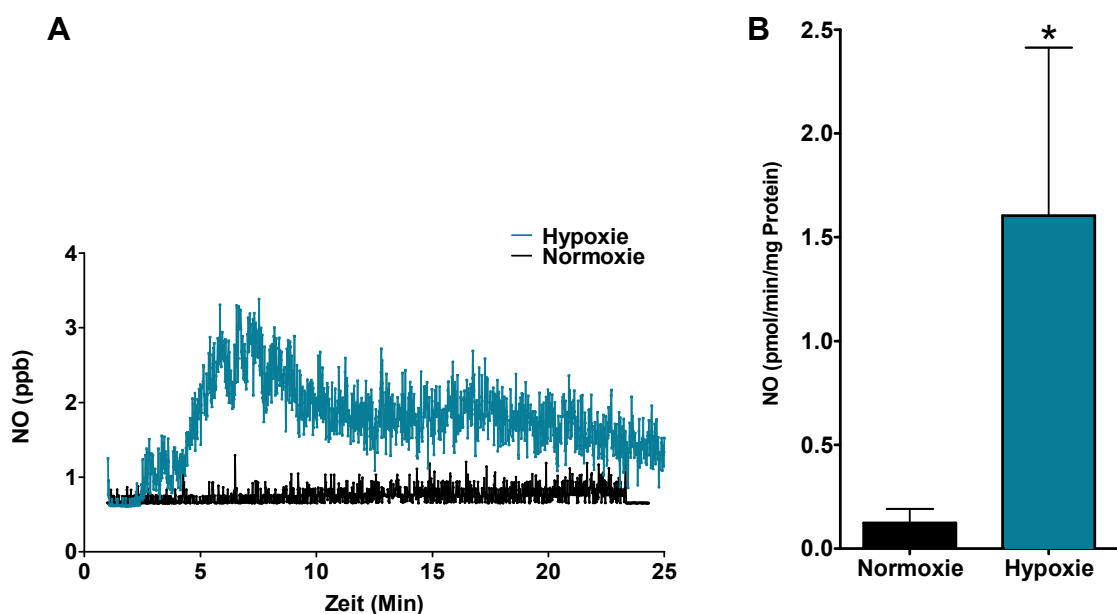


Abb. 5: Nitritreduktion durch Kardiomyozyten. (A) Exemplarisches Messergebnis. (B) Nur hypoxische Zellen reduzieren Nitrit zu NO (n=3, *p< 0,05, MW $\pm$ SD).

Dabei zeigte sich, dass Kardiomyozyten nur unter hypoxischen Bedingungen Nitrit reduzieren (vgl. Abb. 5A).

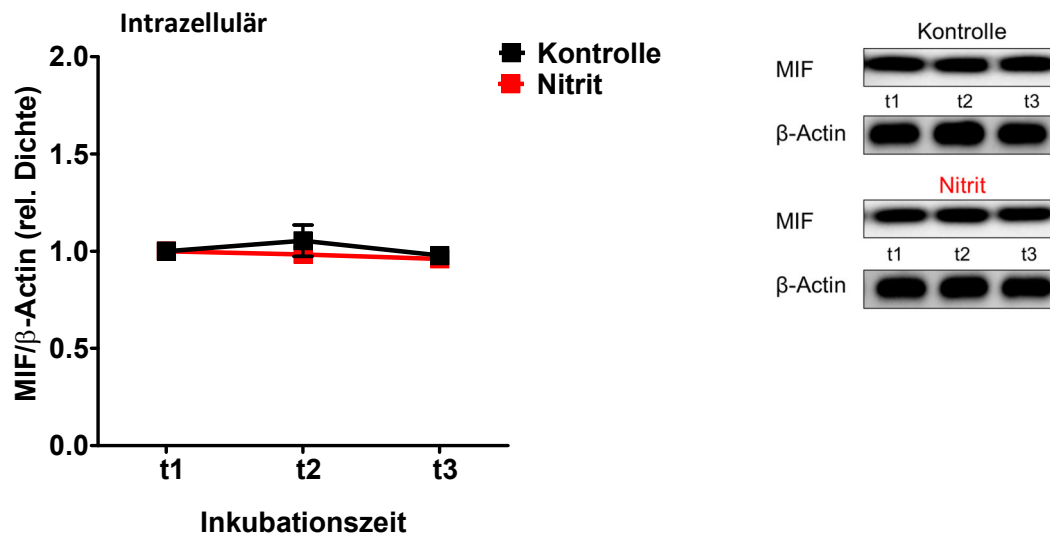
Kardiomyozyten unter normoxischer Inkubation wiesen mit $0,12 \pm 0,12$ pmol NO/min/mg Protein im Vergleich zu hypoxischen Kardiomyozyten mit $1,61 \pm 0,81$ pmol NO/min/mg Protein eine sehr geringe NO-Produktion auf (MW $\pm$ SD, n=3, p<0,05) (vgl. Abb. 5B).

In hypoxischen Kardiomyozyten stand somit NO durch die Reduktion von Nitrit und für eine mögliche S-Nitrosierung von MIF zur Verfügung.

4.1.2 Beeinflussung der MIF-Sekretion durch exogenes Nitrit

Anschließend wurde die Sekretion von MIF betrachtet: Es stellte sich die Frage, ob diese Sekretion durch eine Applikation exogenen Nitrits beeinflusst werden konnte. Dabei wurden die HL1-Zellproben nach dem Hypoxiemodell mittels *Western Blot* ausgewertet.

A



B

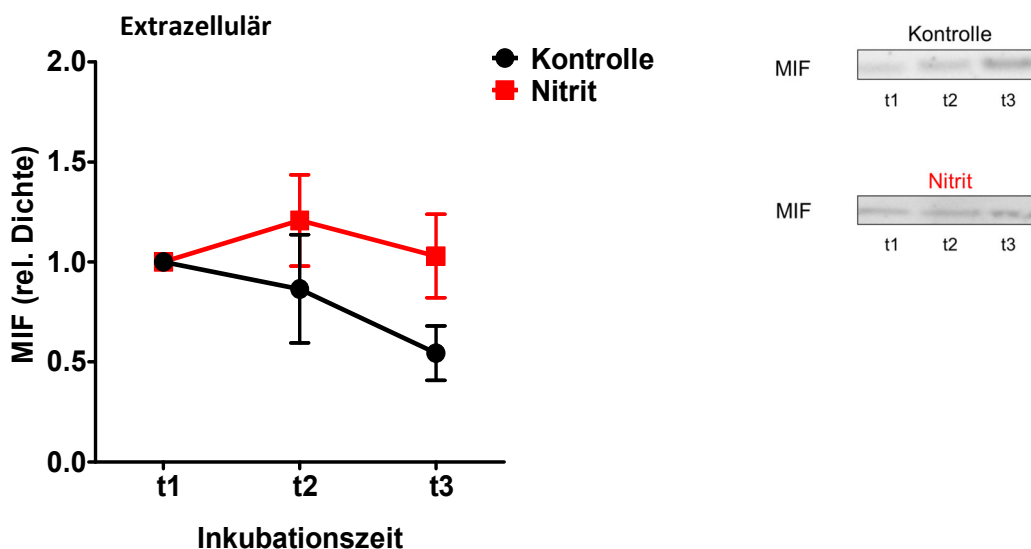
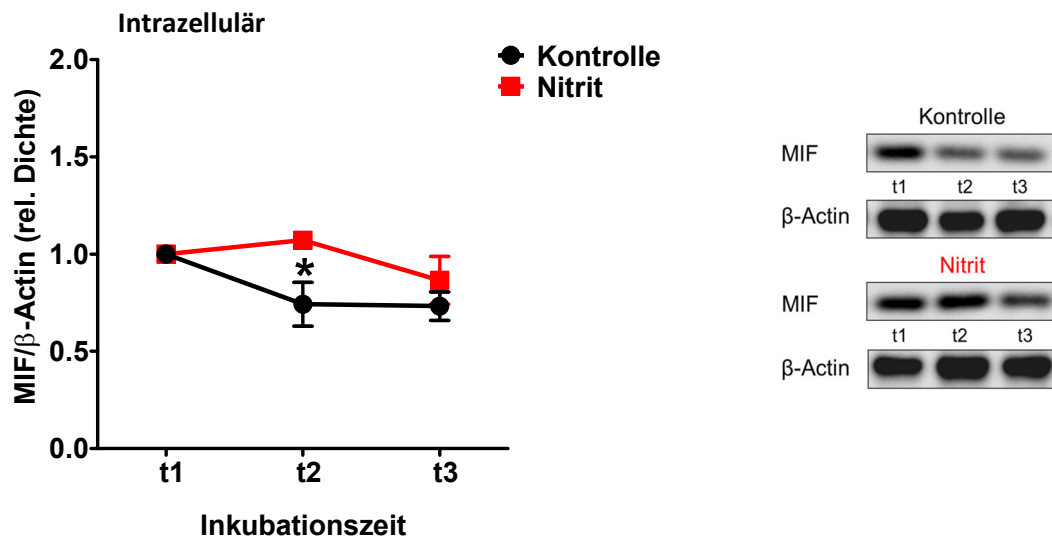


Abb. 6: Unter normoxischen Bedingungen findet keine Sekretion von MIF statt. Die MIF-Konzentrationen wurden nach 12 h (t1), 13 h (t2) und 14 h (t3) Normoxie bestimmt. (A) Intrazellulär zeigt sich im zeitlichen Verlauf keine Veränderung der MIF-Konzentration unter Normoxie (n=3-4, p=n.s., MW ± SEM). (B) In den Überstand wird unter normoxischen Bedingungen kein MIF sekretiert (n=3, p=n.s., MW ± SEM).

Im zeitlichen Verlauf blieb die MIF-Konzentration in der Kontrollgruppe der HL1-Zellen unter normoxischen Bedingungen konstant (MW $\pm$ SEM: t2: $1,05 \pm 0,08$ vs. t3: $0,98 \pm 0,05$ rel. Dichte, n=4, p=n.s.) (vgl. Abb. 6A). Während der Normoxie veränderte sich die MIF-Konzentration in den Kardiomyozyten auch unter Applikation exogenen Nitrits nicht (MW $\pm$ SEM: t2: $0,98 \pm 0,03$ vs. t3: $0,96 \pm 0,01$ rel. Dichte, n=3, p=n.s.) (vgl. Abb. 6A). Somit besteht kein Unterschied in der intrazellulären MIF-Konzentration zwischen der Kontrollgruppe und der mit exogenem Nitrit behandelten Gruppe (MW $\pm$ SEM: t2 Kontrolle: $1,05 \pm 0,08$ vs. t2 Nitrit: $0,98 \pm 0,03$ rel. Dichte, n=3-4, p=n.s.).

Extrazellulär blieb die MIF-Konzentration im Kontrollmedium auf gleichem Niveau (MW $\pm$ SEM: t2: $0,87 \pm 0,27$ vs. t3: $0,55 \pm 0,14$ rel. Dichte, n=3, p=n.s.) (vgl. Abb. 6B). Unter normoxischen Bedingungen veränderte sich die extrazelluläre MIF-Konzentration auch durch Applikation exogenen Nitrits ins Medium nicht (MW $\pm$ SEM: t2: $1,21 \pm 0,23$ vs. t3: $1,03 \pm 0,21$ rel. Dichte, n=3, p=n.s.) (vgl. Abb. 6B). Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe unter Behandlung mit exogenem Nitrit bestanden somit unter Normoxie keine unterschiedlichen extrazellulären MIF-Konzentrationen (MW $\pm$ SEM: t2 Kontrolle: $0,87 \pm 0,27$ vs. t2 Nitrit: $1,21 \pm 0,23$ rel. Dichte, n=3, p=n.s.) (vgl. Abb. 6B).

A



B

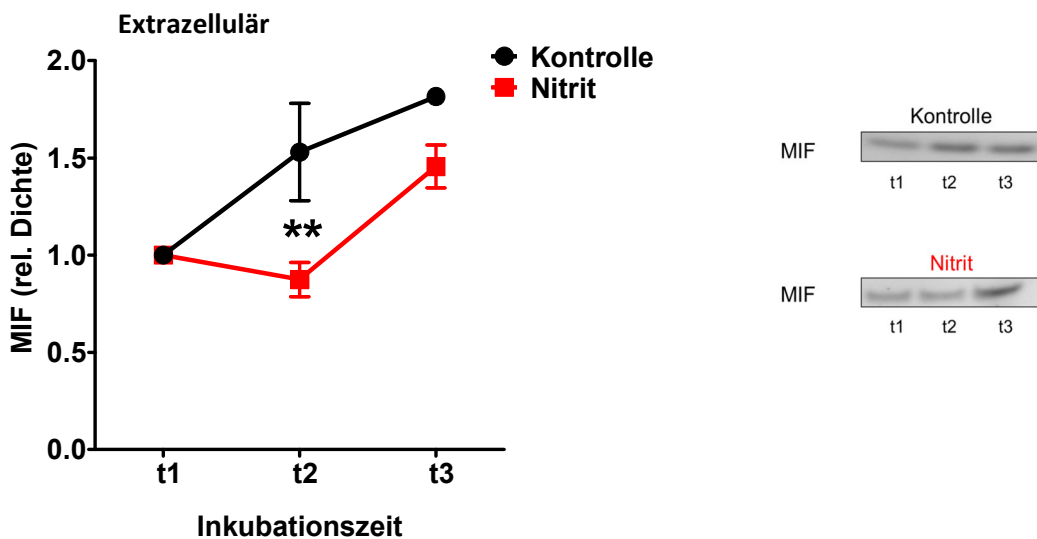


Abb. 7: Die Sekretion von MIF nach Hypoxie wird durch exogenes Nitrit in der frühen Phase der Reoxygenierung verzögert. Die MIF-Konzentrationen wurden direkt nach Hypoxie (t1) sowie nach 1 h (t2) und nach 2 h (t3) Reoxygenierung bestimmt. (A) Intrazellulär zeigt sich unter Behandlung mit exogenem Nitrit in der frühen Phase der Reoxygenierung eine höhere MIF-Konzentration (n=3, *p< 0,05, MW ± SEM). (B) Extrazellulär wird unter Kontrollbedingungen eine höhere MIF-Konzentration detektiert als in den Zellen, die mit exogenem Nitrit behandelt wurden (n=3, **p< 0,01, MW ± SEM).

Im Vergleich dazu wurde das Verhalten nach 12 h Hypoxie innerhalb der anschließenden Reoxygenierung von 2 h untersucht.

Intrazellulär blieben dabei die MIF-Konzentrationen unter Kontrollbedingungen und auch unter Behandlung mit exogenem Nitrit im Laufe der Reoxygenierungsphase konstant (MW $\pm$ SEM: Kontrolle: t2: $0,74 \pm 0,11$ vs. t3: $0,73 \pm 0,07$ rel. Dichte, Nitrit: t2: $1,07 \pm 0,03$ vs. t3: $0,87 \pm 0,12$ rel. Dichte, n=3, p=n.s.) (vgl. Abb. 7A). Im Vergleich der MIF-Konzentrationen der Kontrollgruppe zu der mit exogenem Nitrit behandelten Gruppe konnten jedoch intrazellulär unter Nitritbehandlung in der frühen Phase der Reoxygenierung höhere Werte nachgewiesen werden (MW $\pm$ SEM: t2 Nitrit: $1,07 \pm 0,03$ vs. t2 Kontrolle: $0,74 \pm 0,11$ rel. Dichte; n=3, p< 0,05) (vgl. Abb. 7A).

Die extrazellulären MIF-Konzentrationen zeigten unter Kontrollbedingungen in der frühen Phase der Reoxygenierung einen eindeutigen Anstieg (MW $\pm$ SEM: t1: $1,00 \pm 0,00$ vs. t2: $1,53 \pm 0,25$, n=3, p< 0,05) (vgl. Abb. 7B). In der mit exogenem Nitrit behandelten Gruppe stieg die extrazelluläre MIF-Konzentration erst in der späten Reoxygenierungsphase an (MW $\pm$ SEM: t2: $0,87 \pm 0,09$ vs. t3: $1,46 \pm 0,11$, n=3, p< 0,05) (vgl. Abb. 7B). Extrazellulär zeigte sich somit in der frühen Reoxygenierungsphase unter Nitritbehandlung eine geringere MIF-Konzentration als unter Kontrollbedingungen (MW $\pm$ SEM: t2 Nitrit: $0,87 \pm 0,09$ vs. t2 Kontrolle: $1,53 \pm 0,25$ rel. Dichte, n=3, p< 0,01) (vgl. Abb. 7B).

Somit wurde nach Applikation exogenen Nitrits die MIF-Sekretion in den Überstand verzögert und in der frühen Reoxygenierungsphase vermehrt MIF intrazellulär nachgewiesen.

4.1.3 Effekt von Nitrit auf die Viabilität von Kardiomyozyten

4.1.3.1 Neutralrotmethode

Das mittels Neutralrotmethode ermittelte Überleben (Viabilität) der Kardiomyozyten nach 12 h Hypoxie und 1 h Reperfusion zeigte keine Beeinflussung durch unterschiedliche Nitritbehandlungen (MW $\pm$ SD: Kontrolle 100% vs. Nitrit (100 μ M) $98,88 \pm 5,75\%$, n=5, p=n.s.) (vgl. Abb. 8). Dies verifiziert, dass die ermittelten MIF-Konzentrationen nicht durch verminderten Zelluntergang bedingt waren. Somit stammen die extrazellulären MIF-Konzentrationen aus der Sekretion der Kardiomyozyten und nicht aus zerstörten Zellen.

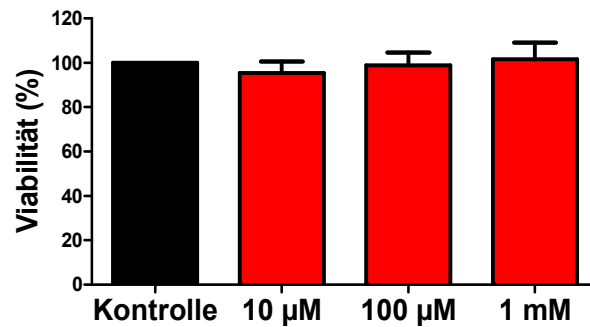


Abb. 8: Die *Viabilität* der Kardiomyozyten wird nach 1 h Reperfusion nicht durch exogenes Nitrit unterschiedlicher Konzentrationen beeinflusst (n=5, p=n.s., MW ± SD).

4.1.3.2 Kreatinkinase-enzyme-linked immunosorbent assay

In der Bestimmung der Kreatinkinasekonzentration im Überstand der während der Reoxygenierungsphase *in vitro* gewonnenen Proben konnte demonstriert werden, dass sowohl die Kontrollgruppe als auch die mit exogenem Nitrit behandelte Gruppe eine gleich hohe Konzentration an Kreatinkinase aufwiesen (MW ± SD: Kontrolle $3,38 \pm 0,43$ ng/ml vs. Nitrit $3,15 \pm 0,37$ ng/ml, n=7, p=n.s.) (vgl. Abb. 9). Mit dieser Messung konnte somit zusätzlich gezeigt werden, dass die oben beschriebene MIF-Konzentrationsbestimmung mittels *Western Blot* keiner Beeinflussung durch unterschiedliches Überleben der Zellen unterlag.

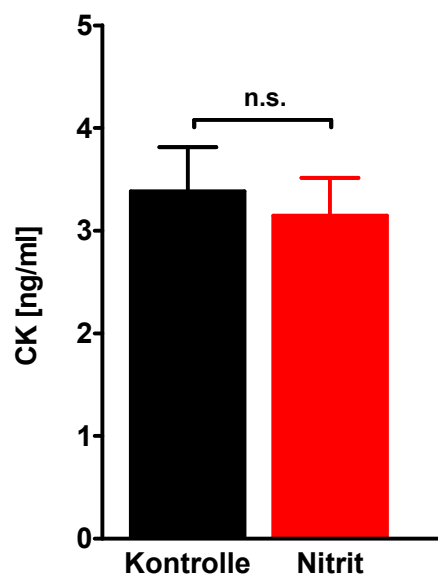


Abb. 9: Die Kreatinkinasekonzentration (CK) im Überstand zeigt keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit exogenem Nitrit behandelten Kardiomyozyten (n=7, p=n.s., MW ± SD).

4.2 *In vivo*

4.2.1 Beeinflussung der MIF-Sekretion durch Nitrit

Nachdem in der Zellkultur der zeitliche MIF-Konzentrationsverlauf gezeigt wurde, war von Interesse, wie sich dieser im Tierversuch darstellte und durch exogenes Nitrit beeinflusst werden konnte.

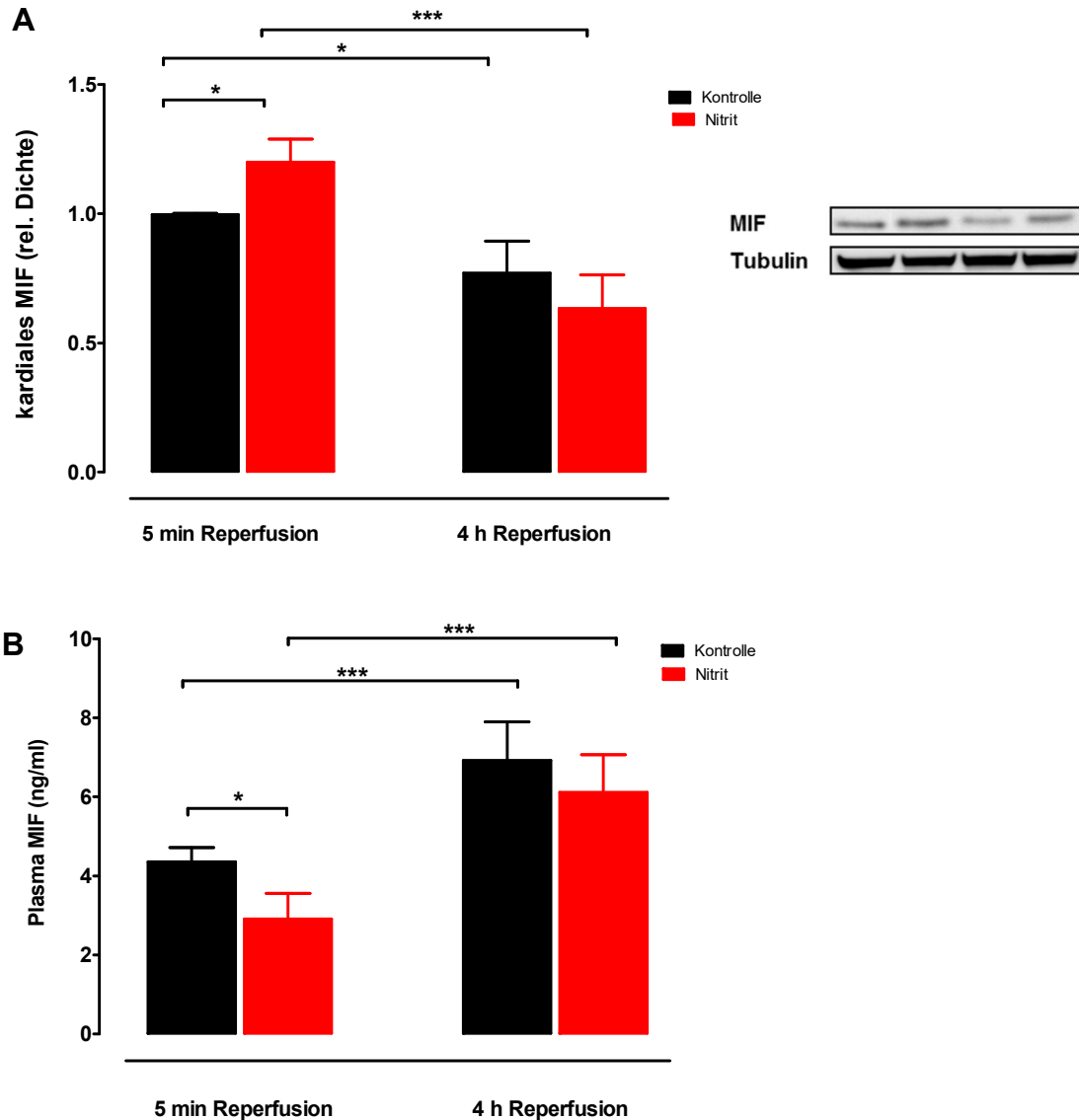


Abb. 10 Im I/R-*in vivo*-Modell zeigt sich unter Behandlung mit exogenem Nitrit eine erhöhte intrazelluläre und verminderte extrazelluläre MIF-Konzentration in der frühen Phase der Reperfusion. (A) Die mittels *Western Blot* bestimmte MIF-Konzentration im Herzen steigt nach exogener Nitritgabe an, während nach längerer Reperusionsphase kein Unterschied sichtbar ist (n=5-6, *p<0.05, ***p<0.001, MW ± SD). (B) Gleichzeitig ist die durch den MIF-Maus-*ELISA* photometrisch ermittelte MIF-Konzentration im Plasma in der frühen Reperusionsphase verringert (n=5-6, *p<0.05, ***p<0.001, MW ± SD).

Die kardiale MIF-Konzentration zeigte nach 5 min Reperfusion mit exogenem Nitrit höhere Werte als die Kontrolle ohne Nitrit (MW $\pm$ SD: $1,20 \pm 0,09$ vs. $1,00 \pm 0,01$ rel. Dichte, $n=6$, $p<0,05$) (vgl. Abb. 10A). Im zeitlichen Verlauf sank die MIF-Konzentration unter Kontrollbedingungen auf $0,77 \pm 0,12$ relative Dichte ab ($n=5$, $p<0,05$). Bei mit exogenem Nitrit behandelten Herzen fiel die MIF-Konzentration nach 4 h noch stärker auf Werte von $0,63 \pm 0,13$ relative Dichte ab (MW $\pm$ SD, $n=5$, $p<0,001$) (vgl. Abb. 10A).

Im Plasma zeigte sich nach 5 min Reperfusion in der Kontrolle eine höhere MIF-Konzentration als bei den mit exogenem Nitrit behandelten Herzen (MW $\pm$ SD: $4,36 \pm 0,36$ vs. $2,91 \pm 0,65$ rel. Dichte, $n=5-6$, $p<0,05$) (vgl. Abb. 9B). In der Spätphase der Reperfusion stieg sowohl unter Kontrollbedingungen (MW $\pm$ SD: $6,92 \pm 0,98$ rel. Dichte, $n=4$, $p<0,001$) als auch bei den mit exogenem Nitrit behandelten Herzen die MIF-Plasmakonzentration stark an (MW $\pm$ SD: $6,12 \pm 0,95$ rel. Dichte, $n=6$, $p<0,001$) (vgl. Abb. 10B).

Somit verringerte exogenes Nitrit die MIF-Sekretion in der frühen Phase der Reperfusion *in vivo* und erhöhte dadurch die intrazelluläre Konzentration. In der Spätphase wies exogenes Nitrit keinen Einfluss auf die MIF-Sekretion auf.

4.2.2 Effekt von Nitrit auf den Herzmuskel mittels Troponinbestimmung

Troponin diene als Nachweis für einen Herzmuskelschaden und somit als Äquivalent zur Neutralrotmethode und zum Kreatinkinase-*ELISA in vitro*. Hier zeigte sich, dass in der Bestimmung des hochsensitiven Troponins zwischen der Kontrolle mit $285,2 \pm 55,34$ ng/l und zwischen den mit exogenem Nitrit behandelten Herzen mit $297,6 \pm 48,88$ ng/l kein Unterschied bestand (MW $\pm$ SD, $n=5$, $p=n.s.$) (vgl.

Abb. 11). Dies verifiziert, dass die zuvor beschriebenen MIF-Konzentrationen verglichen werden können, da der Unterschied in den Konzentrationen nicht durch unterschiedliches Überleben der Herzmuskelzellen entstanden ist.

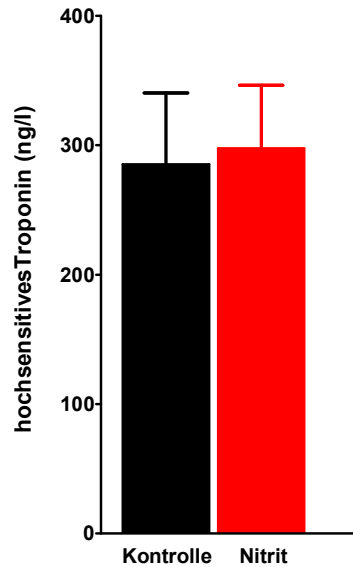


Abb. 11: In der Troponinbestimmung zeigt sich kein Unterschied zwischen Behandlung mit exogenem Nitrit und Kontrolle (n=5, p=n.s., MW $\pm$ SD).

4.2.3 Kardioprotektive Funktionen von MIF durch Beeinflussung der intrazellulären Signalwege

Da somit Konzentrationsänderungen von MIF, die durch die Applikation exogenen Nitrits entstanden sind, sowohl intrazellulär/kardial als auch extrazellulär/im Plasma gefunden wurden, wurden daraufhin die Auswirkungen der erhöhten intrazellulären Verfügbarkeit von MIF auf die durch MIF vermittelten Funktionen untersucht. Außerdem stellt die für diese Arbeit wichtigste Funktion intrazellulären MIFs die Reduktion von in der Reperfusion/Reoxygenierung vermehrt anfallenden ROS durch die Oxidoreduktasefunktion dar. Deswegen wurden die H_2O_2 -Konzentration und die Akonitaseaktivität in den Zellen als Parameter näher untersucht.

4.2.3.1 Untersuchung der Konzentration von Wasserstoffperoxid

Nach 5 min Reperfusion lag bei den WT-Mäuseherzen eine H_2O_2 -Konzentration von $1,00 \pm 0,20 \mu\text{M}/\text{mg}$ Protein vor (MW $\pm$ SD, n=8) (vgl. Abb. 12). Im Vergleich dazu war die H_2O_2 -Konzentration durch Applikation exogenen Nitrits mit $0,65 \pm 0,14 \mu\text{M}/\text{mg}$ Protein deutlich niedriger (MW $\pm$ SD, n=8, $p < 0,01$) (vgl. Abb. 12). Somit kann durch Nitrit eine Senkung des ROS-Spiegels am Beispiel der H_2O_2 -Konzentration nach I/R erreicht werden.

Bei den $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäuseherzen lag kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der mit exogenem Nitrit behandelten Gruppe vor (MW $\pm$ SD: $1,10 \pm 0,19$ vs. $1,14 \pm 0,23$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ Protein, $n=5-7$, $p=\text{n.s.}$) (vgl. Abb. 12). Wenn das Mäuseherz MIF-defizient ist, scheint exogenes Nitrit somit keinen positiven Effekt auf den ROS-Spiegel zu besitzen. Beim Vergleich der mit exogenem Nitrit behandelten Herzen war bei den WT-Mäuseherzen eine niedrigere H_2O_2 Konzentration vorhanden als bei den $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäuseherzen (MW $\pm$ SD: $0,65 \pm 0,15$ vs. $1,14 \pm 0,23$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein, $n=7-8$, $p<0,001$) (vgl. Abb. 12).

Zusammenfassend kann MIF also mithilfe der Applikation exogenen Nitrits die H_2O_2 -Konzentration reduzieren. Dies stellt einen positiven Effekt dar, da das ROS angehörige H_2O_2 durch Oxidation schädigend auf Proteine wirken kann. MIF oder exogenes Nitrit allein zeigen diese Senkung der H_2O_2 -Konzentration jedoch nicht. Somit scheint hier ein wichtiges Zusammenspiel zwischen exogenem Nitrit und MIF vorzuliegen. MIF wird durch Behandlung mit exogenem Nitrit vermehrt intrazellulär gehalten und erst verzögert sekretiert, sodass der ROS-Spiegel – wie hier am Beispiel von H_2O_2 gezeigt – gesenkt werden konnte.

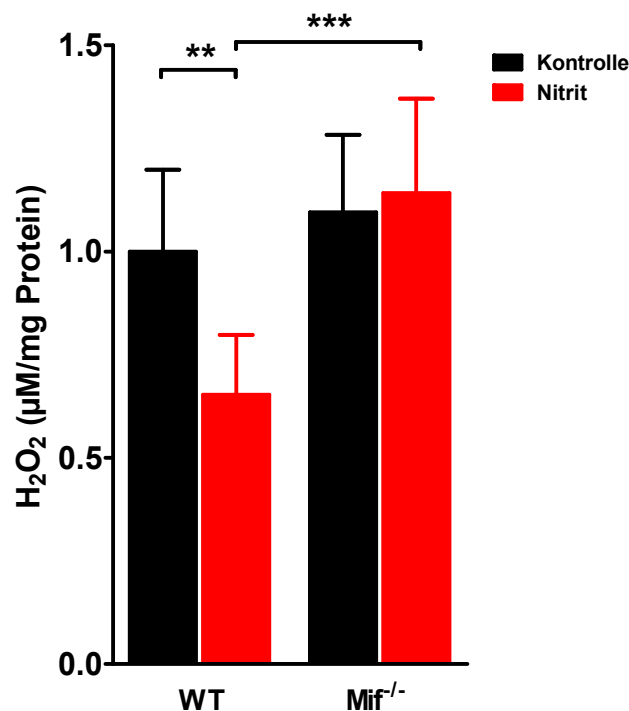


Abb. 12: Die Konzentration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird durch MIF und exogenes Nitrit reduziert. Die H_2O_2 -Konzentrationen sind bei MIF-*knockout*-Mäusen ($\text{Mif}^{-/-}$ -Mäusen) erhöht. Auch unter Behandlung mit exogenem Nitrit liegen bei $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäusen erhöhte H_2O_2 -Werte vor. Bei den Wildtypmäusen (WT-Mäusen) liegen vor allem unter Applikation exogenen Nitrits reduzierte H_2O_2 -Konzentrationen vor ($n=5-8$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, MW $\pm$ SD).

4.2.3.2 Proteinoxidation am Beispiel der Aконitaseaktivität

Die Aконitaseaktivität wurde exemplarisch untersucht, da sie als Marker für durch ROS-geschädigte Proteine gilt.

Bei den WT-Mäuseherzen lag die Aконitaseaktivität in der Frühphase der Reperfusion bei $18,95 \pm 5,51$ mU/mg Protein (MW $\pm$ SD, n=7) (vgl. Abb. 13). Durch Applikation exogenen Nitrits war die Aktivität der Aконitase mit $36,79 \pm 13,42$ mU/mg Protein weniger reduziert (MW $\pm$ SD, n=5; $p < 0,001$) (vgl. Abb. 13). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der H₂O₂-Konzentrationen und zeigt somit, dass eine Behandlung mit exogenem Nitrit bei funktionsfähigem MIF zum Funktionserhalt der Proteine, wie hier der Aконitase, beiträgt. Dies liegt an der durch Applikation exogenen Nitrits verzögerten MIF-Sekretion und somit an der vermehrt intrazellulär vorliegenden und protektiv wirkenden MIF-Konzentration.

Die Mif^{-/-}-Mäuseherzen weisen mit $8,14 \pm 3,86$ mU/mg Protein die geringste Aконitaseaktivität auf (MW $\pm$ SD, n=6) (vgl. Abb. 13). Wurde das Herz mit exogenem Nitrit behandelt, lag die Aконitaseaktivität bei den Mif^{-/-}-Mäuseherzen bei $10,40 \pm 4,51$ mU/mg Protein (MW $\pm$ SD, n=9) (vgl. Abb. 13). Dies beinhaltet zwar die Tendenz eines Funktionserhalts der Aконitase, aber keinen statistisch belegbaren Erhalt der Proteinaktivität.

Im Vergleich der mit exogenem Nitrit behandelten Herzen war die Aконitaseaktivität bei den WT-Mäuseherzen deutlich höher als bei den Mif^{-/-}-Mäuseherzen (MW $\pm$ SD: $36,79 \pm 13,42$.vs $10,40 \pm 4,51$ mU/mg Protein, n=5-9, $p < 0,001$) (vgl. Abb. 13). Somit trägt exogenes Nitrit durch das verstärkt intrazellulär gehaltene MIF deutlich zum Erhalt der Aконitaseaktivität bei.

Zusammenfassend wirkt also die durch exogenes Nitrit verzögerte Sekretion des MIF verstärkt protektiv auf die Funktionsfähigkeit von Proteinen, indem deren oxidativer Schaden im I/R-Modell verringert werden konnte.

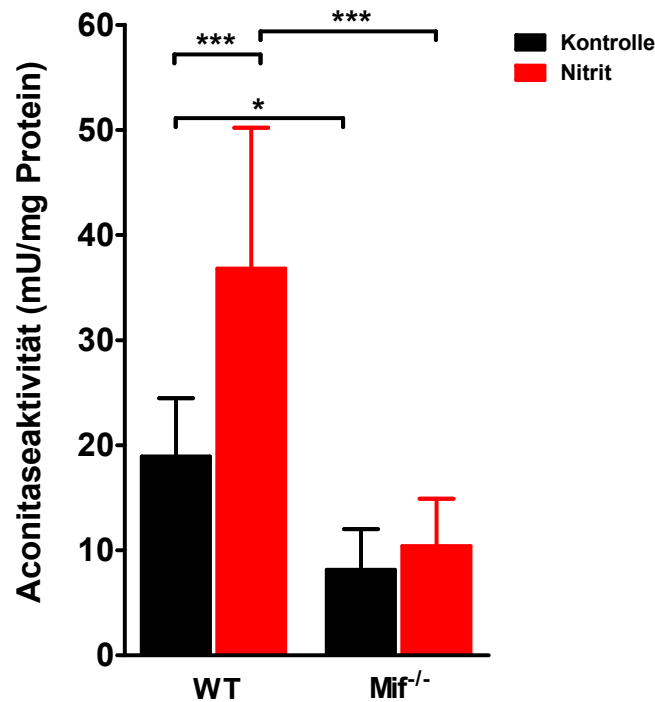


Abb. 13: Die Aconitaseaktivität liegt unter Behandlung mit exogenem Nitrit und bei den Wildtypmäusen (WT-Mäusen) erhöht vor. Die Aconitaseaktivität ist bei MIF-*knockout*-Mäusen (Mif^{-/-}-Mäusen) sowohl unter Applikation exogenen Nitrits als auch unter Kontrollbedingungen erniedrigt (n=5-9; *p<0,05, ***p<0,001, MW ± SD).

4.2.4 Reduzierung der Infarktgrößen durch Nitrit und MIF

Durch die Infarktgrößenanalyse konnte der Effekt von MIF im I/R-Modell bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die WT-Mäuseherzen mit 29 ± 3 % Infarkt/AAR eine geringere Infarktgröße aufwiesen als die Mif^{-/-}-Mäuseherzen mit 37 ± 3 % Infarkt/AAR (MW ± SD, n=5, p<0,001) (vgl. Abb. 14). In den Mif^{-/-}-Mäuseherzen konnte die Infarktgröße nach Behandlung mit exogenem Nitrit gegenüber der Kontrolle gesenkt werden (MW ± SD: 19 ± 3 vs. 37 ± 3 %, n=5, p<0,001) (vgl. Abb. 14). Zudem zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine stärkere Reduzierung der Infarktgröße bei den WT-Mäuseherzen nach Behandlung mit exogenem Nitrit (MW ± SD: 11 ± 2 vs. 29 ± 3 %, n=5-10, p<0,001) (vgl. Abb. 14). Auch im direkten Vergleich der Infarktgrößen der mit exogenem Nitrit behandelten WT-Mäuseherzen mit den mit exogenem Nitrit behandelten Mif^{-/-}-Mäuseherzen war eine geringere Infarktgröße bei der Gruppe der WT-Mäuseherzen nachweisbar (MW ± SD: 19 ± 3 vs. 11 ± 2 %, n=5-10, p<0,001) (vgl. Abb. 14).

Insofern lässt sich festhalten, dass exogenes Nitrit zwar nicht ausschließlich über MIF protektiv auf die Infarktgröße zu wirken scheint, MIF aber einen großen Beitrag zum Schutz des Herzens leistet. Das durch Behandlung mit exogenem Nitrit vermehrt intrazellulär gehaltene MIF senkt somit die Infarktgröße durch Reduzierung des ROS-Spiegels.

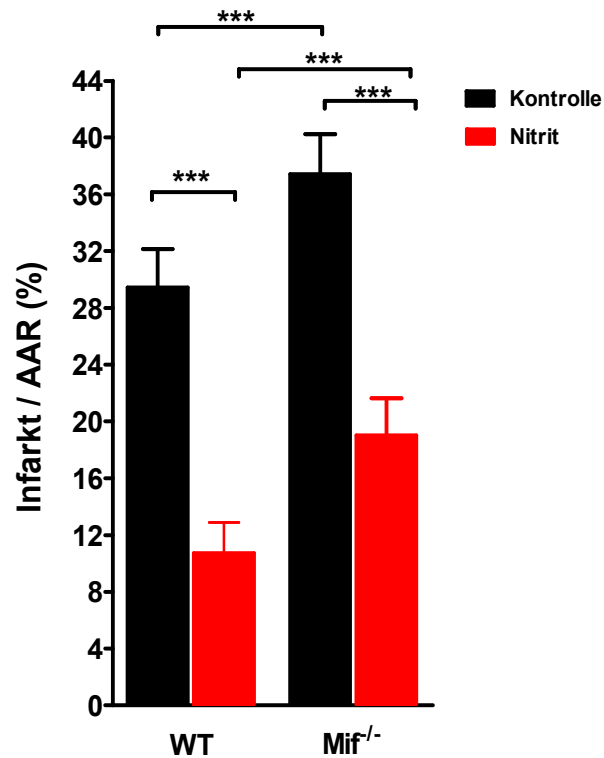


Abb. 14: Die Infarktgröße wird durch exogenes Nitrit und MIF positiv beeinflusst. Die Infarktgröße der MIF-*knockout*-Mäuseherzen (Mif^{-/-}-Mäuseherzen) ist größer als die der Wildtypmäuseherzen (WT-Mäuseherzen) und kann sowohl in den WT- als auch in den Mif^{-/-}-Mäuseherzen durch exogenes Nitrit reduziert werden, wobei aber die Infarktgrößenreduzierung der WT-Mäuseherzen größer war (n=5, ***p<0,001, MW ± SD).

5 Diskussion und Schlussfolgerung

5.1 Nitritreduktion durch hypoxische Kardiomyozyten

MIF stellt ein Protein mit vielfältigen Funktionen dar. Dabei wirkt MIF sowohl intrazellulär als auch extrazellulär im Rahmen einer I/R kardioprotektiv [48].

Seine kardioprotektiven Funktionen können durch S-Nitrosierung mittels Applikation von exogenem Nitrit positiv beeinflusst werden [48]. Deshalb werden im folgenden Abschnitt zunächst die Ergebnisse zur Nitritreduktion durch HL1-Zellen diskutiert.

In vitro-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten nachweisen, dass HL1-Zellen unter normoxischen Bedingungen eine sehr geringe NO-Bildung nach Nitritinjektion aufwiesen, wohingegen die NO-Bildung unter hypoxischen Bedingungen hoch war (vgl. Abb.5). Dies lässt den Schluss zu, dass nur hypoxische HL1-Zellen in der Lage sind, Nitrit zu NO zu reduzieren.

Ergebnisse von Hendgen-Cotta et al. von 2008, aus denen ersichtlich wurde, dass in der Reperfusionsphase des Herzens die Reduktion von Nitrit zu NO durch das desoxygenierte Myoglobin erfolgt, unterstützen diese Ergebnisse [82]. Auch weitere Hämproteine wie das desoxygenierte Hämoglobin können Nitrit zu NO reduzieren [80]. Hier zeigten Hendgen-Cotta et al. jedoch, dass im Rahmen der myokardialen Reperfusion vor allem das desoxygenierte Myoglobin für die Nitritreduktion verantwortlich ist [82].

Weitere Mechanismen der Bildung von NO aus Nitrit stellt die azidische Disproportionierung dar, die jedoch vornehmlich bei einem pH-Wert von 2 im Magen vorkommt [77]. In dieser Arbeit konnte im Medium der HL1-Kardiomyozyten während der Ischämie minimal ein pH von $6,9 \pm 0,2$ nachgewiesen werden (vgl. Abb. 1c). Auch wenn der pH-Wert im Rahmen einer Ischämie/Hypoxie also sinkt, wird dieser Mechanismus der Produktion von NO keine nennenswerte Rolle spielen, da der pH-Wert hierbei nicht so niedrige Werte wie im Magen annimmt.

Unter normoxischen Bedingungen ist in der vorliegenden Arbeit erkenntlich, dass die NO-Bildung gegen Ende der Messzeit von 25 min geringfügig ansteigt (vgl. Abb.5a). Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, dass auf Kardiomyozyten auch eine längere Begasung mit dem NO-Trägergas Helium hypoxisch wirkt. Da dies eine durch den Versuchsaufbau bedingte Hypoxie darstellt, ohne die keine Messung der NO-Bildung möglich ist, ist dieser Effekt nicht vermeidbar.

Die so nachgewiesene Reduktionsfähigkeit von Nitrit zu NO in hypoxischen Kardiomyozyten stellt den grundlegenden Mechanismus zur S-Nitrosierung dar, denn die S-Nitrosierung beschreibt die Reaktion von NO mit einem reaktiven Cysteinthiol [86]. Die S-Nitrosierung gilt dabei als ein wichtiger regulierender Faktor in zellulären Vorgängen wie Inflammation, Angiogenese oder Apoptose [107]. Auch in Bezug auf die Funktionen von MIF ist die S-Nitrosierung von entscheidender Bedeutung. Dies konnte in der Arbeit von Lüdike et al. gezeigt werden, da die S-Nitrosierung von MIF am Cys81 zu einer Steigerung der Oxidoreduktasefunktion von MIF führte [4]. In deren Arbeit wurde vermutet, dass durch die S-Nitrosierung eine Konformationsänderung entsteht, die die Oxidoreduktasefunktion von MIF verstärkt [4]. Genau durch diese Oxidoreduktasefunktion konnte *in vivo* die Verringerung des oxidativen Schadens durch ROS und somit eine geringere Infarktgröße nachgewiesen werden [3].

5.2 Verzögerte MIF-Sekretion durch Nitritbehandlung

Intrazellulär besitzt MIF eine durch Applikation von exogenem Nitrit verstärkte Oxidoreduktasefunktion, die den ROS-Spiegel senkt [4]. Besonders in der frühen Phase der Reperfusion fallen die ROS an, sodass gerade diese Phase in unseren Untersuchungen von besonderem Interesse war [1]. Die extrazellulär vermittelten Funktionen von MIF sind über den AMPK-Weg für den Energiestoffwechsel und die Glukoseaufnahme von entscheidender Bedeutung [54]. Jedoch entstehen durch diese AMPK-Aktivierung auch in der frühen Phase der Reperfusion Oxidationen, die apoptoseinduzierend wirken können [54, 56]. Somit sind die intrazellulären Funktionen für unsere Untersuchung gerade in der frühen Reperfusionsphase ausschlaggebend, um den oxidativen Stress nach Ischämie in der Reperfusionsphase möglichst gering halten zu können. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die Sekretion von MIF während der Reperfusion anhand der intrazellulären und extrazellulären MIF-Konzentrationen nachzuvollziehen.

Der detaillierte Mechanismus der MIF-Sekretion bleibt jedoch bis heute nicht genau geklärt. Es wird angenommen, dass hierbei ein eigener Sekretionsweg bestehen muss, da MIF keine N-terminale Signalsequenz besitzt [37]. Die Arbeit von Flieger et al. legt nahe, dass MIF mutmaßlich über den ABCA1 (*ATP-binding cassette, sub-family A, member 1*)-Transporter, einen nicht klassischen Sekretionsweg, sekretiert wird [38]. Da MIF sich zudem in vielen Zellen des Körpers befindet und zum Beispiel auch von der Hypophyse ausgeschüttet werden kann, wurde die MIF-Sekretion in der vorliegenden

Arbeit zunächst im *in vitro*-Modell an HL1-Kardiomyozyten durch Messung der MIF-Konzentrationen intrazellulär und extrazellulär untersucht [30-32]. Dieser Versuchsansatz lässt es zu, ausschließlich die MIF-Sekretion der Kardiomyozyten zu messen, da hierbei keine Beeinflussung durch andere Organsysteme bestehen kann.

MIF wurde beim Myokardinfarkt eine protektive Rolle zugeschrieben, da nach I/R MIF durch ROS-Spiegelsenkung zu geringeren Infarktgrößen führte [3]. Der Myokardinfarkt und die anschließende Revaskularisierung wurden in dieser Arbeit *in vitro* mithilfe des H/R-Modells nachgebildet. Entsprechend stellte sich die Frage, wann MIF im Laufe der Reoxygenierung sekretiert wird und intrazellulär protektiv wirken kann. Die intrazelluläre MIF-Konzentration ist wegen der ROS-Spiegel senkenden Wirkung besonders in der frühen Phase der Reoxygenierung bzw. der Reperfusion für uns interessant. Dies gilt vor allem angesichts der Ergebnisse der Arbeit von Zweier et al., denen zufolge im Rahmen der Reperfusion gerade in den ersten 30 Sekunden nach Reperfusionsbeginn ein starker ROS-Anstieg verzeichnet werden kann [1].

In der auf die Hypoxie folgenden Reoxygenierung fielen die intrazellulären Konzentrationen von MIF unter Behandlung mit exogenem Nitrit erst in der späteren Phase ab (vgl. Abb. 7). Die extrazellulären MIF-Konzentrationen zeigten unter Behandlung mit exogenem Nitrit einen dazu passenden, verzögerten Anstieg (vgl. Abb. 7). Somit lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die Sekretion von MIF durch exogenes Nitrit in der frühen Phase der Reoxygenierung vermindert wird und erst verzögert im Verlauf der Reoxygenierung zunimmt (vgl. Abb. 7). Hier konnte die Möglichkeit unterschiedlicher MIF-Konzentrationen durch unterschiedlichen Zelluntergang ausgeschlossen werden, da zwischen den mit exogenem Nitrit behandelten Zellen und den Kontrollen kein Unterschied in der untersuchten Viabilität bestand (vgl. Abb. 8 und Abb. 9).

Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass die MIF-Konzentrationen unter normoxischen Bedingungen intrazellulär und extrazellulär unabhängig von der Behandlung mit exogenem Nitrit gleich blieben (vgl. Abb. 6). Die Behandlung mit exogenem Nitrit scheint die Konzentration von MIF somit erst bei zusätzlichem Einfluss durch die Hypoxie zu beeinflussen.

Takahashi et al. konnten an Kardiomyozyten demonstrieren, dass die MIF-Konzentration im Zellkulturmedium nach 6 Stunden deutlich höher war als nach 3 Stunden Hypoxie [68]. Sie stellten zudem fest, dass die MIF-mRNA-Expression unter H₂O₂-Stimulation nach 3 Stunden am größten ist und MIF dabei unabhängig von

Kalzium und Phorbol ester produziert wird [68]. Ergebnisse von Fukazawa et al. von 2002 zeigten auch, dass durch H_2O_2 stimulierte Kardiomyozyten vermehrt MIF sekretierten [60]. Diese Ergebnisse decken sich somit mit denen der vorliegenden Arbeit, denn im Rahmen der Hypoxie entstehen demnach vermehrt ROS, zu welchen auch H_2O_2 gezählt wird und welche insofern mit den Stimuli der Arbeiten von Fukazawa et al. und Takahashi et al. übereinstimmen. Ein neues Ergebnis unserer Untersuchungen ist jedoch, dass die Sekretion von MIF durch exogenes Nitrit in der frühen Phase der Reoxygenierung verzögert werden konnte (vgl. Abb. 7). Dies ist aufgrund der bereits bekannten starken ROS-Bildung genau in dieser frühen Phase der Reperfusion ein gewünschter Effekt [1].

In vivo konnten äquivalente Ergebnisse nachgewiesen werden, da die kardiale MIF-Konzentration in der frühen Reperusionsphase durch Applikation exogenen Nitrits zunächst hoch war und im späteren Verlauf abnahm (vgl. Abb. 10). Mit den Plasma-MIF-Konzentrationen verhielt es sich genau umgekehrt. In der frühen Reperusionsphase war unter Behandlung mit exogenem Nitrit weniger MIF im Plasma zu finden, wohingegen in der späten Phase eine deutlich höhere MIF-Konzentration nachweisbar war (vgl. Abb. 10). Auch hier konnte durch die Bestimmung von Troponin verifiziert werden, dass die unterschiedlichen MIF-Konzentrationen nicht auf einen erhöhten Zelluntergang zurückzuführen sind (vgl. Abb. 11). Dies deckt sich somit mit den besagten *in vitro*-Ergebnissen.

Folglich konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass eine Behandlung durch exogenes Nitrit die Sekretion von MIF nach extrazellulär in der frühen Phase der Reoxygenierung bzw. der Reperfusion verhinderte und intrazellulär höhere MIF-Konzentrationen aufzufinden waren. Dies ist deswegen ein wichtiger Effekt, da gerade in der frühen Phase der Reperfusion vermehrt ROS anfallen [1]. Somit kann dieser ROS-Bildung mithilfe des vermehrt intrazellulär gehaltenen MIFs entgegengewirkt werden.

In vorherigen Untersuchungen wurde bereits versucht, den Sekretionsweg von MIF nachzuvollziehen. Sowohl Fukazawa et al. als auch Takahashi et al. beschrieben dabei, dass MIF Proteinkinase-C-abhängig sekretiert wird [60, 68]. Diesbezüglich stellt sich also vor dem Hintergrund der Ergebnisse unserer Arbeit die Frage, ob die Proteinkinase C durch exogenes Nitrit direkt beeinflusst wird und daraufhin MIF verzögert sekretiert wird. Dabei würde nur ungeklärt bleiben, warum diese Sekretion nur in der frühen Phase der Reoxygenierung/Reperfusion verzögert wird und welche

Sekretionsmechanismen in der späten Phase dazu kommen. Weiterhin bleibt offen, ob über die *S*-Nitrosierung von MIF die Sekretion über die Proteinkinase C durch veränderte Interaktion beeinflusst wurde. Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung werden.

Merk et al. beschrieben 2009 eine Interaktion von MIF mit p115, deren Inhibition die Sekretion von MIF in Monozyten und Makrophagen verhinderte [72]. Somit ist anzunehmen, dass p115 die Sekretion von MIF entscheidend reguliert. Hierbei könnte die Interaktion von p115 und MIF durch die *S*-Nitrosierung von MIF verhindert worden sein, wodurch die MIF-Sekretion erst verzögert einsetzte.

Ein weiterer Interaktionspartner von MIF stellt Jab1 dar, der durch Untersuchungen von Lue et al. als sekretionsmodulierend charakterisiert wurde [75]. Lue et al. konnten an *human-embryonic-kidney*-Zellen (HEK-Zellen) zeigen, dass unter Ausschaltung von Jab1 eine stärkere Sekretion von MIF erfolgte [75]. Somit scheint MIF durch diese Interaktion verstärkt intrazellulär gehalten zu werden [75]. Ergebnisse von Lüdike et al. zeigten anhand eines *in vivo*-Mausmodells eine geringere Interaktion zwischen MIF und Jab1, sobald MIF an Cys 81 *S*-nitrosiert vorlag [4]. In dieser Untersuchung von Lüdike et al. wurde MIF daraufhin jedoch geringer sekretiert [4]. Auch in aktuellen Untersuchungen von Pohl et al. wurde während der frühen Phase der Reperfusion eine geringere Interaktion zwischen MIF und Jab1 festgestellt, die im Laufe der Reperfusion zunahm [108]. Hier könnte ein möglicher grundlegender Mechanismus vorliegen, der auch für die Ergebnisse dieser Arbeit von Bedeutung ist.

5.3 Kardioprotektive Effekte von MIF

5.3.1 Proteinfunktionserhaltung durch reduzierte H₂O₂-Spiegel

Im Anschluss wurde der Frage nachgegangen, was der nachgewiesene Unterschied in den MIF-Konzentrationen für die ROS-Bildung und für die Proteinoxidation im Rahmen der I/R bedeutet.

Bereits 1975 wurde festgestellt, dass der Schaden nach Ischämie in den ersten Minuten der Reperfusion weiter zunimmt [109]. Zweier et al. konnten 1988 aufzeigen, dass dieser Schaden vor allem durch freie ROS in der frühen Reperusionsphase entsteht [1]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die ROS-Bildung am Beispiel der H₂O₂-Konzentration und deren Beeinflussung durch MIF und exogenes Nitrit untersucht.

Koga et al. konnten 2011 zeigen, dass der ROS-Spiegel in WT-Fibroblasten im Vergleich zu MIF-defizienten Fibroblasten nach oxidativem Stress geringer war und in MIF-defizienten Fibroblasten erst nach viraler Transduktion des MIF-Gens gesenkt wurde [3]. Demnach ist MIF dazu in der Lage, die Redoxhomöostase aufrechtzuerhalten [3].

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fiel die H_2O_2 -Konzentration bei WT-Mäusen unter Behandlung mit exogenem Nitrit im Vergleich zu den Kontrollen deutlich geringer aus (vgl. Abb. 12). Zudem blieb bei den $Mif^{-/-}$ -Mäusen durch die Beeinflussung mit exogenem Nitrit jegliche Besserung der H_2O_2 -Konzentration aus (vgl. Abb. 12). Das lässt zusammen mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen annehmen, dass das durch Applikation exogenen Nitrits vermehrt intrazellulär gehaltene MIF ursächlich für die reduzierte H_2O_2 -Konzentration ist. Denn liegt eine höhere intrazelluläre MIF-Konzentration vor, kann MIF auch vermehrt über seine Oxidoreduktasefunktion kardioprotektiv wirken und – wie auch am Beispiel der H_2O_2 -Konzentration gezeigt – den ROS-Spiegel senken.

Zudem wurde von Lüdike et al. beschrieben, dass Nitrit durch *S*-Nitrosierung die Oxidoreduktasefunktion von MIF verstärkt, sodass hier ein weiterer Grund der reduzierten H_2O_2 -Konzentrationen vorliegen könnte [4].

Am Beispiel der Aконitaseaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Rolle von MIF und exogenem Nitrit bezüglich der Funktionserhaltung von Proteinen nach oxidativem Stress untersucht. Wegen des zentralen Eisen-Schwefel-Clusters der Aконitase ist dieses Enzym sensitiv gegenüber oxidativem Stress und eignete sich somit für die Untersuchung der Auswirkung des I/R-Schadens [102, 104]. In der vorliegenden Arbeit konnte dabei gezeigt werden, dass die Aконitaseaktivität der WT-Mäuse unter Behandlung mit exogenem Nitrit am höchsten war und somit am stärksten vor oxidativem Schaden bewahrt werden konnte (vgl. Abb. 13). Dies passt zu den zuvor erläuterten Ergebnissen. Die Behandlung mit exogenem Nitrit sorgt dafür, dass MIF in der frühen Reperfusionsphase vermehrt intrazellulär gehalten und erst verzögert sekretiert wird. Somit stellt die erhöhte intrazelluläre MIF-Konzentration mittels reduzierten ROS-Spiegels einen Schutz für Proteine dar, was wie in diesem Fall am Beispiel der Aконitase demonstriert werden konnte.

Auch das alleinige Vorliegen eines funktionsfähigen MIFs wies im Vergleich zu den $Mif^{-/-}$ -Mäusen eine höhere Aконitaseaktivität auf (vgl. Abb. 13). MIF besitzt also unabhängig von exogenem Nitrit bereits protektive Eigenschaften.

Letzteres konnten ebenfalls Koga et al. nachweisen, die die Aконitaseaktivität in WT- und Mif^{-/-}-Mäusen nach I/R mit Kontrollen nach einer vorgetäuschten Operation verglichen und dabei auch eine verminderte Aktivität bei Mif^{-/-}-Mäusen nach I/R aufzeigten [3].

In Untersuchungen von Hendgen-Cotta et al. konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Nitrit zu NO durch Myoglobin zu einer Reduzierung des ROS-Spiegels führt, wohingegen bei *knockout* des Myoglobins durch fehlende NO-Entstehung keine Senkung des ROS-Spiegels auftrat [82]. Die darauf folgende Arbeit von Lüdike et al. zeigte, dass MIF an Cys81 S-nitrosiert wird, wodurch die Oxidoreduktasefunktion von MIF verstärkt wird [4]. Diese Oxidoreduktasefunktion beschrieben Koga et al. als protektiv gegenüber oxidativem Stress [3].

Durch diese drei Arbeiten lässt sich im Rahmen des oxidativen Stresses ein Zusammenwirken von Nitrit und MIF erschließen: Die Behandlung mit exogenem Nitrit führt durch Myoglobin über die Reduktion zu NO zu einer S-Nitrosierung von MIF. Dadurch wird der ROS-Spiegel durch die Verstärkung der Oxidoreduktasefunktion von MIF gesenkt und somit kann die Funktion von Proteinen vermehrt erhalten werden [3, 4, 82].

Durch die vorliegende Arbeit kommt ein neuer Aspekt hinzu: Exogenes Nitrit verzögert die MIF-Sekretion, weswegen vermutet werden kann, dass in der frühen Reperfusionsphase mehr MIF für die kardioprotektiv wirksame Oxidoreduktaseaktivität intrazellulär zur Verfügung steht.

Festzuhalten bleibt somit, dass MIF protektive Eigenschaften gegenüber oxidativem Stress besitzt, die nicht nur über die vorbekannte S-Nitrosierung, sondern auch wie in dieser Arbeit ersichtlich über die durch exogenes Nitrit verzögerte MIF-Sekretion verstärkt werden können [4]. Folglich bewirkt exogenes Nitrit nicht nur durch Konformationsänderung eine erhöhte intrazelluläre Oxidoreduktasefunktion von MIF, sondern MIF wird auch durch exogenes Nitrit vermittelt verzögert sekretiert und vermehrt intrazellulär gehalten [4]. Die höhere intrazelluläre MIF-Konzentration in der frühen Phase der Reperfusion kann sich somit durch Senkung des ROS-Spiegels protektiv auf die Proteinfunktion auswirken.

5.3.2 Die Infarktgröße wird durch MIF und exogenes Nitrit reduziert

Da die Proteinfunktionen durch MIF und Applikation exogenen Nitrits vermehrt erhalten bleiben konnten, wurde daraufhin die Auswirkung auf die Infarktgröße näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass WT-Mäuse im Vergleich zu $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäusen eine geringere Infarktgröße aufwiesen (vgl. Abb. 14). Dies unterstützt die Arbeit von Miller et al. von 2008, in der nach 15 Minuten Ischämie und 4 Stunden Reperfusion auch ein reduziertes Infarktareal im Vergleich zu $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäusen beschrieben wird [47].

Duranski et al. untersuchten die Infarktgrößen nach dem *in vivo*-I/R-Modell an Mäusen unter Behandlung mit Nitritkonzentrationen zwischen 2,4 und 960 nmol, wobei sich die Konzentration von 48 nmol als die effektivste erwies [110]. Darauf basierend konnten, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, im *in vivo*-Mausmodell sowohl in der WT-Maus als auch in der $\text{Mif}^{-/-}$ -Maus geringere Infarktgrößen nach Behandlung mit 48 nmol exogenem Nitrit nachgewiesen werden (vgl. Abb. 14). Ergänzend dazu konnte diese verstärkte Kardioprotektion durch Behandlung mit exogenem Nitrit auf die Funktionsweise von MIF zurückgeführt werden, da die Kardioprotektion durch Nitritbehandlung bei $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäusen deutlich geringer ausfiel (vgl. Abb. 14).

Es ist jedoch auch ersichtlich, dass die Applikation exogenen Nitrits sogar auf die $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäuse eine für das Herz protektive Wirkung im Vergleich zu den $\text{Mif}^{-/-}$ -Kontrollmäusen besaß (vgl. Abb. 14). Dies wird an einer Infarktgrößenreduktion um ca. 49 % ersichtlich. Folglich müssen weitere Mechanismen existieren, die durch exogenes Nitrit verstärkt werden, aber unabhängig von MIF kardioprotektiv wirken. Ein solcher Mechanismus, der auf der direkten S-Nitrosierung von Komplex I der Atmungskette beruht, wurde durch Shiva et al. beschrieben [93]. Durch diesen wird die Produktion von ROS vermindert und die Öffnung der mPTP verhindert, sodass weniger apoptoseinduzierendes Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird [93].

Festzuhalten bleibt aber, dass die Infarktgröße bei den WT-Mäusen gemäß unserer Untersuchungen unter Behandlung mit exogenem Nitrit insgesamt den geringsten Wert aufwies (vgl. Abb. 14). Hier fand eine Reduktion der Infarktgrößen um 62 % statt. Unter Behandlung mit Nitrit lag die Infarktgrößenreduktion der $\text{Mif}^{-/-}$ -Mäuse bei ca. 49 %. Somit scheint exogenes Nitrit die Infarktgrößen zusätzlich zu anderen durch

exogenes Nitrit verstärkten Mechanismen auch über MIF-abhängige Wege um 13 % zu reduzieren. MIF trägt also einen großen Anteil zur Reduktion der Infarktgrößen bei. Hierbei sind die intrazellulären Funktionen von MIF für die Redoxhomöostase von entscheidender Bedeutung [40]. Die TPOR-Aktivität von MIF wird dabei durch die S-Nitrosierung verstärkt und besitzt somit eine stärkere kardioprotektive Wirkung [4, 39]. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird durch exogenes Nitrit die Sekretion von MIF verzögert, sodass MIF zunächst verstärkt intrazellulär vorliegt (vgl. Abb. 7, Abb. 10). Dies korreliert mit den Ergebnissen zur Reduktion der Infarktgrößen (vgl. Abb. 14). Die erhöhten intrazellulären MIF-Konzentrationen haben also nachgewiesenermaßen einen positiven Einfluss auf das Infarktgeschehen.

Durch diese Infarktgrößenreduzierung konnte also die kardioprotektive Wirkung von MIF nachgewiesen werden. Der Untersuchung der genauen Mechanismen muss jedoch auch in Zukunft weiterhin eine hohe Aufmerksamkeit gewidmet werden.

5.4 Ausblick

Ob genau die in der Arbeit von Lüdike et al. durch Nitritbehandlung induzierte S-Nitrosierung ein Grund für die veränderte Sekretion von MIF nach extrazellulär darstellt, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden [4]. Auch spielt die Interaktion mit weiteren Proteinen wie zum Beispiel p115 in der MIF-Sekretion der Makrophagen eine Rolle. Ob diese Interaktion jedoch auch im I/R-Schaden die Sekretion reguliert und zusätzlich noch durch exogenes Nitrit beeinflusst werden kann, ist noch nicht geklärt [72]. Ein weiterer Interaktionspartner, Jab1, wurde an menschlichen embryonalen Nierenzellen untersucht und zeigte durch Bindung an MIF eine MIF-Sekretionsinhibition [75]. Lüdike et al. zeigten, dass S-nitrosiertes MIF eine geringere Interaktion mit Jab1 eingeht und daraufhin weniger sekretiert wird [4]. Die Arbeit von Pohl et al. zeigte, dass MIF in der frühen Phase der Reperfusion eine geringere Interaktion mit Jab1 eingeht als in der späteren Reperfusionsphase [108]. Dies passt zu dem in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Phänomen der im Laufe der Reperfusion zunehmenden MIF-Sekretion. Dabei bleibt aber fraglich, warum diese Interaktion im weiteren Verlauf der Reperfusion wieder zunimmt. Ebenso stellt sich diesbezüglich auch die Frage, ob Jab1 in der späteren Reperfusionsphase für die Sekretion von MIF eine eher untergeordnete Rolle spielt und die verzögerte Sekretion von MIF daraufhin anders getriggert wird. Dies sollte weitere Untersuchungen nach sich ziehen.

Ein weiterer interessanter Untersuchungsaspekt liegt in der Auswirkung der erhöhten intrazellulären MIF-Konzentrationen nach Behandlung mit exogenem Nitrit in der frühen Phase der Reoxygenierung/Reperfusion. Hierbei wurde die Oxidoreduktasefunktion als intrazelluläre Funktion von MIF bereits beschrieben [39]. Welche weiteren Funktionen MIF hier jedoch besitzt, ist bislang nicht geklärt.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.* J Biol Chem, 1988. 263(3): p. 1353-1357.
2. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target.* J Clin Invest, 2013. 123(1): p. 92-100.
3. Koga, K., et al., *Macrophage Migration Inhibitory Factor Provides Cardioprotection During Ischemia/Reperfusion by Reducing Oxidative Stress.* Antioxidants & Redox Signaling, 2011. 14(7): p. 1191-1202.
4. Luedike, P., et al., *Cardioprotection through S-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor.* Circulation, 2012. 125(15): p. 1880-1889.
5. *Gesundheit: Todesursachen in Deutschland*, S. Bundesamt, Editor. 2013, Destatis: Wiesbaden. p. 1-7.
6. Ranz-Polster, H., et al., *Akutes Koronarsyndrom*, in *Basislehrbuch Innere Medizin*, H. Ranz-Polster and S. Krautzig, Editors. 2008, Elsevier Urban & Fischer. p. 77-87.
7. Zeymer, U., et al., *Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Therapie des akuten Herzinfarkts bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI).* Der Kardiologe, 2013. 7(6): p. 410-422.
8. Maier, S.K.G., et al., *Empfehlungen zur Organisation von Herzinfarktnetzwerken.* Der Kardiologe, 2014. 8(1): p. 36-44.
9. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury.* N Engl J Med, 2007. 357(11): p. 1121-1135.
10. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. 76(5): p. 1713-1719.
11. Riede, U.-N., et al., *Koronare Herzkrankheiten*, in *Allgemeine und spezielle Pathologie*, U.-N. Riede and H.-E. Schäfer, Editors. 2001, Thieme. p. 488-491.
12. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction.* Circulation, 1982. 66(6): p. 1146-1149.
13. Dennis, S.C., W. Gevers, and L.H. Opie, *Protons in Ischemia - Where Do They Come from - Where Do They Go To.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1991. 23(9): p. 1077-1086.
14. Pierce, G.N. and K.D. Philipson, *Na⁺-H⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles.* Biochim Biophys Acta, 1985. 818(2): p. 109-116.
15. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *The cell biology of acute myocardial ischemia.* Annu Rev Med, 1991. 42: p. 225-246.
16. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schafer, *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.* Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 365-371.
17. Garcia-Dorado, D., *Myocardial reperfusion injury: a new view.* Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 363-364.
18. Faber, J.L., K.R. Chien, and S. Mitnacht, *The Pathogenesis of Irreversible Cell Injury in Ischemia.* Am J Pathol, 1981. 102(2): p. 271-281.
19. Rocha, M. and V.M. Victor, *Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: The effects of mitoquinone.* Medical Science Monitor, 2007. 13(7): p. RA132-RA145.
20. Thompson-Gorman, S.L. and J.L. Zweier, *Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury.* J Biol Chem, 1990. 265(12): p. 6656-6663.
21. Rossen, R.D., et al., *Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion.* Circ Res, 1994. 75(3): p. 546-555.
22. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* Exp Physiol, 1997. 82(2): p. 291-295.
23. Nakamura, Y., et al., *Effect of edaravone on plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with acute myocardial infarction.* J Cardiol, 2009. 54(3): p. 416-424.
24. Lefer, D.J. and D.N. Granger, *Oxidative stress and cardiac disease.* Am J Med, 2000. 109(4): p. 315-323.

25. Boden, W.E., et al., *Diltiazem in acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents: a randomised placebo-controlled trial. Incomplete Infarction Trial of European Research Collaborators Evaluating Prognosis post-Thrombolysis (INTERCEPT)*. Lancet, 2000. 355(9217): p. 1751-1756.
26. Investigators, A.A., et al., *Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. 297(1): p. 43-51.
27. David, J.R., *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. 56(1): p. 72-77.
28. Bloom, B.R. and B. Bennett, *Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity*. Science, 1966. 153(3731): p. 80-82.
29. Nathan, C.F., H.G. Remold, and J.R. David, *Characterization of a Lymphocyte factor which alters Macrophage functions*. The Journal of experimental Medicine 1973. 137: p. 275-290.
30. Bernhagen, J., et al., *MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia*. Nature, 1993. 365: p. 756-759.
31. Burger-Kentischer, A. and R.S. Heike Goebel, Gustav Fraedrich, Hans E. Schaefer, Stefanie Dimmeler, Robert Kleemann, Jürgen Bernhagen and Christian Ihling, *Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Different Stages of Human Atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(13): p. 1561-1566.
32. Yu, C.M., et al., *Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Ischemic Myocardial Injury*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003. 51(5): p. 625-631.
33. Calandra, T., et al., *The Macrophage Is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor*. J. Exp. Med. , 1994. 179 (6): p. 1895-1902.
34. Bozza, M., et al., *Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis*. J Exp Med, 1999. 189(2): p. 341-346.
35. Fingerle-Rowson, G., et al., *The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(16): p. 9354-9359.
36. Sun, H.W., et al., *Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(11): p. 5191-5196.
37. Bucala, R., *MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, glucocorticoid-induced regulator of the immune response*. 1996: p. 1607-1613.
38. Flieger, O., et al., *Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter*. Febs Letters, 2003. 551(1-3): p. 78-86.
39. Kleemann, R., et al., *Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase*. J Mol Biol, 1998. 280(1): p. 85-102.
40. Kleemann, R., et al., *Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes*. FEBS Letters, 1998. 430(3): p. 191-196.
41. Sieber, S.A., *Cysteine Reactivity Profiling*, in *Activity-Based Protein Profiling*, S.A. Sieber, Editor. 2012, Springer-Verlag. p. 32-33.
42. Zerneck, A., J. Bernhagen, and C. Weber, *Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease*. Circulation, 2008. 117(12): p. 1594-1602.
43. Kleemann, R., et al., *Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1*. Nature, 2000. 408(6809): p. 211-216.
44. Qi, D., et al., *Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion*. Journal of Clinical Investigation, 2009. 119(12): p. 3807-3816.

45. Jung, H., H.A. Seong, and H. Ha, *Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity*. J Biol Chem, 2008. 283(29): p. 20383-20396.
46. Kleemann, R., et al., *Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF*. Eur J Biochem, 1999. 261(3): p. 753-766.
47. Miller, E.J., et al., *Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart*. Nature, 2008. 451(7178): p. 578-582.
48. Rassaf, T., C. Weber, and J. Bernhagen, *Macrophage migration inhibitory factor in myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Cardiovascular Research, 2014. 102(2): p. 321-328.
49. Lue, H., et al., *Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74*. Cell Signal, 2011. 23(1): p. 135-144.
50. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. 197(11): p. 1467-1476.
51. Jasanoff, A., G. Wagner, and D.C. Wiley, *Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii*. EMBO J, 1998. 17(23): p. 6812-6818.
52. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Current Biology, 2000. 10(20): p. 1247-1255.
53. Russell, R.R., et al., *Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1999. 277(2): p. H643-H649.
54. Kim, A.S., E.J. Miller, and L.H. Young, *AMP-activated protein kinase: a core signalling pathway in the heart*. Acta Physiol (Oxf), 2009. 196(1): p. 37-53.
55. Young, L.H., et al., *AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart*. Trends Cardiovasc Med, 2005. 15(3): p. 110-118.
56. Lopaschuk, G.D., *AMP-activated protein kinase control of energy metabolism in the ischemic heart*. Int J Obes (Lond), 2008. 32(4): p. 29-35.
57. Schwartz, V., et al., *Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF*. Eur J Cell Biol, 2012. 91(6-7): p. 435-449.
58. Shi, X., et al., *CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex*. Immunity, 2006. 25(4): p. 595-606.
59. Flaster, H., et al., *The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity*. Mol Endocrinol, 2007. 21(6): p. 1267-1280.
60. Fukuzawa, J., et al., *Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 24889-24895.
61. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 587-596.
62. Kraemer, S., et al., *MIF-chemokine receptor interactions in atherogenesis are dependent on an N-loop-based 2-site binding mechanism*. FASEB J, 2011. 25(3): p. 894-906.
63. Riad, A., et al., *Toll-Like Receptor-4 Modulates Survival by Induction of Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Mice*. The Journal of Immunology, 2008. 180(10): p. 6954-6961.
64. Gao, X.M., et al., *Deletion of macrophage migration inhibitory factor protects the heart from severe ischemia-reperfusion injury: a predominant role of anti-inflammation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. 50(6): p. 991-999.
65. Chagnon, F., et al., *Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization*. Circ Res, 2005. 96(10): p. 1095-1102.
66. Pan, J.H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is associated with aneurysmal expansion*. J Vasc Surg, 2003. 37(3): p. 628-635.

67. Pan, J.H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2004. 109(25): p. 3149-3153.
68. Takahashi, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes*. *Cardiovascular Research*, 2001. 52(3): p. 438-445.
69. Chan, W., et al., *Macrophage migration inhibitory factor for the early prediction of infarct size*. *J Am Heart Assoc*, 2013. 2(5): p. e000226.
70. Ma, H., et al., *Impaired macrophage migration inhibitory factor-AMP-activated protein kinase activation and ischemic recovery in the senescent heart*. *Circulation*, 2010. 122(3): p. 282-292.
71. Welford, S.M., et al., *HIF1alpha delays premature senescence through the activation of MIF*. *Genes Dev*, 2006. 20(24): p. 3366-3371.
72. Merk, M., et al., *The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor*. *J Immunol*, 2009. 182(11): p. 6896-6906.
73. Alvarez, C., et al., *ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage*. *J Cell Biol.*, 1999. 147(6): p. 1205-1222.
74. Lue, H., et al., *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*, 2006. 18(5): p. 688-703.
75. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity*. *Oncogene*, 2007. 26(35): p. 5046-5059.
76. Zweier, J.L., A. Samouilov, and P. Kuppusamy, *Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1999. 1411(2-3): p. 250-262.
77. Björne, H., et al., *Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. 113(1): p. 106-114.
78. Webb, A., et al., *Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(37): p. 13683-13688.
79. Battelli, M.G., A. Bolognesi, and L. Polito, *Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1842(9): p. 1502-1517.
80. Nagababu, E., et al., *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. *J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 46349-46356.
81. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. *Nature Medicine*, 2003. 9(12): p. 1498-1505.
82. Hendgen-Cotta, U.B., et al., *Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(29): p. 10256-10261.
83. Shiva, S., et al., *Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration*. *Circ Res*, 2007. 100(5): p. 654-661.
84. Rassaf, T., et al., *Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function*. *Circ Res*, 2007. 100(12): p. 1749-1754.
85. Feelisch, M., et al., *Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo*. *Faseb Journal*, 2002. 16(13): p. 1775-1785.
86. Hess, D.T., et al., *S-nitrosylation: spectrum and specificity*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(2): p. E46-E49.
87. Stamler, J.S., *Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide*. *Cell*, 1994. 78(6): p. 931-936.
88. Doyle, M.P., et al., *Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Human Deoxyhemoglobin by Nitrites*. *Journal of Biological Chemistry*, 1981. 256(23): p. 2393-2398.

89. Hess, D.T., et al., *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(2): p. 150-166.
90. Liu, Z., et al., *S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. 284(2): p. 526-534.
91. Scharfstein, J., et al., *In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols*. J Clin Invest 1994. 94: p. 1432-1439.
92. Rassaf, T., *Plasma Nitrosothiols Contribute to the Systemic Vasodilator Effects of Intravenously Applied NO: Experimental and Clinical Study on the Fate of NO in Human Blood*. Circulation Research, 2002. 91(6): p. 470-477.
93. Shiva, S., et al., *Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer*. J Exp Med, 2007. 204(9): p. 2089-2102.
94. Lundberg, J.O., et al., *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics*. Nat Chem Biol, 2009. 5(12): p. 865-869.
95. Hendgen-Cotta, U.B., et al., *Dietary nitrate supplementation improves revascularization in chronic ischemia*. Circulation, 2012. 126(16): p. 1983-1992.
96. Rammos, C., et al., *Modulation of circulating macrophage migration inhibitory factor in the elderly*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 582586.
97. Claycomb, W.C., et al., *HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. 95(6): p. 2979-2984.
98. Nguyen, S.V. and W.C. Claycomb, *Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 265(2): p. 382-386.
99. NIH-Publication. No: 07-4519. *ICCVAM test method evaluation report*. In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic cytotoxicity. November 2006; Available from: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmcr/at-tmer-complete.pdf (letztes Einsichtsdatum: 17.12.2015).
100. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-685.
101. Heinicke, E., U. Kumar, and D. Munoz, *Quantitative dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence*. J Immunol Methods 1992. 152(2): p. 227-236.
102. Gardner, P.R. and I. Fridovich, *Superoxide Sensitivity of the Escherichia-Coli Aconitase*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(29): p. 19328-19333.
103. Armstrong, J.S., et al., *The redox regulation of intermediary metabolism by a superoxide-aconitase rheostat*. Bioessays, 2004. 26(8): p. 894-900.
104. Kennedy, M.C., et al., *The Role of Iron in the Activation-Inactivation of Aconitase*. Journal of Biological Chemistry, 1983. 258(18): p. 1098-1105.
105. Gardner, P.R., *Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling*. Biosci Rep, 1997. 17(1): p. 33-42.
106. Robbins, A.H. and C.D. Stout, *Iron-Sulfur Cluster in Aconitase - Crystallographic Evidence for a 3-Iron Center*. Journal of Biological Chemistry, 1985. 260(4): p. 2328-2333.
107. Lima, B., et al., *S-nitrosylation in cardiovascular signaling*. Circ Res, 2010. 106(4): p. 633-646.
108. Pohl, J., et al., *Targeted intracellular accumulation of macrophage migration inhibitory factor in the reperfused heart mediates cardioprotection*. Thromb Haemost, 2015. 115(1): p. 200-212 [Epub 2015 Aug 27].
109. Hearse, D., *Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1975. 7(5): p. 315-318.
110. Duranski, M.R., et al., *Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver*. J Clin Invest, 2005. 115(5): p. 1232-1240.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01.08.2016, Anna-Elena Mull

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Kelm möchte ich für die Ermöglichung dieser Arbeit an seinem Institut danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rassaf, gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Die wöchentlichen Besprechungen der Arbeitsgruppe unter seiner Leitung waren immer konstruktiv für die Entstehung und Diskussion der Arbeit. Seine Freude und sein Enthusiasmus am Entwickeln neuer Forschungsansätze übertrugen sich merklich auf das ganze Team und wirkten sich sehr motivierend aus, sodass ich sehr dankbar bin, Teil dieser Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Julia Pohl, bedanke ich mich herzlichst für die angenehme, gewinnbringende Zusammenarbeit, die gute Anleitung und Betreuung im Labor, für die jederzeit sehr wertvolle Hilfe bei der Erhebung und Auswertung der Daten sowie beim Erstellen dieser Arbeit in Ihrer endgültigen Fassung.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Ulrike B. Hendgen-Cotta und der gesamten Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung und die immerwährende Bereitschaft, bei Fragen weiterzuhelfen. Das harmonische Zusammenarbeiten und der tägliche Austausch im Labor werden mir immer in besonderer Erinnerung bleiben.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern, deren stete Motivation und Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Freund Philipp Markwerth und meine Freunde für den Rückhalt und das ausdauernde Engagement bei der Entstehung der Arbeit und auch während der Studienzeit.