

**Expression des Makrophagen- Migration- Inhibitions-  
faktor (MIF) bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung  
und seine Assoziation mit der inflammatorischen Reak-  
tion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Schönleber, Heiko**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schlensak

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1. Koronare Herzerkrankung .....	6
1.2. Molekulargenetik des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF) ...	6
1.2.1. Molekulare Struktur des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF).....	7
1.3. Synthese und Expression von MIF .....	9
1.3.1. MIF als Modulator intrazellulärer Signalkasaden.....	9
1.3.2. MIF als Modulator intrazellulär- inflammatorischer Signalkaskaden	11
1.3.3. MIF als Zytokin und inflammatorischer Mediator .....	13
1.4. Atherosklerose und MIF .....	14
1.4.1. Atherogenese .....	14
1.4.2. MIF in der Atherogenese .....	16
1.5. MIF bei diversen Krankheiten.....	18
1.6. MIF bei Stoffwechselerkrankungen .....	19
1.7. Endokrine Eigenschaften von MIF .....	20
1.8. MIF bei weiteren kardiovaskulären Prozessen .....	21
1.9. Fragestellung .....	22
<b>2. Material und Methodik .....</b>	<b>23</b>
2.1. Material .....	23
2.1.1. Patientenkollektiv.....	23
2.1.2. Studienprotokoll .....	24
2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial .....	25
2.2. Methodik .....	27
2.2.1. Blutprobenvorbereitung der Kontrollgruppe.....	27
2.2.2. Blutprobenverarbeitung der Studiengruppe.....	27
2.2.3. Messung der inflammatorischen Marker .....	28
2.2.4. Verfahrensweise des MIF- ELISA .....	28
2.2.5. MIF- ELISA Analyse .....	30
2.2.6. Experimentelle Bestimmung der benötigten Plasmavolumina .....	31
2.2.7. Statistische Analyse.....	32

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1. Assoziation der MIF-Konzentrationen mit demographischen Faktoren..	33
3.1.1. MIF- Expression bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, stabiler Angina pectoris und bei gesunden Probanden .....	35
3.1.2. Univariate Kovarianzanalyse der MIF-Werte eines akuten Koronarsyndroms .....	36
3.1.3. Assoziation der MIF-Konzentration mit der Medikation .....	38
3.1.4. Assoziation der MIF-Spiegel von der Einnahme weiterer Medikamente, abhängig vom MIF-Median-Wert .....	39
3.2. Assoziation der kardiovaskulären Risikofaktoren Cholesterol, LDL und HDL .....	40
3.2.1. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Hyperlipidämie .....	41
3.2.2. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne arterieller Hypertonie .....	42
3.2.3. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus ..	43
3.2.4. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Nikotinabusus .....	44
3.2.5. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne renaler Dysfunktion	45
3.2.6. Assoziation der glomerulären Filtrationsrate (MDRD) und MIF .....	46
3.2.7. Assoziation von Kreatinin und MIF .....	47
3.3. Assoziation der LV-Funktion und MIF .....	48
3.3.1. Assoziation von Brain Natriuretic Peptide (BNP) und MIF .....	49
3.4. Korrelation der MIF-Werte mit Entzündungsmarkern .....	50
3.4.1. Assoziation von Monozyten und Leukozyten mit MIF .....	51
3.5. Residuale Plättchenaggregation .....	52
3.5.1. MIF-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einer Plaqueruptur..	53
3.6. Korrelation zwischen MIF- und Troponin I -Werten .....	54
3.6.1. Assoziation von Troponin und Creatinkinase mit MIF .....	55
3.7. Verlaufsuntersuchung bei Patienten mit CAD und AMI .....	56

---

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>58</b>
4.1. Die wichtigsten Ergebnisse in der Übersicht .....	58
4.2. Komplexe Interaktion von MIF, Atherosklerose und Chemokinen .....	58
4.3. Interaktion von MIF mit Entzündungsmarkern .....	59
4.4. Assoziation kardiovaskulärer Risikofaktoren mit MIF .....	60
4.5. MIF und seine Assoziation mit Gesamtcholesterin, HDL und LDL.....	61
4.5.1. MIF und Herzinsuffizienz .....	61
4.6. MIF- Plasmaspiegel und das Auftreten von Plaquerupturen.....	62
4.7. Assoziation der Plättchenfunktion mit MIF .....	63
4.8. Limitationen der Studie .....	64
4.9. Schlussfolgerung .....	65
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>7. Veröffentlichungen</b> .....	<b>79</b>
<b>8. Danksagung</b> .....	<b>80</b>
<b>9. Curriculum vitae</b> .....	<b>81</b>

## Abkürzungen

4-OT	Oxalocrotonatautomerase
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMPK	AMP- aktivierte Proteinkinase
AS	Aortenstenose
CHMI	5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconatisomerase
CRP	C- reaktives Protein
DCM	DilatativeCardiomyopathie
ELISA	enzyme-linkedimmunosorbentassay
ERK1/ERK2	extrazellulär- signalregulierte Kinase
ETS	E-twenty six Transkriptionsfaktoren
GIF	Glycosylation Inhibiting Factor
IAP	Instabile Angina Pectoris
iNOS	Nitratoxid Synthase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JAB1	Jun activatingbindingprotein
JUN	JUN- N-terminale Kinase
KHK	Koronare Herz Krankheit
KIP1	Kinesin related protein

LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein- 1
MIF	Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktor
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
NO	Stickoxid
PLA2	Phospholipase A2
PTCA	perkutanetransluminaleCoronarangioplastie
PGE2	Prostaglandin E2
SAP	Stabile Angina Pectoris
TNF	Tumornekrosisfaktor
TSST-1	Toxic-shock-syndrom-toxine-1
STEMI	ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
BNP	Brain Natriuretic Peptide

# 1. Einleitung

## 1.1. Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzkrankheit ist eine durch Atherosklerose ausgelöste stenosierende Veränderung des Herzkranzgefäßsystems. Dabei kommt es zu einer Divergenz zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, wodurch Stenosen von >75% hämodynamisch relevant werden, so dass es zu einer klinischen Symptomatik kommen kann.<sup>56</sup> Die eintretende Myokardischämie kann sich als Herzrhythmusstörung, stabile Angina pectoris oder akutes koronares Syndrom mit instabiler Angina pectoris, plötzlichem Herztod oder akutem Myokardinfarkt äußern. Letztendlich kann daraus eine Herzinsuffizienz resultieren.<sup>58</sup>

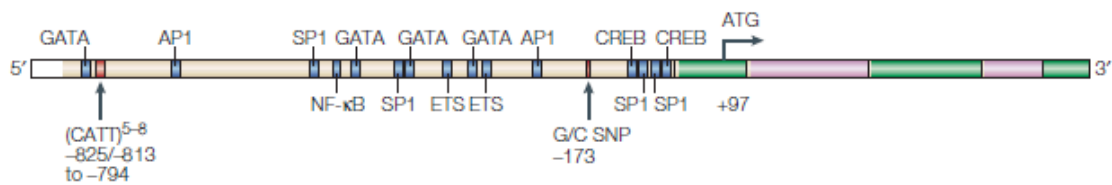
Über 20% der Todesfälle in Deutschland sind auf eine koronare Herzkrankheit zurückzuführen. Die Lebenszeitprävalenz liegt dabei für Männer bei 30% und für Frauen bei 15%, wobei die Inzidenz im Alter zunimmt. Erstmanifestation einer koronaren Herzkrankheit ist in 50% der Fälle ein akutes Koronarsyndrom und in 40% der Fälle eine Angina pectoris.<sup>57</sup>

## 1.2. Molekulargenetik des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF)

Das für MIF kodierende Gen liegt auf Chromosom Nr. 22 (22q11.2) und ist in der Literatur auch als „Glycosylation Inhibiting Factor“ (GIF) bekannt.<sup>20, 37</sup> Das Gen besteht aus drei Exons mit 107, 172 und 68 Basenpaaren, sowie zwei Introns mit 188 und 94 Basenpaaren.<sup>110</sup> An seinem 5´Ende befinden sich einige DNA- Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren. Diese sind das „Activator Protein 1“ (AP1), der „Nuclear factor κB“ (NF-κB), ETS, GATA-4, SP1 und das „cAMP response element binding protein“ (CREB). (Abb. 1)

Bisher sind zwei Polymorphismen des humanen MIF-Gens an Position 794(CATT- Tetranucleotidsequenz mit 5 bis 8 Wiederholungen) und ein „G-to-C-single nucleotid“- Polymorphismus (SNP) an Position 173 bekannt, die zum einen mit rheumatoider Arthritis und zum anderen mit juveniler idiopathischer Arthritis assoziiert sind.





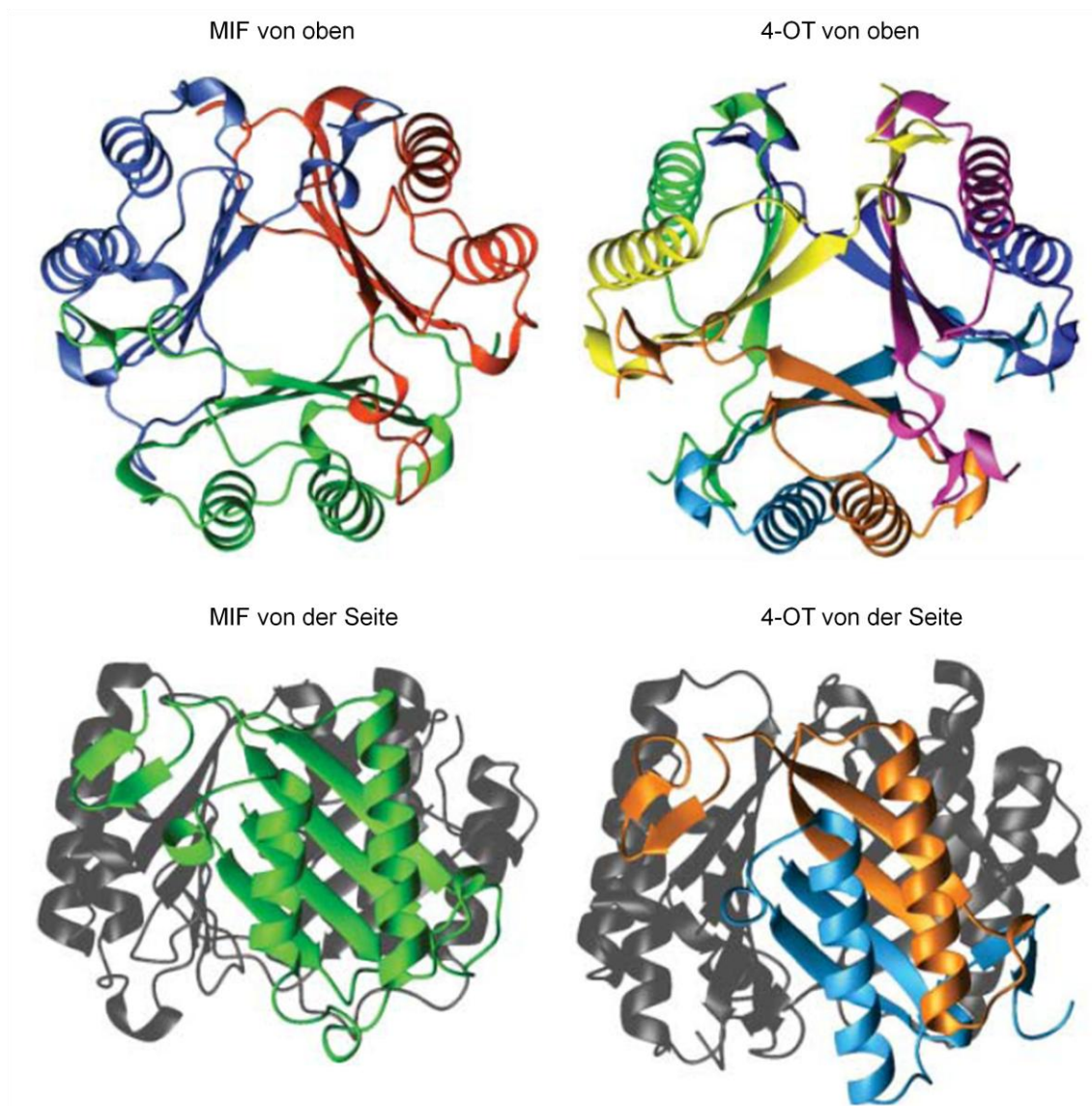
**Abbildung 1: Struktur des humanen MIF-Gen.**<sup>110</sup> Das Gen besteht aus drei Exons (grüne Boxen) mit 107, 172 und 68 Basenpaaren, sowie zwei Introns (pinke Boxen) mit 188 und 94 Basenpaaren. An seinem 5' Ende befinden sich einige DNA-Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren. Diese sind das „Activator protein 1“ (AP1), der „Nuclear factor κB“ (NF-κB), ETS (Protein-C-ets-), GATA-4 (erythroid transcription factor), SP1 (Transkriptionsfaktor) und das „cAMP response element binding protein“ (CREB).

### 1.2.1. Molekulare Struktur des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF)

MIF hat ein Molekulargewicht von 12,5 kDa und ist ein Monomer aus 114 Aminosäuren. In der Sekundärstruktur bilden sich 2 antiparallele  $\alpha$ -Helices und 6  $\beta$ -Stränge aus.<sup>61</sup> Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde die dreidimensionale Struktur von MIF, nämlich ein Homotrimer, entschlüsselt, wobei 3  $\beta$ -Faltblätter von 6  $\alpha$ -Helices derart umgeben sind, dass sie einen positiv elektrostatischen Tunnel bilden.<sup>61, 62</sup>

Durch einen hydrophoben Kern und Wasserstoffbrücken zwischen den Monomeren wird die dreidimensionale Struktur gefestigt. Dabei existiert eine dreidimensionale homologe Struktur zwischen MIF und den mikrobiellen Enzymen Chorismatmutase, 5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconatisomerase (CHMI) und 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT)<sup>63, 64</sup> (Abb. 2).

Bei CHMI und 4-OT existiert wie bei MIF die katalytische Base Prolin am N-Terminus und ist für die katalytische Aktivität essenziell.<sup>65</sup> Obwohl sich MIF und die bakteriellen Enzyme sehr ähneln, besitzen sie dennoch keine homologen Sequenzen.



**Abbildung 2: Dreidimensionale Strukturen von MIF und eine bakterielle Isomerase.**<sup>110</sup> MIF von oben, MIF von der Seite, 4-Oxalocrotonatautomerase (4-OT)Hexamer von oben und von der Seite. Die Zylinder sind die 6  $\alpha$ -Helices und die  $\beta$ -Stränge werden mit ihrer jeweiligen Richtung durch die Pfeile dargestellt. Zusammen bilden 3  $\beta$ -Faltblätter und 6  $\alpha$ -Helices einen elektrostatischen Tunnel.

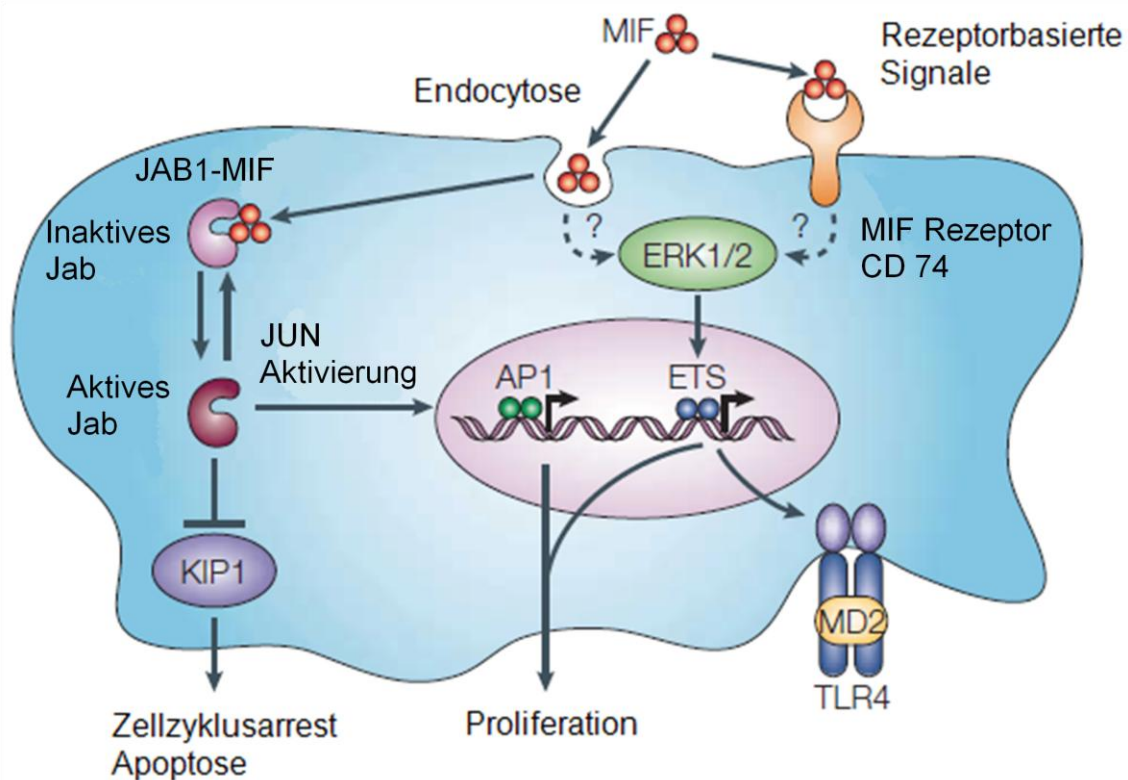
### 1.3. Synthese und Expression von MIF

MIF wird kontinuierlich exprimiert, intrazellulär in Vesikeln gespeichert und benötigt zur Sekretion kein *de novo* gebildetes Protein, da MIF in intrazellulären Speichern vorliegt. Die Expression von MIF wurde bereits in Monozyten, dendritischen Blutzellen, B-Zellen, glatten Muskelzellen, sowie in neutrophilen, -eosinophilen und basophilen- Zellen nachgewiesen.<sup>39, 40, 41</sup>

#### 1.3.1. MIF als Modulator intrazellulärer Signalkasaden

Zytokine binden meist an verwandte Rezeptoren, die von den Zielzellen exprimiert werden und aktivieren darüber Signalkaskaden, Gentranskriptionen und nachgeschaltete Effektormoleküle. Jedoch galt MIF lange Zeit als ein T-Zell spezifisch sezerniertes Zytokin. Dabei ging man davon aus, dass die T-Zellen der größte zelluläre Produzent von MIF im Immunsystem seien.<sup>51</sup> Darüber hinaus besitzt es auch hormontypische Eigenschaften. MIF aktiviert die extrazellulär- signalregulierte Kinase(ERK1/ERK2) und bindet zudem an die extrazelluläre Domäne des CD74 Oberflächenantigens. (Abb. 3)

Das CD74 ist eine invariante Kette des MHC-Klasse-II- Proteins und ist für die Transportregulierung der Klasse-II-Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zuständig.<sup>45</sup> Bei Studien MIF-stimulierter Fibroblasten zeigte sich eine durch MIF induzierte Phosphorylierung und Aktivierung der Zellproliferation und der ERK1-ERK2-MAPK-Signalkaskade.<sup>66</sup> Die Aktivierung von ERK1/ERK2 und die Synthese von Prostaglandin durch MIF benötigen jeweils die Anwesenheit von CD74.<sup>45</sup> (Abb. 3)

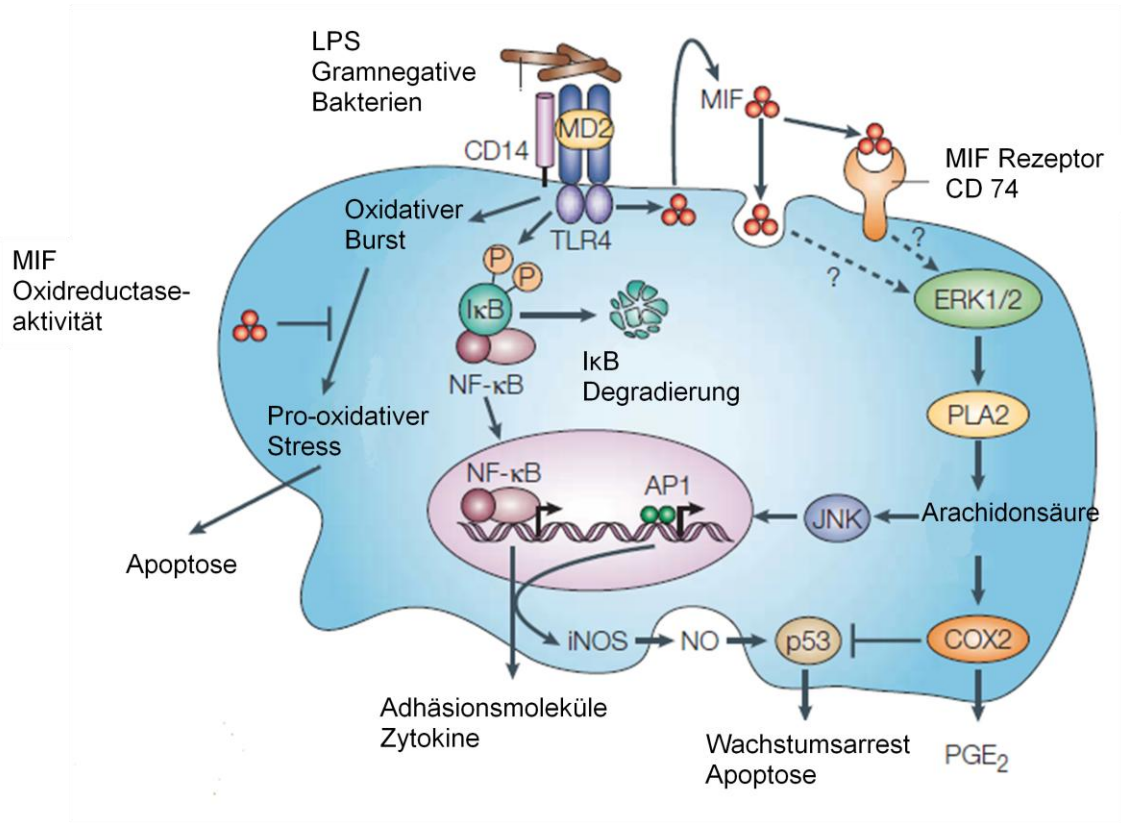


**Abbildung 3: Signalkaskade von MIF.**<sup>110</sup> Der Makrophagen- Migrations- Inhibitionsfaktor vermittelt seine biologische Aktivität über einen klassischen rezeptorvermittelten Signalweg oder über einen endozytotischen Signalweg. In der Abbildung sieht man die Anbindung von MIF an CD74 und die Phosphorylierung des extrazellulär signalregulierenden Kinase Proteins (ERK1/ERK2). MIF fördert das Zellwachstum und aktiviert die Transkriptionsfaktoren der ETS Familie, die eine wichtige Rolle bei der Expression des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) Gens spielen. Dieser wiederum verschlüsselt das Signaltransduktionsmolekül für den Lipopolysaccharid- Rezeptor- Komplex (LPS). MIF bindet an das JUN- activation domain- bindingprotein 1 und verhindert die JAB1 induzierte Aktivierung von JUN und JAB-1, die wiederum den Abbau des Zellproliferierenden Inhibitor KIP1 induzieren, welches für den Zellzyklus und die Apoptose verantwortlich ist.

### 1.3.2. MIF als Modulator intrazellulär- inflammatorischer Signalkaskaden

Diese Kaskade ist mit der cytoplasmatischen Phospholipase A2 (PLA2) assoziiert und bestimmt deren wichtige Enzymaktivität für die pro-inflammatorische Kaskade. Diese beinhaltet die Produktion von Arachidonsäure, Prostaglandinen und Leukotrienen und verfügt damit über einen Einflussfaktor auf den anti-inflammatorischen Effekt von Glucocorticoiden.<sup>23, 46</sup> Weitere Einflüsse bestehen darüber hinaus auf die Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6.<sup>22</sup> MIF ist ein Glykosylierungsinhibitionsfaktor (GIF), hat eine suppressive Wirkung auf die IgE Synthese und die antigenspezifische Suppressoraktivität.<sup>38</sup>

Dabei kann MIF über Pinozytose in den intrazellulären Raum gelangen und als Vesikel gespeichert werden.(Abb. 4) MIF reguliert zudem die Expression des Toll-like receptor (TLR4), der ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems darstellt und somit Zugriff auf die körpereigene antimikrobielle Abwehr besitzt.<sup>47,</sup><sup>48</sup> MIF ist demnach ein integraler Bestandteil des antimikrobiellen Systems und der Stressantwort des menschlichen Körpers.<sup>31</sup> (Abb. 4)

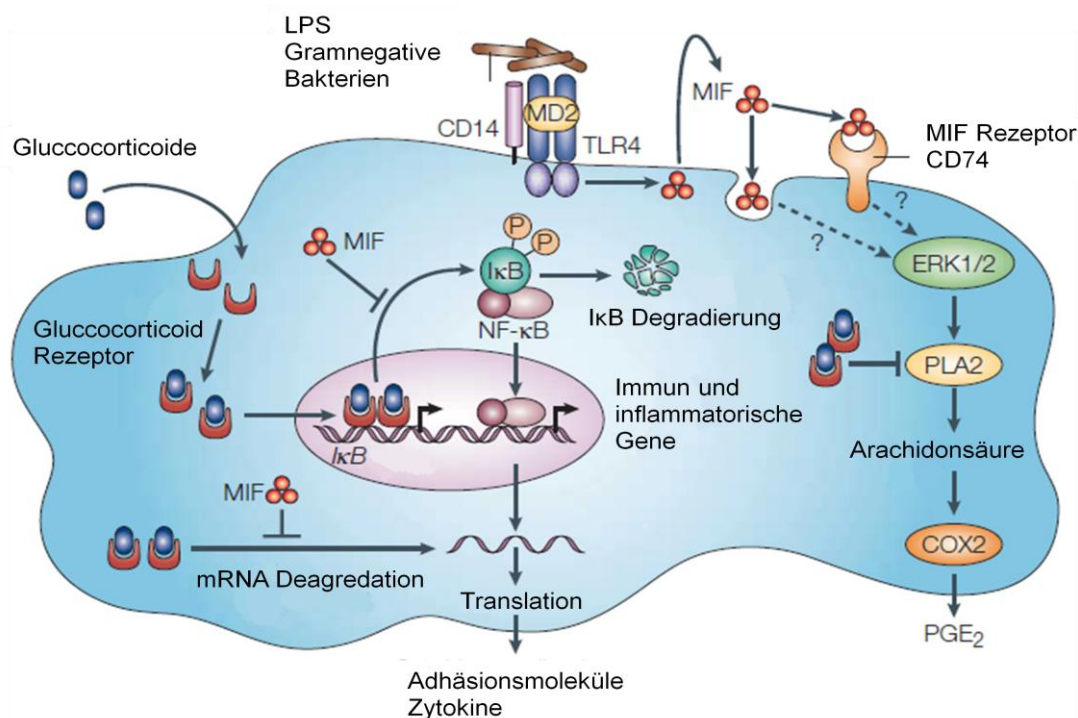


**Abb. 4:** Die Induzierung und Regulierung der inflammatorischen Antwort beim angeborenen Immunsystem durch MIF. Durch MIF wird die Expression von TLR4 hochreguliert, was den Makrophagen eine schnelle Antwort auf endotoxinhaltige Bakterien erlaubt. Dadurch kommt es zu einer Förderung der Produktion von Zytokinen, MIF, NO und anderen Mediatoren. Nach der Sezernierung aktiviert MIF die ERK1/ERK2, die cytoplasmatische Phospholipase A2 (PLA2), Arachidonsäure, die JUN- N-terminale Kinase (JNK) Aktivität und Prostaglandin E2 (PGE2). Durch die Erzeugung einer Oxidoreductaseaktivität und der Cyclooxygenase 2 verhindert MIF die Aktivitätsinduzierte Apoptose durch p53.



### 1.3.3. MIF als Zytokin und inflammatorischer Mediator

MIF beeinflusst und fördert die pro-inflammatorische Funktion von Immunzellen. Durch den Gebrauch von defizitären MIF-Zellen, MIF-spezifischer Antikörper und rekombinanten MIF wurde beschrieben, dass MIF direkt oder indirekt die Produktion und Expression von TNF, IFN, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und dem Makrophagen inflammatorischen Protein 2 beeinflusst.<sup>50, 51, 52, 53</sup> Des Weiteren induziert MIF auch diverse Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren.<sup>54, 55</sup> Als Faktoren, die auch zu einer Stimulierung von MIF führen, gehören Exotoxine, Endotoxine, Lipopolysaccharide (LPS), Toxic-shock-syndrom-toxine-1 (TSST-1), proinflammatorische Effektormoleküle, Hypoxämie und oxLDL.<sup>40</sup>



**Abb. 5: MIF als gegenregulierender Faktor auf die immunsuppressiven Effekte der Glucocorticoide und die transkriptionellen und posttranskriptionellen Spiegel.<sup>110</sup>** MIF inhibiert die Glucocorticoidvermittelte Induktion auf die inhibierende nukleäre Faktor IκB- Synthese und der RNA- Destabilisierung. Desweiteren kommt es zu einer Überschreitung der glucocorticoidvermittelten Inhibition der PLA2- Aktivität, der Arachidonsäureproduktion und der induzierbaren Nitratoxid Synthase (iNOS). Die Nitratoxid Synthase (NOS) steht mit atherosklerotischen Läsionen in Verbindung.

## 1.4. Atherosklerose und MIF

### 1.4.1. Atherogenese

Ausgehend von der „Response-to-Injury“-Hypothese handelt es sich bei der Atherosklerose um eine chronisch- progressive Erkrankung der Gefäße, die durch Endothelläsionen eingeleitet wird. Charakteristisch sind hierbei Plaquebildung mit darunter liegenden Fissuren, sowie Erosionen und Rupturen der Plaques bis hin zu einem kompletten Gefäßverschluss.<sup>101</sup> Dabei sind arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas und Bewegungsmangel mit der Entstehung der Atherosklerose assoziiert und stellen die wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar.<sup>102</sup>

**Endotheliale Dysfunktion:** Die oben genannten Risikofaktoren führen zu einem Endothelschaden mit Endotheldysfunktion. Durch die gesteigerte Endothelpermeabilität kommt es zu einer Einwanderung von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) und Apolipoproteinen in das intimale Bindegewebe. Dabei oxidiert LDL unter dem Einfluss von 12/15-Lipoxygenase (12-LO) und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu minimal oxidierten LDL (MO-LDL) und lagert sich ab.<sup>103</sup>

**Inflammatorische Phase:** Durch die Akkumulation von mO-LDL (minimal oxidized LDL) werden die Endothelzellen zur Produktion von Chemokinen stimuliert. Dies geschieht durch das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und durch Adhäsionsmoleküle wie den E- und P-Selektinen. Desweiteren sind auch das C-reaktive Protein (CRP), pro-inflammatorische Zytokine und Metalloproteinasen involviert.<sup>1, 2</sup> Die Interaktion endothelialer Zellen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten besitzen eine bedeutende Funktion in der Aufrechterhaltung eines pro-inflammatorischen und prothrombotischen Milieus, die in Folge dessen zu einer Thrombozyteninstabilität und einhergehenden atherothrombotischen Ereignissen führen können.<sup>3, 4</sup>



**Schaumzellen und Lipidflecken (fatty streaks):** Oxidierende Enzyme wie die reaktive ROS, die Sphingomyelinase und Myeloperoxidase, oxidieren das LDL zu hoch oxidiertem LDL (Ho-LDL). Durch Bindung an Scavenger-Rezeptoren wird das Ho-LDL von Makrophagen aufgenommen und Schaumzellen entstehen. Die Expression der Scavenger-Rezeptoren auf den Makrophagen wird durch TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und T-Lymphozyten stimuliert.<sup>104</sup> Durch den Zerfall der Schaumzellen kommt es zur Freisetzung von extrazellulären Lipiden und Débris in der Intima.<sup>105</sup>

**Fibröse Plaques:** Homocystein und Angiotensin II regen die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen im Gefäß an. Die stimulierten T-Lymphozyten und Makrophagen sezernieren Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). INF- $\gamma$  regt wiederum die Proliferation von glatten Muskelzellen an, die in der Intima eine extrazelluläre Matrix sezernieren und somit zu fibrösen Plaques führen.<sup>105, 106, 107</sup> Die durch Muskel- und Endothelzellen sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) können eine stabile atherosklerotische Läsion rupturieren lassen. Bei fortgeschrittenen inflammatorischen Prozessen, wie zum Beispiel bei einer Ruptur der Intima, konnte ein erhöhter Pegel an zirkulierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP) während des Ereignisses nachgewiesen werden.<sup>5, 6</sup>

**Komplexe Läsionen und Thrombosen:** Durch verschiedene Kollegenasen, Gelatinasen, Cathepsine und Stromolysin kommt es zur Matrixdegradation. Darauf entwickeln sich vulnerable Plaques mit einer fibrösen Kappe. Durch fortschreitende Destabilisierung erfolgt die Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur mit Freilegung von Tissue-Factor aus dem nekrotischen atheromatösen Kern.<sup>105, 108, 109</sup>

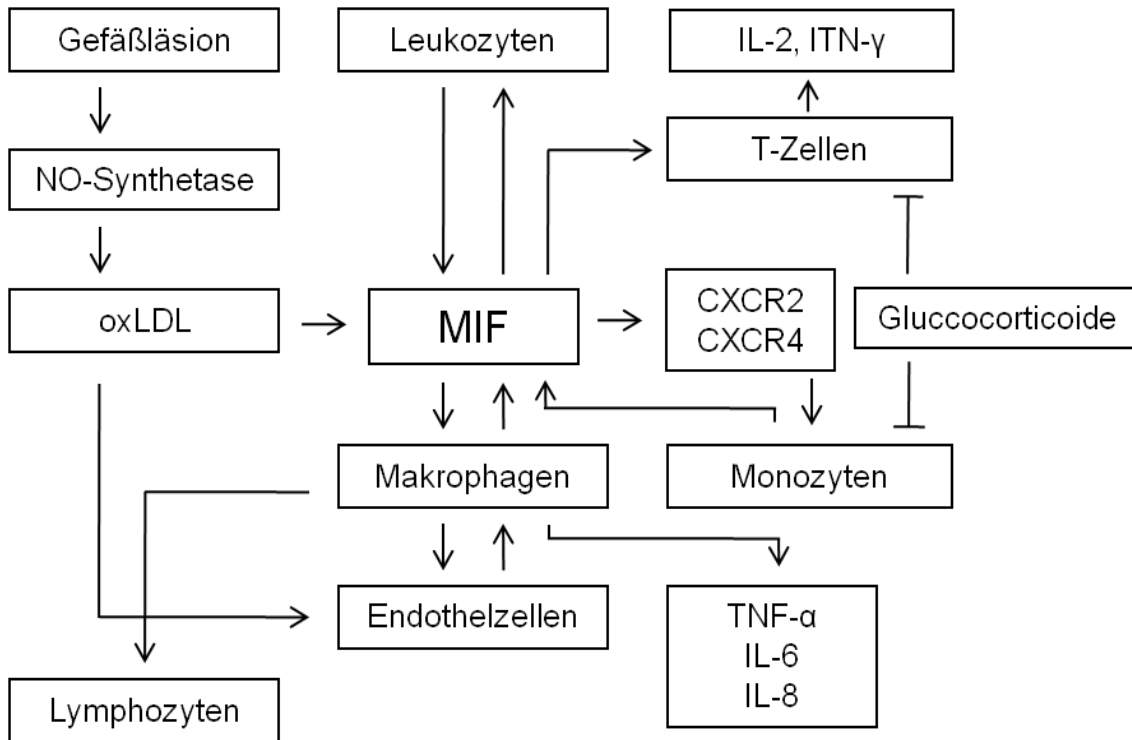
### 1.4.2. MIF in der Atherogenese

Bei Patienten mit koronarischämischen Ereignissen werden erhöhte MIF-Konzentrationen genannt und des Weiteren über eine Assoziation von MIF mit Plaqueinstabilitäten berichtet.<sup>10, 24, 25</sup> Eine Funktion von MIF besteht in der atherogenen Rekrutierung von Leukozyten und der Aktivierung der beiden Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4. Dadurch werden wiederum die inflammatorisch wirkenden Monozyten und Lymphozyten stimuliert.<sup>28, 29, 30, 111</sup>

Demnach wird in verschiedenen humanen Zellen bei atherosklerotischen Läsionen vermehrt MIF gebildet.<sup>32, 33</sup> Dieser Zusammenhang wird auch in Studien genetischer Antikörperhemmung beschrieben.<sup>34</sup> In kultivierten humanen vaskulären Endothelialzellen wird durch die Stimulierung mit oxidiertem LDL eine erhöhte Expressierung von Makrophagen und MIF beobachtet. Die Expressierung von MIF konnte dabei in allen Stadien nachgewiesen werden und scheint eine wichtige Funktion in der frühen Phase der Atherosklerose darzustellen.<sup>32</sup>

Bei MIF- $LDL^{-/-}$ -Mäusen kam es in der Folge zur Reduktion der glatten Muskelzellproliferation, der Lipide, Cathepsin und den Matrixmetalloproteinasen.<sup>112</sup> Durch eine Antikörperhemmung von MIF an ApoE $^{-/-}$  Mäusen konnte die intimale Infiltration von Makrophagen um 75% gesenkt werden und eine Reduzierung der Plaquefläche beobachtet werden.<sup>113</sup>

Bei ApoE $^{-/-}$ -Mäusen mit etablierten atherosklerotischen Läsionen wurde ein Rückgang der Plaques, der Monozyten und der T-Zellen in der atherosklerotischen Läsion beobachtet. Durch diese Studien konnte aufgezeigt werden, dass MIF als nichtverwandter CXCR-Ligand eine führende Rolle in der Rekrutierung von Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Zellen spielt. Die proatherosklerotischen Effekte von MIF sind vermutlich auf seine chemotaktischen und zellarretierenden Funktionen zurückzuführen.<sup>114</sup>



**Abb. 6:** Interaktion von MIF in der Atherogenese und in inflammatorischen Prozessen. Die modulatorischen Einflüsse von MIF auf diverse Zellen sind vielfältig. IL-2 = Interleukin-2, IL-6 = Interleukin-6, IL-8 = Interleukin-8, ITN-γ = Interferon-γ, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α, CXCR2 und CXCR4 = Chemokinrezeptoren, oxLDL = oxidiertes LDL, NO = Stickstoffmonoxid.

### 1.5. MIF bei diversen Krankheiten

In der Literatur wird MIF aktuell in vielen pathophysiologischen Prozessen beschrieben. Dazu zählen die Sepsis, autoimmune und inflammatorische Erkrankungen, Atherosklerose und das polyzystische Ovarialsyndrom.<sup>7, 8, 9, 87</sup> Als weiterer MIF- assoziierter Parameter gilt die Adipositas, bei der es zu erhöhten MIF-Konzentrationen kommt.<sup>21</sup> Desweiteren wurde erhöhte Expressionswerte bei Lupus erythematosus<sup>75</sup>, Otitis<sup>76</sup>, Iridocyclitis<sup>77</sup>, Uveitis<sup>78</sup>, Multipler Sklerose<sup>79</sup>, Pancreatitis<sup>80</sup>, Typ-II Diabetes<sup>81</sup>, systemischer Sklerosis<sup>82</sup>, Psoriasis<sup>83</sup>, Dermatitis<sup>84</sup> und Glomerulonephritis<sup>85, 86</sup> vorgefunden.

MIF besitzt außerdem herabregulierende Eigenschaften auf das Tumorsuppressor-Gen p53 und gilt damit als Schaltstelle zwischen Inflammation, Zellwachstum und Tumorgenese.<sup>49</sup> Für diverse Primärtumoren und Tumorzelllinien ist zudem eine gesteigerte MIF-Expression charakteristisch.<sup>72</sup> Demnach inhibitiert MIF die NO-induzierte intrazelluläre Akkumulation von p53 und den Mechanismus der p53 vermittelten Apoptose. Weitere Untersuchungen berichten diesbezüglich auch über eine Assoziation von MIF mit dem E2F-p53 Mechanismus, wobei MIF sowohl das Wachstum der gesunden als auch der malignen Zellen stimulieren soll.<sup>73, 74</sup> In einigen tier- und zellexperimentellen Versuchen konnte die Elimination von MIF zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen und lässt die Vermutung zu, dass MIF einen maßgeblichen Einfluss auf das Voranschreiten oder Persistieren einer Erkrankung hat.

Patienten mit einem bestehenden Diabetes mellitus und Personen mit gesteigerten oxidativen Stressparametern verfügen des Weiteren auch über einen hohen MIF-Plasmaspiegel.<sup>27, 34</sup> Dieser oxidative Stress bewirkt über einen NF-κB vermittelten Mechanismus eine Steigerung der MIF-Expression.<sup>35, 36</sup>

### 1.6. MIF bei Stoffwechselerkrankungen

Zu den wichtigsten und zugleich häufigsten Stoffwechselerkrankungen gehören die Adipositas, die Glucoseintoleranz, Typ2- Diabetes und die Atherosklerose. All diese Stoffwechselerkrankungen sind hochgradig mit dem Entstehen kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert.<sup>93</sup> Einige klinische Studien konnten eine Kausalität zwischen einer Insulinresistenz, einer chronischen Entzündung und der Masse des Körperfettgewebes etablieren.<sup>94, 95</sup> Dabei kann mit Monozyten und Makrophagen infiltrierte Körperfettgewebe proinflammatorische Zytokine, CRP und Fibrinogen freisetzen. Dieser Mechanismus kann zu einer Entwicklung einer typischen Vaskulopathie in Form einer Arteriosklerose führen.<sup>95</sup> Eine weitere Eigenschaft von MIF ist zudem die Vermittlung von Insulinresistenzen im Fettgewebe.<sup>96</sup>

Es gibt viele Gründe, um davon auszugehen, dass MIF in der pathologischen Abfolge einer Adipositas und eines metabolischen Syndroms involviert ist. Es wurde schon über eine Erhöhung der zirkulierenden MIF- Konzentrationen im Blutserum von Typ2- Diabetikern berichtet.<sup>81</sup> Des Weiteren wurde bereits ein starker Zusammenhang zwischen der systemischen MIF- Konzentration und einer Glucoseintoleranz beschrieben. Demnach ist die erhöhte Expressierung eines MIF- Allels mit einem signifikant gesteigerten Risiko einer Glucoseintoleranz assoziiert.<sup>97</sup>

In einer interventionellen Studie an 71 übergewichtigen Probanden, die an einem Diätprogramm teilnahmen, korrelierten hohe MIF- Konzentrationen mit einer  $\beta$ -Zelldysfunktion. In Folge des Diätprogramms sanken die MIF- Spiegel der Probanden signifikant.<sup>98</sup> In einer veröffentlichten Tiermodell-Studie wurde bereits die fördernde Rolle von MIF auf die Entwicklung einer Insulinresistenz und einer Arteriosklerose beschrieben, wobei MIF von den Autoren als potentielles therapeutisches Ziel in metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen angesehen wird.<sup>99</sup>

### 1.7. Endokrine Eigenschaften von MIF

MIF besitzt einen circadianen Rhythmus und ist ständig in einer bestimmten Konzentration im Blut vorzufinden.<sup>67</sup> Untersuchungen mit MIF auf neuronaler Ebene haben ergeben, dass MIF in der kompletten HPA-Region vorhanden ist und darüber hinaus in Neuronen nachgewiesen werden konnte.<sup>70</sup> Des Weiteren wurde beschrieben, dass MIF in einer Zelllinie der corticotropen Hypophyse durch einen Reiz mit LPS ausgeschüttet wird.<sup>69</sup> Demnach kann MIF durch eine Injektion von LPS sehr zügig freigesetzt werden und seine Wirkungen entfalten.<sup>14</sup>

In diesem Zusammenhang verfügen die endokrinen Systeme wie der Hypothalamus, die Hypophyse und die Adrenaldrüse bei Stress über ein erhöhtes MIF-Level.<sup>42, 43, 44</sup> Dies spielt eine nicht unerhebliche Rolle in Bezug auf starke körperliche Reaktionen, wie z.B. bei einem Schock oder einem akuten kardialen Ereignis. In der Hypophyse liegt MIF gemeinsam mit dem Hormon Thyreotropin und dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) in Vesikeln vor.<sup>71</sup> Ferner befindet sich MIF auch in den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse und liegt dort zusammen mit Insulin vor. Dabei steigt bei Gabe eines rekombinanten MIF die Insulinsekretion beträchtlich an und es kommt zu einer vermehrten MIF-Sekretion.<sup>68</sup>

Eine entscheidende Funktion von MIF neben der Stimulierung von Makrophagen ist der antiinflammatorische Effekt durch die Inhibition der Glucocorticoide. Dabei konnte durch eine *in vivo* Injektion von MIF der schützende Effekt der Glucocorticoide aufgehoben werden. Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung inflammatorischer Zytokine und Monozyten, die sonst durch die Wirkung von Glucocorticoiden supprimiert werden. Darüber hinaus konnte anhand eines *in vitro* Modells eine Stimulierung von MIF produzierenden Makrophagen durch Hinzufügen von Dexamethason und Cortisol beobachtet werden.<sup>22, 92</sup>

### 1.8. MIF bei weiteren kardiovaskulären Prozessen

Bei Mäusen mit ausgeschaltetem MIF-Gen und einer künstlich induzierten koronaren Ischämie konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße, der Kardiomyozytenapoptose, sowie der Infiltration neutrophiler Zellen und Makrophagen aufgezeigt werden. Die Phosphorylierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), der nukleare Bestandteil des NF- $\kappa$ B p65, sowie die TLR-4-Expression sind ebenfalls signifikant reduziert worden.<sup>59, 90</sup>

In einem Rattenmodell konnte durch eine Inaktivierung von MIF eine Reduzierung der inflammatorischen Antwort des Herzens und eine Verbesserung der myokardialen Dysfunktion berichtet werden.<sup>60</sup> Untersuchungen an embryonalen Kardiomyozyten unter chronischer Hypoxie weisen gesteigerte MIF-Konzentrationen nach.<sup>26</sup>

Während einer Ischämie und der darauf folgenden Inflammation kommt es durch eine gesteigerte Expression von MIF zu einer Aktivierung des AMPK-Leitungsweg, der eine entscheidende kardioprotektive Funktion inne hat.<sup>89, 90</sup> MIF stimuliert zudem die Phosphorylierung der Stresskinasen p38MAPK und JNK und induziert hierdurch eine Apoptose der Kardiomyozyten. Es konnte in einem Tiermodell aufgezeigt werden, dass eine Inaktivierung von MIF die proinflammatorische Reaktion reduziert und das Überleben von Kardiomyozyten verbessert.<sup>36</sup>

### 1.9. Fragestellung

MIF ist ein pro-atherosklerotischer Faktor, der *in vitro* und im Tiermodell über verschiedene Wege die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose fördert. Bisher ist aber nur wenig über die klinische Bedeutung der MIF-Spiegel im peripheren Blut bei kardiovaskulären Erkrankungen bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Konzentration von MIF im peripheren venösen Blut bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zu messen und seine Assoziation mit den verschiedenen bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren ebenso wie mit inflammatorischen Markern zu untersuchen, um eine Aussage über eine mögliche Rolle von MIF als Bio-Marker für die koronare Herzerkrankung treffen zu können und so seine prognostische Vorhersagekraft zu evaluieren.



## 2. Material und Methodik

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Patientenkollektiv

In einer fortlaufenden klinischen Studie wurden 286 Patienten am Universitätsklinikum Tübingen rekrutiert, um die Assoziation von MIF mit inflammatorischen Markern und der Thrombozytenfunktion unter antithrombozytärer Therapie zu evaluieren. Alle Patienten mit einer symptomatisch koronaren Herzerkrankung sind einer koronaren Stentimplantation unterzogen worden.

In der Studie sind alle Patienten mit Acetylsalicylsäure (ASS) vorbehandelt und es wurde bei allen, vor und nach der Behandlung mit einer Initialdosis von 600 mg Clopidogrel, eine Analyse der Thrombozytenfunktion durchgeführt. Im weiteren Verlauf erhielten die Patienten eine Erhaltungstherapie mit 75mg/d Clopidogrel und 100 mg/d ASS.

Ein ACS ist durch Anwesenheit folgender Parameter diagnostiziert worden:

- Instabile Angina Pectoris mit klinischer Symptomatik und neuen EKG Veränderungen ohne myokardiale Nekrosemarker
- Akuter Myokardinfarkt mit myokardialen Nekrosemarkern (Troponin I oder Creatinkinase (CK))
- ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI)
- Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (NSTEMI)

Im Studienverlauf ist zudem noch folgende Gruppe rekrutiert worden:

- Eine gesunde Kontrollgruppe mit 25 Probanden

**2.1.2. Studienprotokoll**

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt. Einschlusskriterien waren ein Alter > 18 Jahre, sowie eine schriftliche Einverständniserklärung.

**2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial**

1. Sarstedt S-Monovette Coagulation 9ml K3E  
SARDEDT Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
2. Venisystems Butterfly – 21  
ABBOTT IRELAND, Sligo, Rep. of Irland
3. Multi- Adapter  
SARDEDT Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
4. Pipetten Eppendorf Reference  
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
5. Pipettenspitzen  
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
6. 1,5ml Microcentrifuge Tube  
neoLabMigger Laborbedarf - Vertriebs GmbH  
Heidelberg, Deutschland
7. Zentrifuge HeraeusMultifug 3S+  
Georg Kästner Rottenbug Deutschland
8. Human MIF ELISA Kit  
Ray Biotech, Inc.
9. Bio-Plex cytokine assay  
Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, VereinigteStaaten
10. Immunoturbidimetric assay ADVIA 1800 chemistry analyzer  
Siemens Medical Solutions, Deutschland
11. BIO-RAD MODEL 550 Microplate Reader  
Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, VereinigteStaaten

12. Microplate Manager 4.0  
Bio-Rad Laboratories (UK), Ltd.
13. Microsoft Windows XP Professional  
Redmond, Vereinigte Staaten
14. Statistikprogramm SPSS 18  
SPSS, Inc., Chicago, IL, Vereinigte Staaten

## 2.2. Methodik

### 2.2.1. Blutprobenvorbereitung der Kontrollgruppe

Bei den Patienten und der gesunden Kontrollgruppe wurden peripher- venöse Blutproben in EDTA- Blutröhrchen entnommen. Diese wurden für 30 Minuten bei Zimmertemperatur gelagert und anschließend bei 25° C 15 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugiert. Danach wurde das entnommene EDTA- Plasma bei - 80°C bis zur Messung gelagert.

### 2.2.2. Blutprobenverarbeitung der Studiengruppe

Die Proben der Studiengruppe wurden unter Adenosindiphosphat induzierter (ADP) und Arachidonsäure induzierter Thrombozytenaggregation im Impedanzaggregometrie-Verfahren gemessen. Dieses Testverfahren hat sich zur Beobachtung der Thrombozytenaggregationshemmung als geeignet erwiesen. Die Proben sind zu 2 unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden. Die erste Blutentnahme erfolgte nach der diagnostischen Angiographie und unmittelbar vor der perkutanen Koronarintervention (PCI). Die zweite Blutentnahme erfolgte durch eine Venenpunktion am ersten Tag nach der PCI, nach Einnahme der ersten Erhaltungsdosis Clopidogrel und der Standarddosis ASS (100 mg).

ADP und Arachidonsäure sind jeweils im Verhältnis 1:2 mit antikoagulierten Vollblut, Hirudin und 0,9% NaCl verdünnt worden. Nachdem die Küvetten bei 37°C drei Minuten gerührt wurden, konnte die Impedanz für 5 Minuten kontinuierlich mit dem MEA Verfahren aufgezeichnet werden. Die Ergebnisse sind als Fläche unter der Kurve ausgewertet. Ein niedriges Ansprechen auf Clopidogrel wurde mit einer relativen Thrombozytenaggregation <10% definiert. Da die meisten Patienten vor der Aufnahme in die Studie schon unter ASS Medikation standen, wurde die residuelle Thrombozytenaggregation in Tertile eingeteilt.

### 2.2.3. Messung der inflammatorischen Marker

Die Serum- und Plasmaproben sind zum Zeitpunkt der koronaren Intervention entnommen und bei Raumtemperatur für 15 min bei 1500xg zentrifugiert worden. Die Überstände wurden eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Messung bei -80°C aufbewahrt. Interleukin-6 (IL-6), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und RANTES-Pegel sind über einen Bio-Plex Zytokin Testverfahren bestimmt worden. Bei den Proben sind des Weiteren über ein immunoturbidimetrisches Testverfahren die Pegel des C-reaktiven Protein (CRP) bestimmt worden.

### 2.2.4. Verfahrensweise des MIF- ELISA

Die Proben werden herausgestellt und auf Raumtemperatur gebracht. Im folgenden werden 8 ml Diluent B und 32 ml dest. H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:5 verdünnt und mit der Herstellung einer BIO WASH Lösung begonnen. Dabei werden 20 ml Wash + 380 ml dest. H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:20 verdünnt. Zu Recombinat Human MIF werden 400 µl verdünntes Diluent B hinzugegeben und dem Detection Antibody MIF entsprechend 100 µl verdünntes Diluent B zugefügt.

Das verdünnte ITEM F vortexen und 100 µl verdünntes ITEM F mit 7900 µl verdünntem Diluent B mischen. Im weiteren Verlauf wird das HRP-Streptavidin Concentrate geschüttelt und im Verhältnis 1:15000 verdünnt.

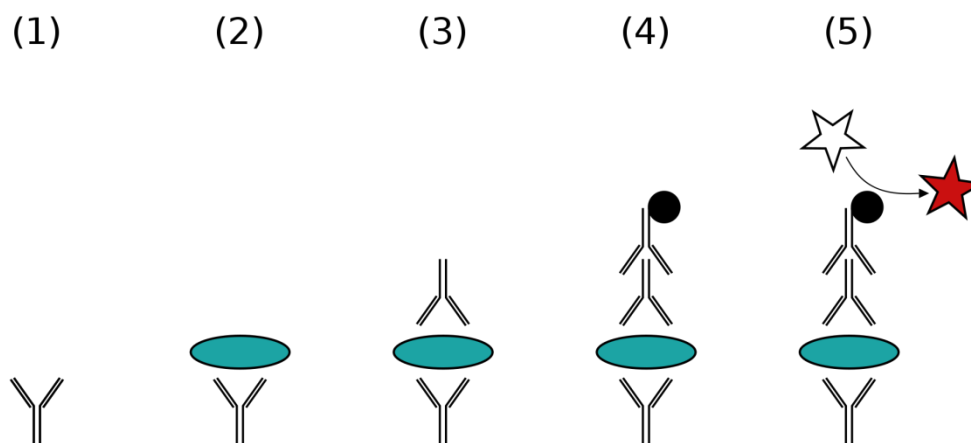
Als nächster Schritt erfolgt die Herstellung einer Standardreihe von 6000 pg/ml bis 0 pg/ml. Nun wird in jedes Well 100 µl EDTA- Plasma hinein pipettiert. Anschließend wird die ELISA-Platte abgeklebt und 150 min bei 450 U/min in den Vortexer gegeben. Nach dem vortexen werden die Wells 4x mit 300 µl Washsolution gespült. Im folgendem kommen 100 µl Antikörper Detection in jedes Well. Diese werden 60 min bei 450 U/min in den Vortexer gelegt.

Nach dem Vortexen werden die Wells 4x mit 300 µl Washsolution gespült. Danach kommt in jedes Well 100 µl Streptavidin. Anschließend werden die Proben 45 min lang bei 450 U/min geschüttelt. Nach dem Vortexen werden die Wells 4x mit 300 µl Washsolution gespült. Im Anschluss wird in jedes Well 100µl TMB One-Step Substrate Reagent zugegeben. Im vorletzten Schritt kommen die Proben bei Dunkelheit 30 min mit 450 U/min in den Vortexer. Zuletzt werden 50 µl Stop Solution in jedes Well zugegeben und zügig bei 450 nm im Microplate Reader ausgewertet.

### 2.2.5. MIF- ELISA Analyse

Der in dieser Arbeit verwendete Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) benutzt zwei Antikörper, die spezifisch an das nachzuweisende MIF- Antigen binden können. Ein Antikörper befindet sich dabei als Beschichtung auf der Mikrotiterplatte und bildet somit eine feste Phase. In der oben beschriebenen Vorgehensweise binden sich die MIF- Antigene aus dem EDTA- Plasma an die feste Phase. Im zweiten Schritt wird ein Detektions- Antikörper hinzugegeben an dessen Ende ein Enzym, die sogenannte Meerrettichperoxidase angefügt ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht ein Antikörper- Antigen- Antikörper- Komplex der durch Zugabe eines passenden Substrates zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt werden kann.

In Folge dieser Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag. Im Anschluss daran wird eine quantitative Analyse mittels einer optischen Extinktion durchgeführt. Die Wellenlänge zur quantitativen Messung bei dem in dieser Arbeit genutzten ELISA- Verfahren betrug 450 nm.



**Abb. 7: Schematisches Beispiel eines ELISA- Verfahrens.**<sup>115</sup> (1) coat-Antikörper, an den Boden der Mikrotiterplatte (nicht dargestellt) gebunden; (2) Zugabe der Probe und Inkubation; (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers; (4) Zugabe und Komplexbildung des *enzyme-linked* Antikörper-Antigen-Antikörper; (5) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.



### 2.2.6. Experimentelle Bestimmung der benötigten Plasmavolumina

Da es zur Bestimmung der optimalen Konzentration von MIF in humanen EDTA- Plasmen bei kardiovaskulären Erkrankungen keine Referenzwerte gibt, wurden die zu messenden Plasmen in verschiedenen Verdünnungen hergestellt. Hierzu sind 3 EDTA- Plasmen von Herzinfarktpatienten verwendet worden. Die Verdünnungen sind im Einzelnen unten dargestellt und wurden im Verhältnis 1:1, 1:10 und 1:100 hergestellt.

**Tabelle 1:** Versuchsanordnung zur Bestimmung der optimalen Konzentration von MIF in humanen EDTA- Plasma

Standard (pg/ml)	Proben ( $\mu$ l)	Verdünnung	Probe
6000	100 $\mu$ l	1	
2000	100 $\mu$ l	1:10	Patient 1
666.7	100 $\mu$ l	1:100	
222,2	100 $\mu$ l	1	
74,07	100 $\mu$ l	1:10	Patient 2
24,69	100 $\mu$ l	1:100	
8,23	100 $\mu$ l	1:10	Patient 3
0	100 $\mu$ l	1:100	

Die Messungen der EDTA- Plasmen der Myokardinfarktpatienten haben ergeben, dass der optimale Messbereich für das Human MIF ELISA Verfahren bei unverdünnten Blutproben liegt. Dies hat sich bei den Messungen auch für die anderen und später gemessenen kardiovaskulären Erkrankungen bestätigt.

### 2.2.7. Statistische Analyse

Um zu untersuchen, ob die Grundgesamtheit der Stichproben normalverteilt sind, wurde ein Shapiro- Wilk Test verwendet. Die Mittelwerte zwischen zwei Variablen sind mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests untereinander verglichen worden. Zur dichotomen Analyse kategorischer Variablen wurde ein Chi-Quadrat Test und ein exakter Test nach Fischer durchgeführt. Nicht-normalverteilte stetige Variablen sind als Median und Interquartalabstand dargestellt. Unterschiede zwischen nicht-parametrischen Variablen sind durch einen Mann-Whitney-U Test untersucht worden.

Eine univariate Kovarianzanalyse wurde verwendet, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Expression von MIF zu bewerten. Die Haupteffekte der relevanten demographischen Faktoren und der Faktoren, die Einfluss auf die MIF-Expression haben, sind in das Model der univariaten Kovarianzanalyse eingefügt worden. Alle dargestellten Signifikanz-Werte sind zweiseitig und Überschreitungswahrscheinlichkeiten von  $p < 0,05$  sind einer statistischen Signifikanz zugrunde gelegt worden. Die statistische Analyse ist mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 18 für Windows durchgeführt worden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Assoziation der MIF-Konzentrationen mit demographischen Faktoren

Die demographischen Basisdaten der gesamten Kohorte sind in Tabelle 2 dargestellt. Zusätzlich wurden die Patienten in solche mit hohen MIF-Spiegeln und solche mit niedrigen MIF-Spiegeln eingeteilt. Als Grenze diente der Median aller MIF-Werte.

Tabelle 2 zeigt, dass Patienten mit erhöhtem MIF-Pegel meist älter sind, häufiger an einer arteriellen Hypertension und einer Hyperlipidämie leiden, sowie häufiger mit Aspirin, Clopidogrel und Statinen behandelt werden. Des Weiteren haben Patienten mit einem erhöhten MIF-Pegel eine besser erhaltene linksventrikuläre Funktion als Patienten mit einem niedrigem MIF-Pegel ( $\leq 1,96$ ng/ml).

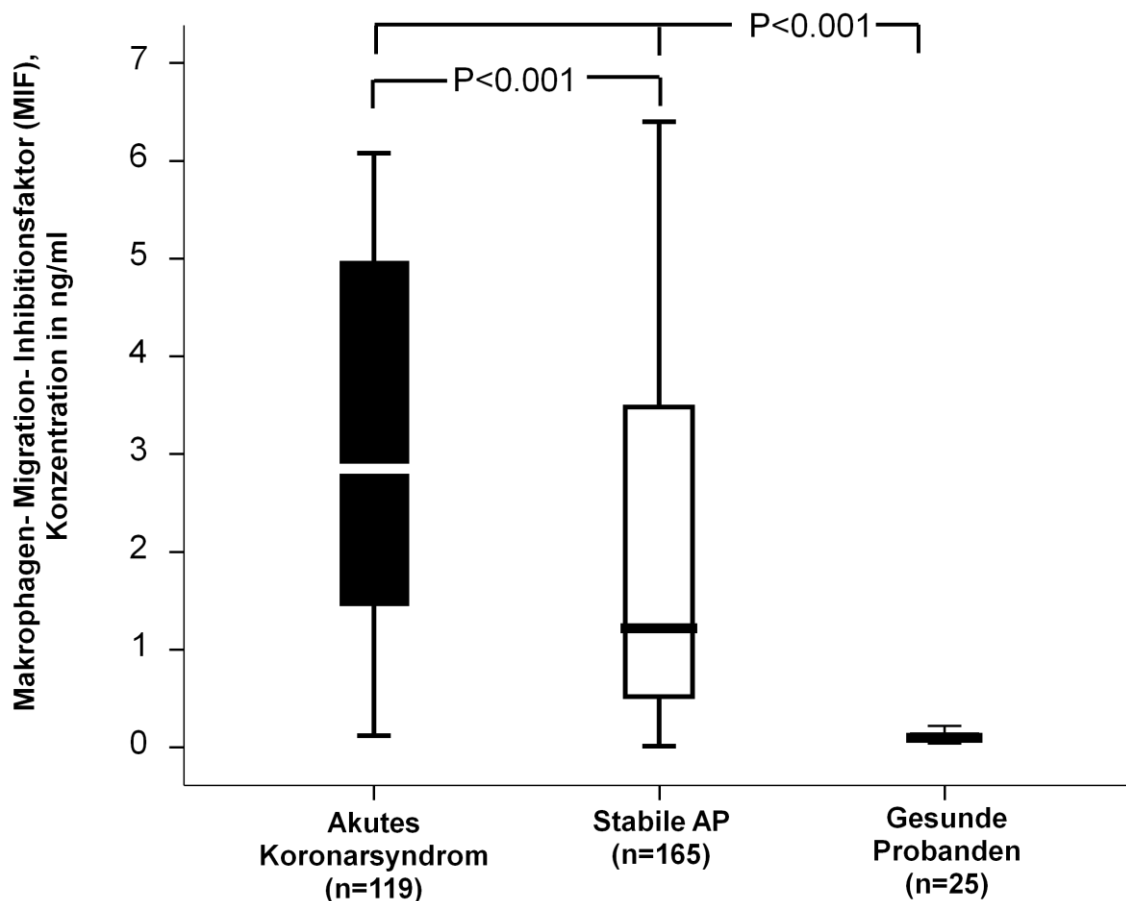
Tabelle 2: Charakteristika des Patientenkollektivs

Patientencharakteristika	Gesamt, n = 286	Niedriges bis mittleres MIF (≤1.96 ng/ml) n = 143	Hohes MIF (>1.96 ng/ml) n = 143	p-Wert
Alter *	67.9±13.0	65.3±14.0	70.4±11.5	<b>&lt;0.001</b>
Weibliches Geschlecht	84 (29.4)	38 (26.8)	46 (32.4)	0.298
Glomeruläre Filtrationsrate (MDRD, mL/min/1.73m <sup>2</sup> )*	35.2 ± 17.4	31.2 ± 14.0	39.0 ± 19.5	<b>&lt;0.001</b>
Leukozyten (10 <sup>3</sup> /µl)	8.7 ± 3.1	8.4 ± 3.2	8.8 ± 3.1	0.136
Monozyten (% der Leukozyten)	5.0 ± 0.2	4.5 ± 3.6	5.3 ± 3.1	<b>0.047</b>
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren – Anz. (%)</b>				
Arterielle Hypertension	221 (77.3)	94 (66.2)	125 (88.0)	<b>&lt;0.001</b>
Diabetes	88 (30.8)	36 (25.4)	50 (35.2)	0.071
Hyperlipidämie	168 (58.7)	71 (50.0)	95 (66.9)	<b>0.004</b>
Tabakkonsum	105 (36.7)	48 (33.8)	57 (40.1)	0.269
Akutes Koronarsyndrom	119 (41.9)	44 (31.0)	75 (52.8)	<b>&lt;0.001</b>
<b>LV-Funktion</b>				
Leicht reuziert (EF<55%)	70 (24.5)	24 (16.9)	45 (31.7)	
Mäßig reduziert (EF 35-45%)	55 (19.2)	31 (21.8)	24 (16.9)	<b>0.002</b>
Stark reduziert (EF<35%)	49 (17.1)	34 (23.9)	15 (10.6)	
<b>Komedikation – Anz. (%)</b>				
ASS	189 (66.1)	84 (59.2)	103 (72.5)	<b>0.017</b>
Clopidogrel	87 (30.4)	35 (24.6)	51 (64.1)	<b>0.039</b>
Marcumar	20 (7.0)	9 (6.3)	11 (7.7)	0.643
ACE-Inhibitoren	177 (61.9)	93 (65.5)	83 (58.8)	0.222
AT1-Blocker	48 (16.8)	35 (24.6)	13 (9.2)	<b>&lt;0.001</b>
Beta-Blocker	214 (74.8)	106 (74.6)	107 (75.4)	0.891
Diuretika	153 (53.5)	80 (56.3)	71 (50.0)	0.285
Statine	140 (49.0)	59 (41.5)	80 (56.3)	<b>0.013</b>

\* Mittelwert ± Standardabweichung

### 3.1.1. MIF- Expression bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, stabiler Angina pectoris und bei gesunden Probanden

Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS, IAP, NSTEMI, STEMI), hatten im Gegensatz zu Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und gesunden Probanden eine signifikant erhöhte MIF-Konzentration (Median 2,85ng/ml, interquartilärer Rang (IQR) 3,52 gegenüber dem Median 1,22 ng/ml, IQR 2,99 und 0,1 ng/ml IQR 0,09,  $p < 0,001$ , siehe Abbildung 8).



**Abb. 8:** MIF-Expression bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, Patienten mit stabiler Angina pectoris und bei gesunden Probanden. ACS: = 2,85 ng/ml, SAP: = 1,22 ng/ml, gesunde Probanden: = 0,09 ng/ml.

### **3.1.2. Univariate Kovarianzanalyse der MIF-Werte eines akuten Koronarsyndroms**

Nach Einbeziehung der relevanten Variablen wurden die zugrundeliegenden MIF-Werte in der univariaten Kovarianzanalyse unabhängig mit den Daten der Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom verbunden (F-Wert 15,58,  $p < 0,001$ ). (Tabelle 3)

Dabei zeigt sich, dass höheres Alter und arterielle Hypertension unabhängig voneinander mit erhöhten MIF-Werten assoziiert sind.

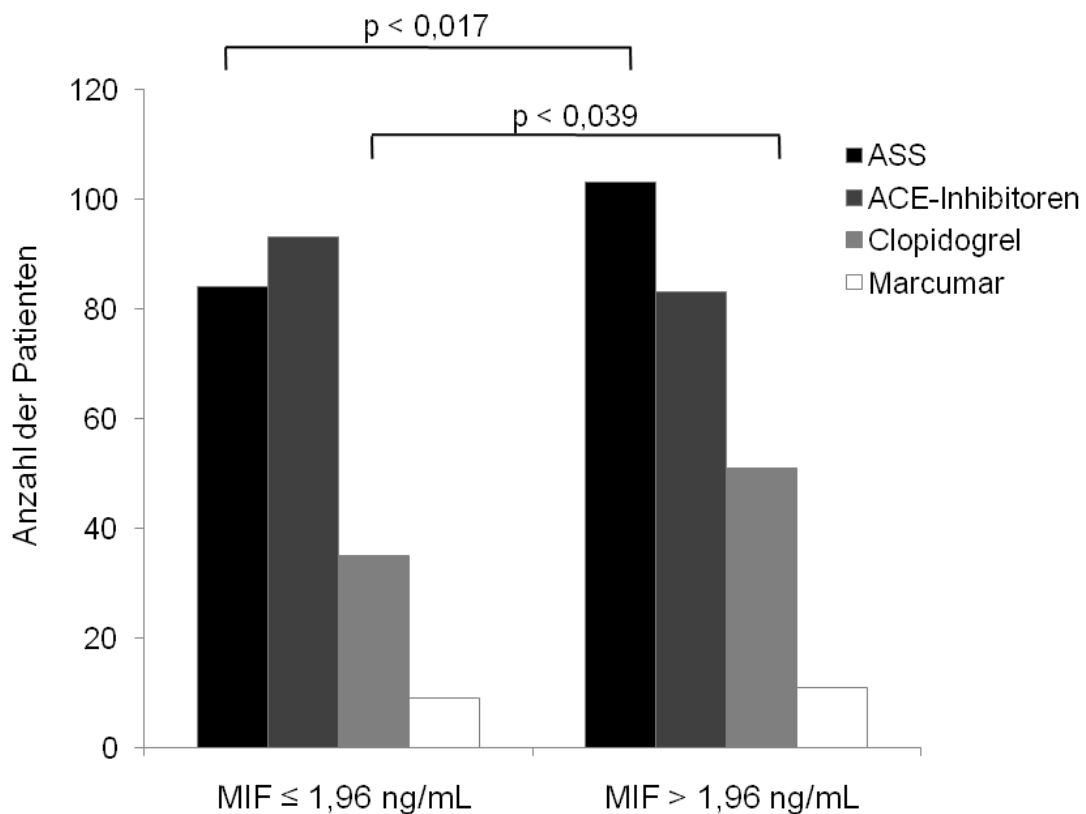
**Tabelle 3:** Univariate Kovarianzanalyse der MIF-Werte und mögliche Störfaktoren einer koronaren Herzerkrankung

Koeffizienten		95% Konfidenzintervall			F	Quadr. Mittelwert	Sign.
		Mittelwert	Untere Grenze	Obere Grenze			
Alter					0,93	2,59	0,34
Geschlecht	Männlich	2,29	1,87	2,70	1,49	4,18	0,22
	Weiblich	2,59	2,06	3,12			
Arterielle Hypertension	Nein	2,16	1,58	2,75	3,98	11,21	<0,001
	Ja	2,71	2,31	3,11			
ACS Stable AP		2,81	2,31	3,31	11,21	31,59	<0,001
		2,06	1,64	2,48			
Diabetes	nein	2,47	2,07	2,88	0,13	0,37	0,72
	Ja	2,40	1,87	2,93			
Hyperlipidämie	Nein	2,21	1,73	2,69	3,77	10,62	0,05
	Ja	2,67	2,20	3,13			
Nierenfunktion					6,55	18,45	0,01
Reduzierte LV- Funktion	Nein	2,36	1,86	2,87	1,95	0,70	0,41
	Ja	2,67	2,24	3,11			
AT1-Blocker	Nein	2,41	2,06	2,76	0,03	0,07	0,87
	Ja	2,46	1,83	3,10			
Statine	Nein	2,35	1,87	2,83	0,51	1,43	0,48
	Ja	2,52	2,04	3,01			
ASS	Nein	2,46	1,92	2,99	0,03	0,07	0,87
	Ja	2,41	1,98	2,85			
Clopidogrel	Nein	2,39	1,99	2,80	0,04	0,11	0,84
	Ja	2,48	1,93	3,04			

Eine Hyperlipidämie wurde definiert als: Triglyzeride  $\geq 175$  mg/dl und /oder LDL-Cholesterol  $\geq 100$ mg/dl und/oder der Gebrauch anderer Lipidsenker.

### 3.1.3. Assoziation der MIF-Konzentration mit der Medikation

Bei den untersuchten Patienten konnten nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, wobei der MIF-Median-Wert im Plasma (1,96 ng/ml) darüber entschied, in welche Gruppe, nämlich ober- oder unterhalb des MIF-Medians, der Patient eingeteilt wurde, signifikante Unterschiede bei der Einnahme von ASS ( $p < 0,017$ ) und Clopidogrel ( $p < 0,039$ ) abhängig von der Gruppenzugehörigkeit beobachtet werden. Bei der Einnahme von Marcumar und ACE-Inhibitoren konnten keine Unterschiede ausfindig gemacht werden.

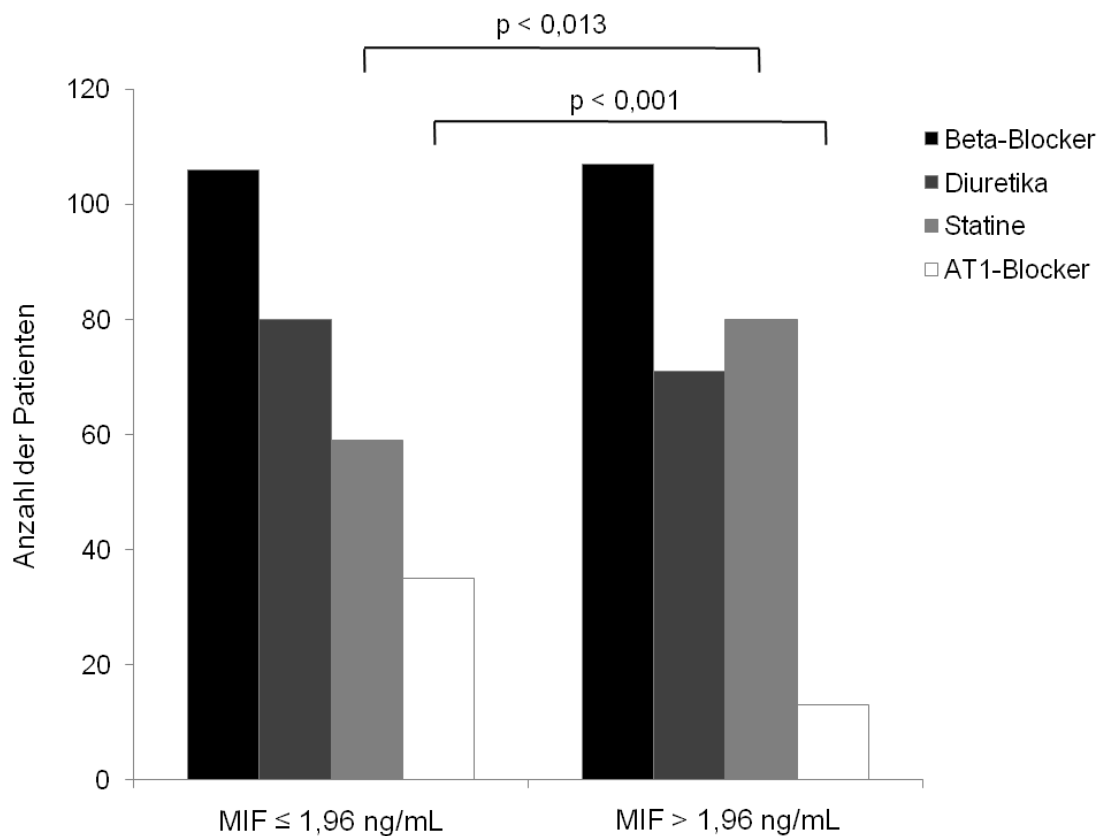


**Abb. 9:** Assoziation zwischen der Medikamenteneinnahme und der MIF-Spiegel unter Einteilung in zwei Gruppen, abhängig vom MIF-Median. MIF ≤ 1,96 ng/ml: ASS n=84, Clopidogrel n=35, Marcumar n=9, ACE-Inhibitoren n=93. MIF > 1,96 ng/ml: ASS n=103, Clopidogrel n=51, Marcumar n=11, ACE-Inhibitoren n=83.



### 3.1.4. Assoziation der MIF-Spiegel von der Einnahme weiterer Medikamente, abhängig vom MIF-Median-Wert.

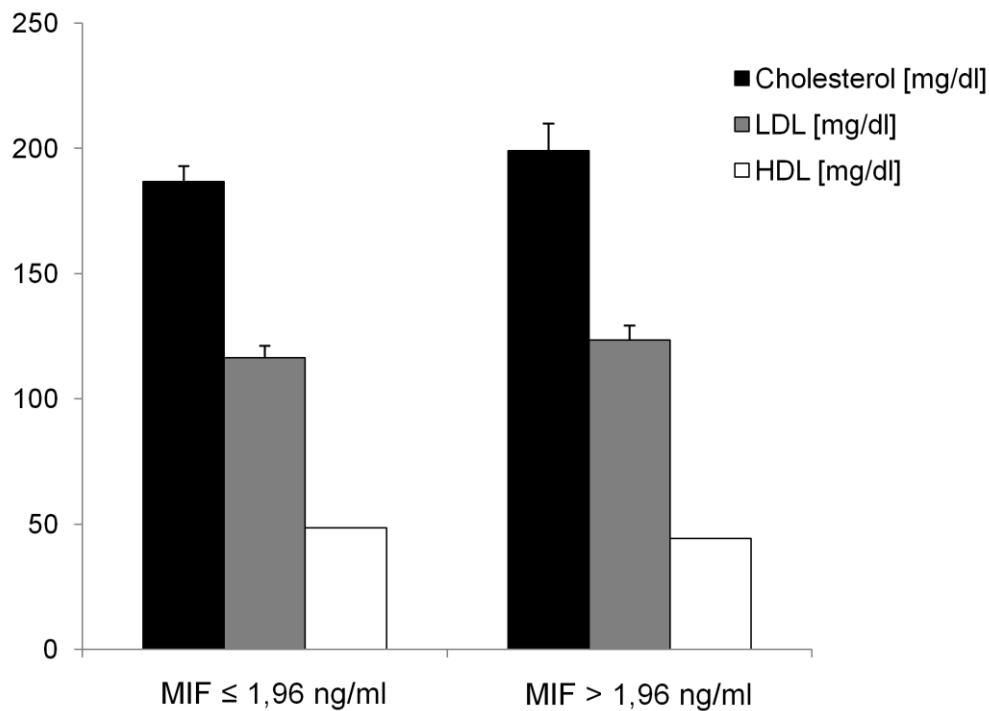
Bei den untersuchten Patienten konnten nach Einteilung in zwei Gruppen abhängig vom MIF-Median, signifikante Unterschiede bei der Einnahme von Statinen ( $p < 0,013$ ) und AT1-Blocker ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden. Bei der Einnahme von Beta-Blockern und Diuretika konnten keine Unterschiede ausfindig gemacht werden.



**Abb. 10:** Assoziation der weiteren Medikamenteneinnahme nach Einteilung der Probanden in zwei Gruppen, abhängig MIF-Median. MIF ≤ 1,96 ng/ml: AT1-Blocker n=35, Beta-Blocker n=106, Diuretika n=80, Statine n=59. MIF > 1,96 ng/ml: AT1-Blocker n=13, Beta-Blocker n=107, Diuretika n=71, Statine n=59.

### 3.2. Assoziation der kardiovaskulären Risikofaktoren Cholesterol, LDL und HDL

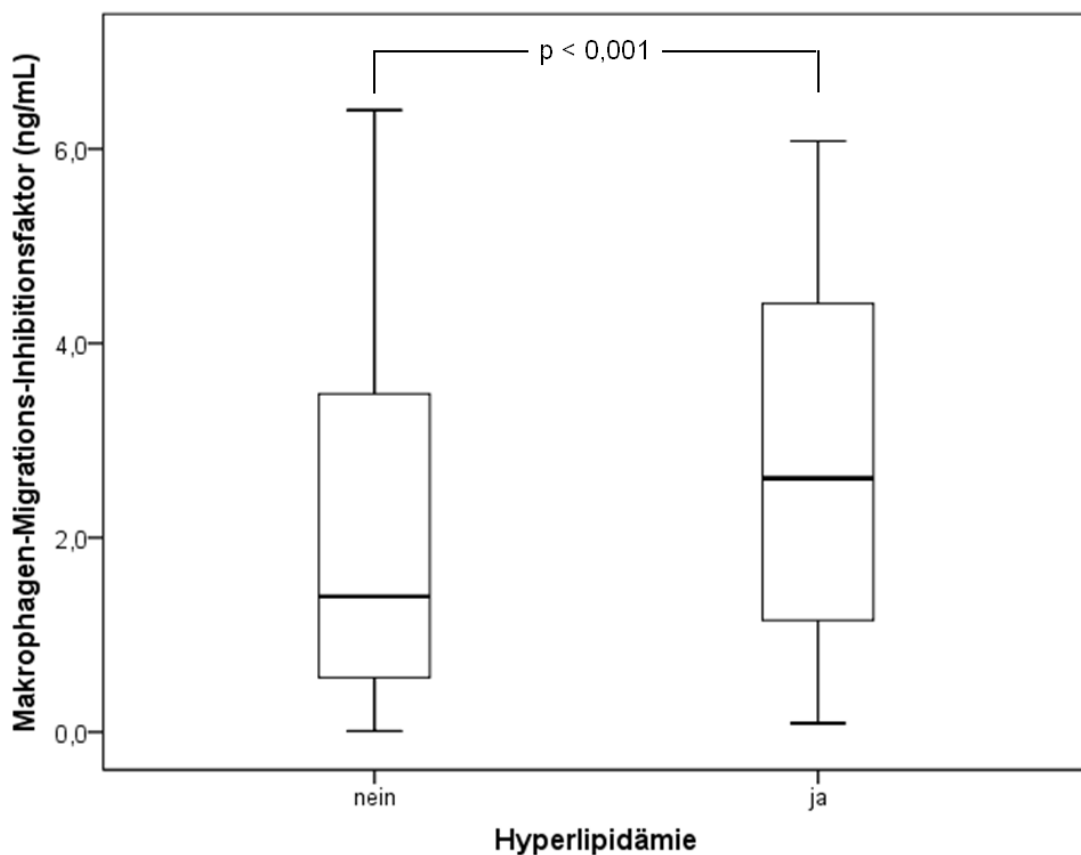
Um die Assoziation der MIF-Spiegel mit kardiovaskulären Risikofaktoren zu analysieren, wurde das Kollektiv in Patienten mit niedrigen MIF-Werten ( $\leq 1,96$  ng/ml) und in Patienten mit hohen MIF-Werten ( $>1,96$  ng/ml) eingeteilt. Für keinen der untersuchten Parameter ergibt sich ein signifikanter Unterschied.



**Abb. 11:** Assoziation kardiovaskulärer Risikofaktoren mit MIF. Cholesterol (n=131) und  $p=0,308$ , LDL (n=123) und  $p=0,335$ , HDL (n=123) und  $p=0,092$ .

### 3.2.1. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Hyperlipidämie

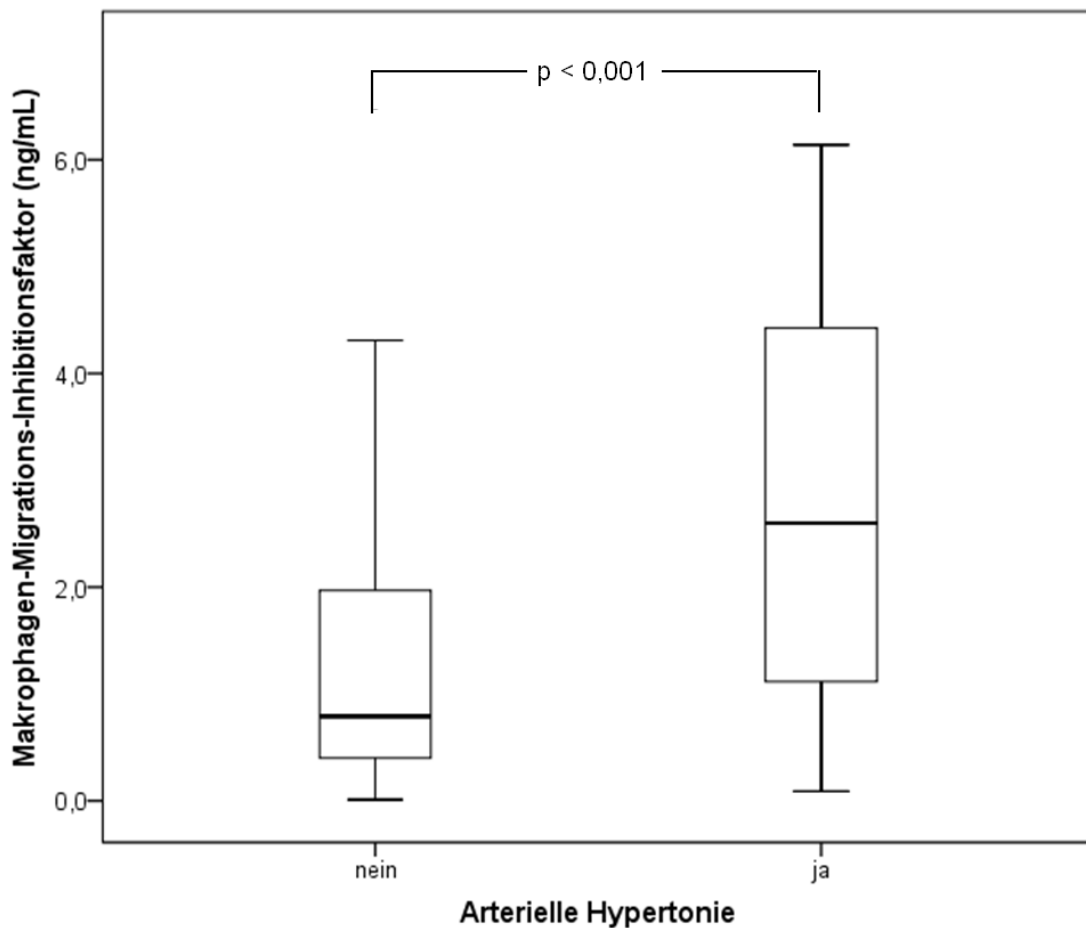
Die folgende Abbildung zeigt den Unterschied zwischen der MIF-Expression bei Patienten mit und bei Patienten ohne eine Hyperlipidämie. Dabei liegt die MIF-Konzentration bei Patienten ohne eine Hyperlipidämie im Mittel bei 2,07 ng/ml und bei Patienten mit einer Hyperlipidämie im Mittel bei 2,78 ng/ml. Zwischen beiden Gruppen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied.



**Abb. 12:** MIF und Hyperlipidämie. Assoziation des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF) bei Patienten mit einer Hyperlipidämie (ja) und ohne eine Hyperlipidämie (nein). Gesamt n=284, nein n= 118, ja n= 166, Mittelwert nein= 2,07 ng/ml, Mittelwert ja= 2,80 ng/ml,  $p < 0,001$ .

### 3.2.2. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne arterieller Hypertonie

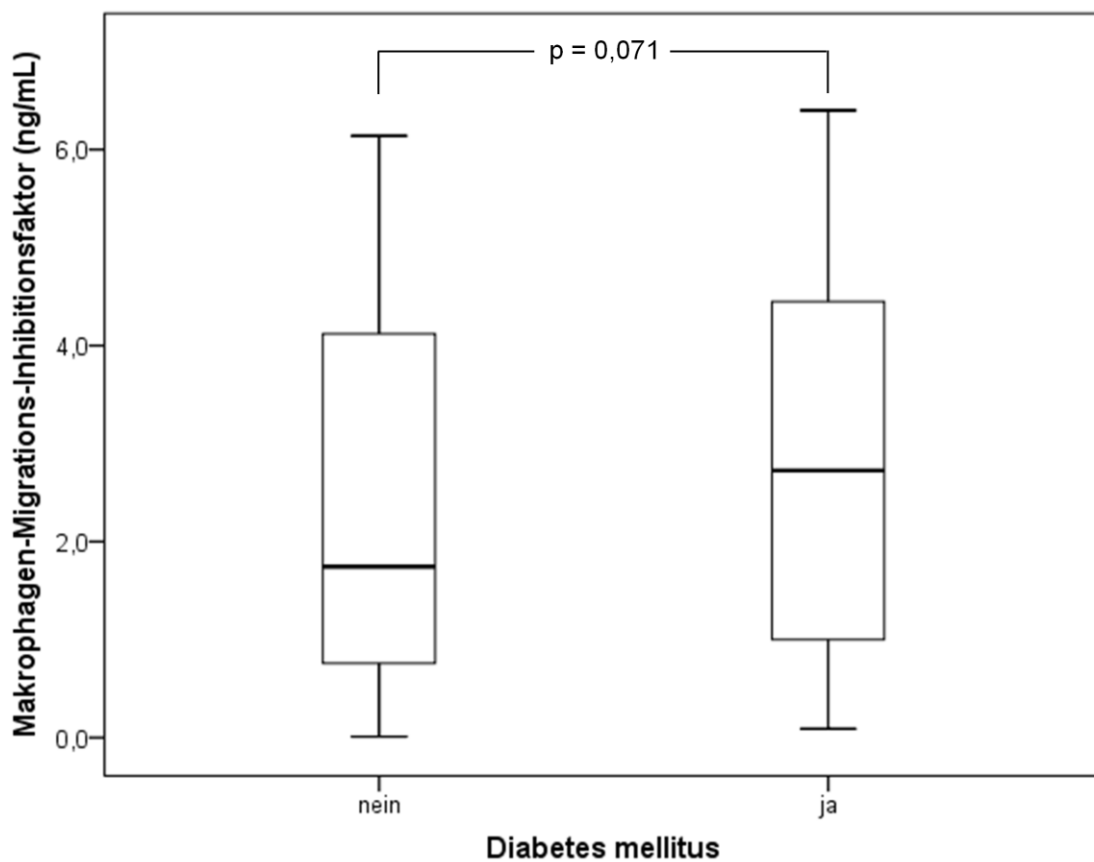
Die unten stehende Abbildung zeigt den Unterschied zwischen der MIF-Erhöpfung bei Patienten mit und bei Patienten ohne eine arterielle Hypertonie. Dabei liegt die MIF-Konzentration bei Patienten ohne eine arterielle Hypertonie im Mittel bei 1,56 ng/ml und bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie im Mittel bei 2,78 ng/ml. Zwischen beiden Gruppen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied.



**Abb. 13:** MIF und arterielle Hypertonie. Assoziation des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktors (MIF) mit arterieller Hypertonie bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie (ja) und ohne eine arterielle Hypertonie (nein). Gesamt n= 284, nein n=65, ja n= 219, Mittelwert nein= 1,56 ng/ml, Mittelwert ja= 2,78 ng/ml,  $p < 0,001$ .

### 3.2.3. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus

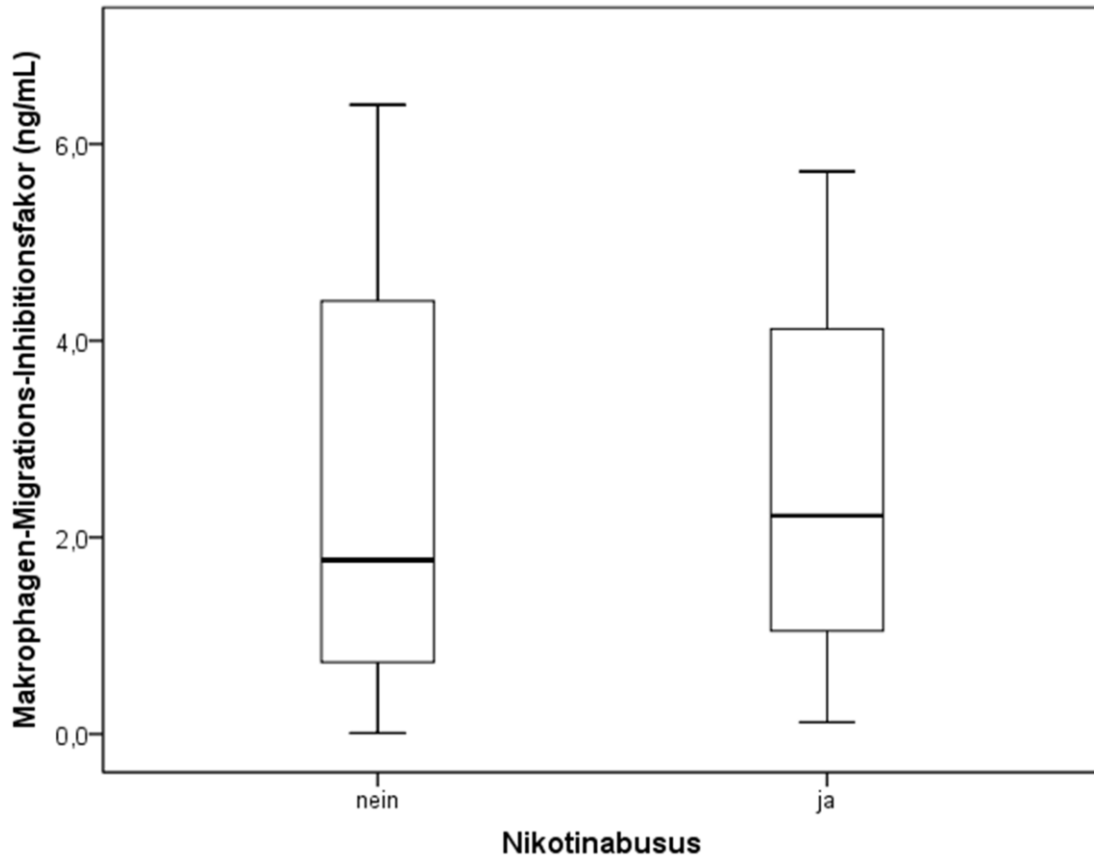
Die folgende Grafik zeigt die MIF- Konzentration bei Patienten ohne Diabetes mellitus und mit Diabetes mellitus. Dabei liegt die MIF- Konzentration bei Patienten ohne Diabetes im Mittel bei 2,37 ng/ml und bei Patienten mit Diabetes im Mittel bei 2,78 ng/ml. Zwischen den beiden Gruppen besteht ein mäßiger Unterschied.



**Abb. 14:** MIF und Diabetes mellitus. Assoziation des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) – Spiegel mit einem bestehenden Diabetes mellitus (ja) bzw. ohne das Vorliegen eines Diabetes mellitus (nein). Gesamt n= 284, nein n=198, ja n= 86, Mittelwert nein= 2,37 ng/ml, Mittelwert ja= 2,78 ng/ml, p = 0,071.

### 3.2.4. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne Nikotinabusus

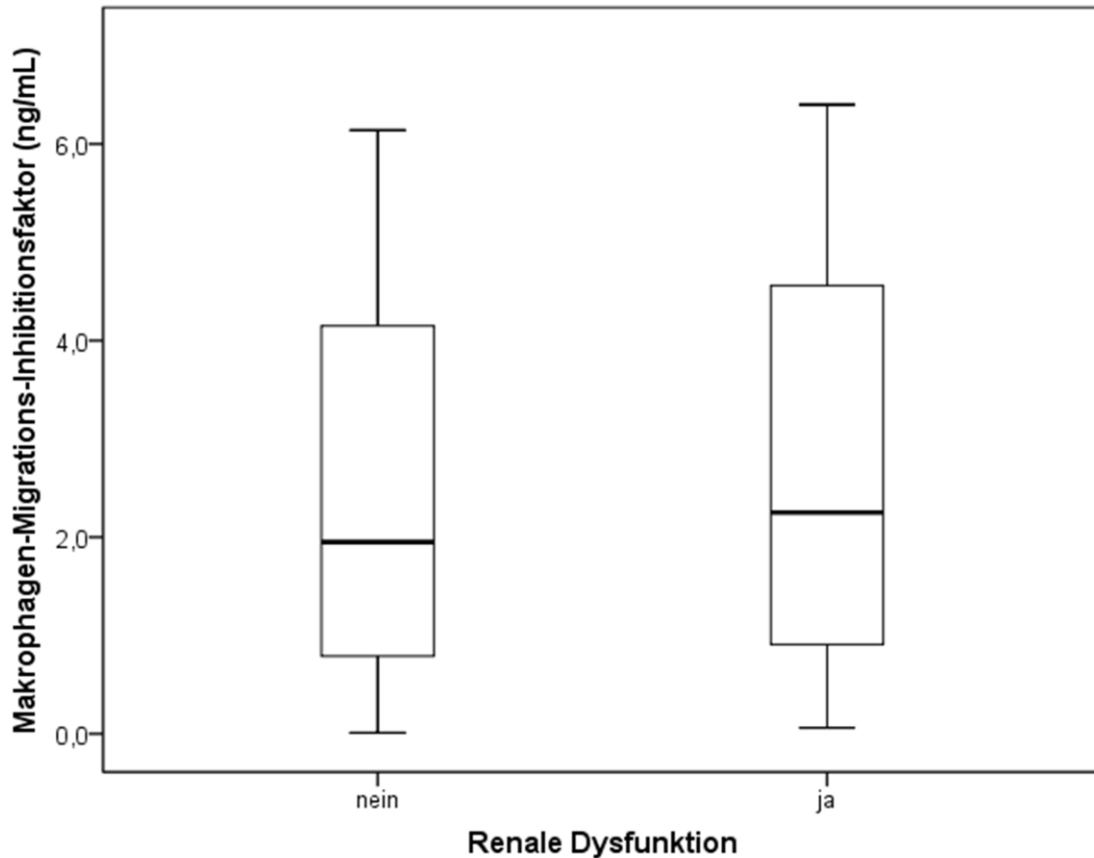
In der Grafik unten werden die MIF- Konzentrationen bei Rauchern und Nichtrauchern dargestellt. Zwischen den beiden Gruppen besteht lediglich ein minimaler Unterschied.



**Abb. 15:** MIF und Nikotinabusus. Assoziation des Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor (MIF) – Spiegel mit einem bestehenden Nikotinabusus (ja) bzw. ohne das Vorliegen eines Nikotinabusus (nein). Gesamt n= 284, nein n=179, ja n= 105, Mittelwert nein= 2,48 ng/ml, Mittelwert ja= 2,51 ng/ml, p = 0,269.

### 3.2.5. MIF- Konzentration bei Patienten mit und ohne renaler Dysfunktion

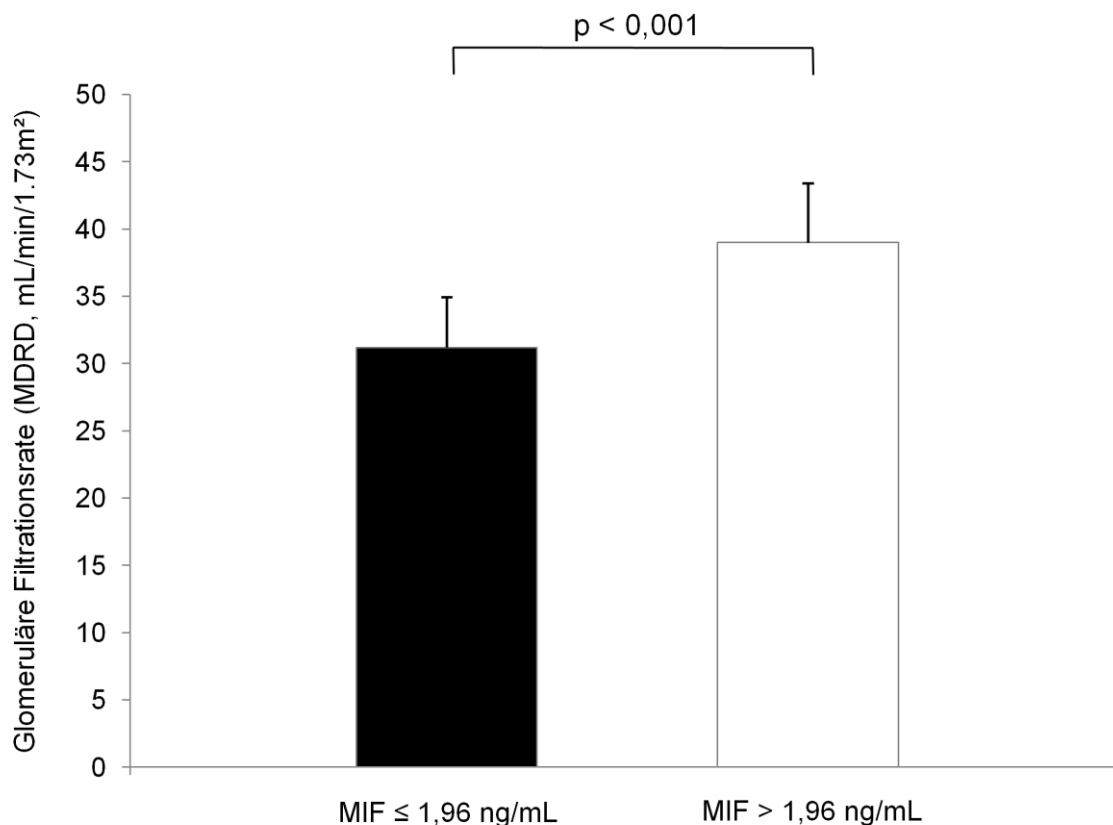
Die unten stehende Grafik zeigt, ob Patienten ohne eine renale Dysfunktion und Patienten mit einer renalen Dysfunktion unterschiedliche MIF-Konzentration aufweisen. Zwischen den beiden Gruppen besteht ein minimaler Unterschied.



**Abb. 16:** MIF und renale Dysfunktion. Assoziation des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) mit dem Vorliegen einer renalen Dysfunktion (ja) bzw. ohne eine renale Dysfunktion (nein). Gesamt n= 284, nein n= 209, ja n=75, Mittelwert nein= 2,44 ng/ml, Mittelwert ja= 2,64 ng/ml, p = 0,459.

### 3.2.6. Assoziation der glomerulären Filtrationsrate (MDRD) und MIF

Einteilung des Kollektivs in zwei Gruppen, abhängig vom Median von MIF (MIF  $\leq 1,96$  ng/ml oder MIF  $> 1,96$  ng/ml). Patienten mit erhöhten MIF-Konzentrationen weisen signifikant höhere Werte für die glomeruläre Filtrationsrate auf als Patienten mit niedrigen MIF-Konzentrationen.

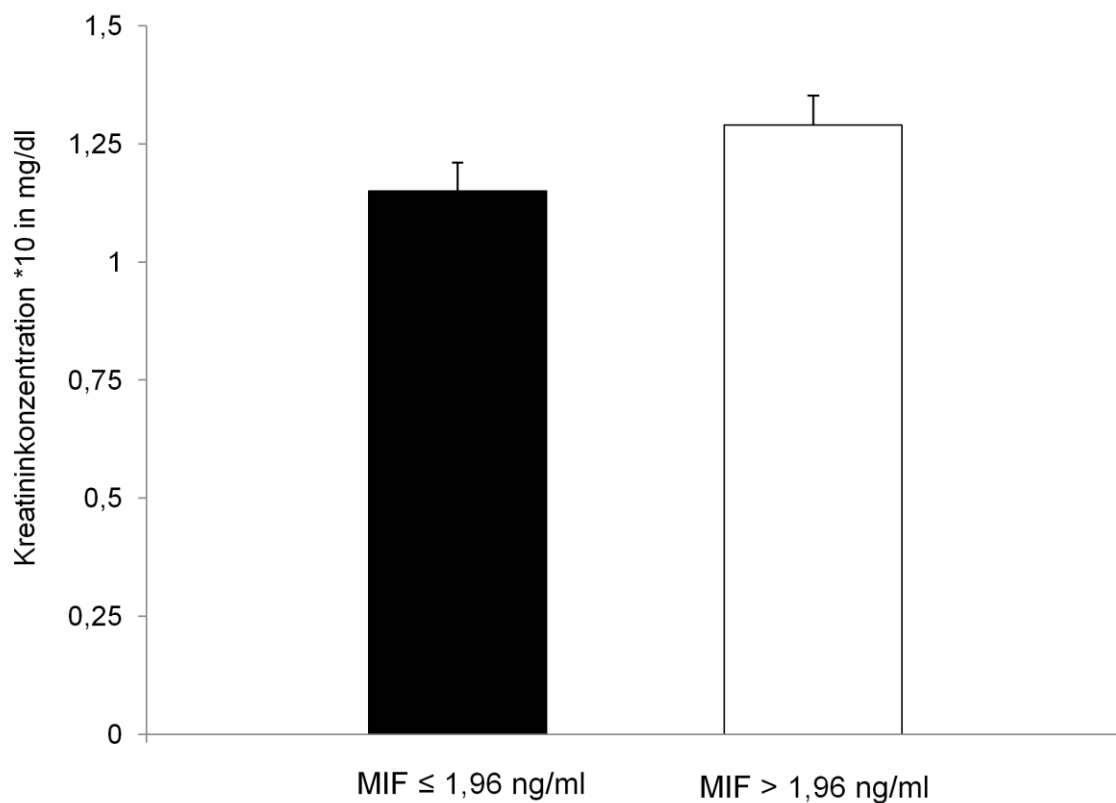


**Abb. 17:** Assoziation der glomerulären Filtrationsrate mit dem Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor (MIF). Glomeruläre Filtrationsrate (MDRD in mL/min/1.73m<sup>2</sup>). MDRD bei MIF  $\leq 1,96$  ng/ml = 31,2 und MDRD bei MIF  $> 1,96$  ng/ml = 39,0. Unterschied zwischen beiden Gruppen:  $p < 0,001$ .



### 3.2.7. Assoziation von Kreatinin und MIF

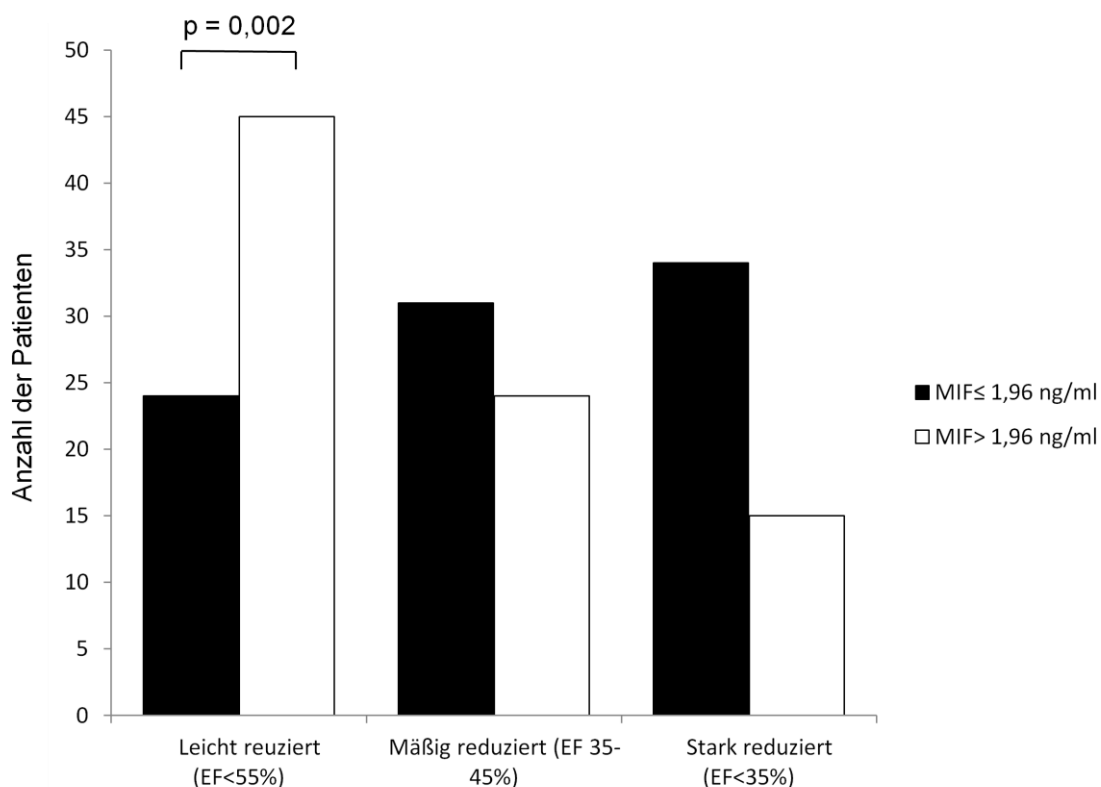
Einteilung des Kollektivs nach dem Medianwert von MIF  $\leq 1,96$  ng/ml und MIF  $> 1,96$  ng/ml. Patienten mit erhöhten MIF-Konzentrationen weisen keine signifikant erhöhten Werte für die Kreatininkonzentration auf als Patienten mit niedrigen MIF-Konzentrationen.



**Abb. 18:** Assoziation der Kreatininkonzentration mit MIF. Kreatininkonzentration in mg/dl. Kreatininkonzentration bei MIF  $\leq 1,96$  ng/ml = 1,15 ng/ml und bei MIF  $> 1,96$  ng/ml = 1,29 ng/ml. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen,  $p=0,124$ .

### 3.3. Assoziation der LV-Funktion und MIF

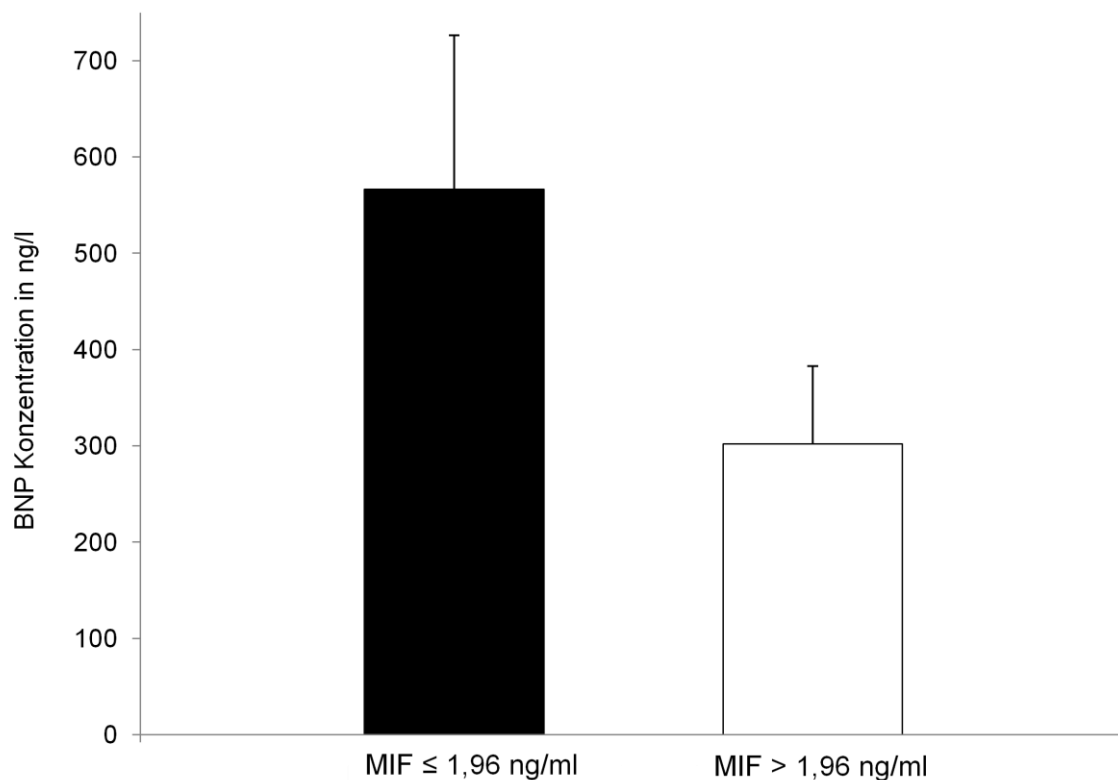
Einteilung des Kollektivs abhängig vom Median von MIF in zwei Gruppen mit Probanden mit einem MIF-Median  $\leq 1,96$  ng/ml oder einem MIF-Median  $> 1,96$  ng/ml. Betrachtet man innerhalb der beiden Gruppen jeweils Patienten mit normaler und leichtgradig reduzierter LV-Funktion (EF  $> 55\%$ ), mäßig reduzierter LV-Funktion (EF 35-45%) und stark reduzierter LV-Funktion (EF  $< 35\%$ ), so weisen Patienten mit erhöhter MIF-Konzentration bei leicht reduzierter linksventrikulärer Funktion eine bessere Ejektionsfraktion auf als Patienten mit niedrigen MIF-Werten ( $p=0,002$ ). Für die anderen Gruppen ergibt sich kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 19:** Assoziation der linksventrikulären Funktion mit MIF (Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor). Normal oder leicht reduziert (EF  $< 55\%$ )  $n=70$ , mäßig reduziert (EF 35-45%)  $n=55$ , stark reduziert (EF  $< 35\%$ )  $n=49$ .

### 3.3.1. Assoziation von Brain Natriuretic Peptide (BNP) und MIF

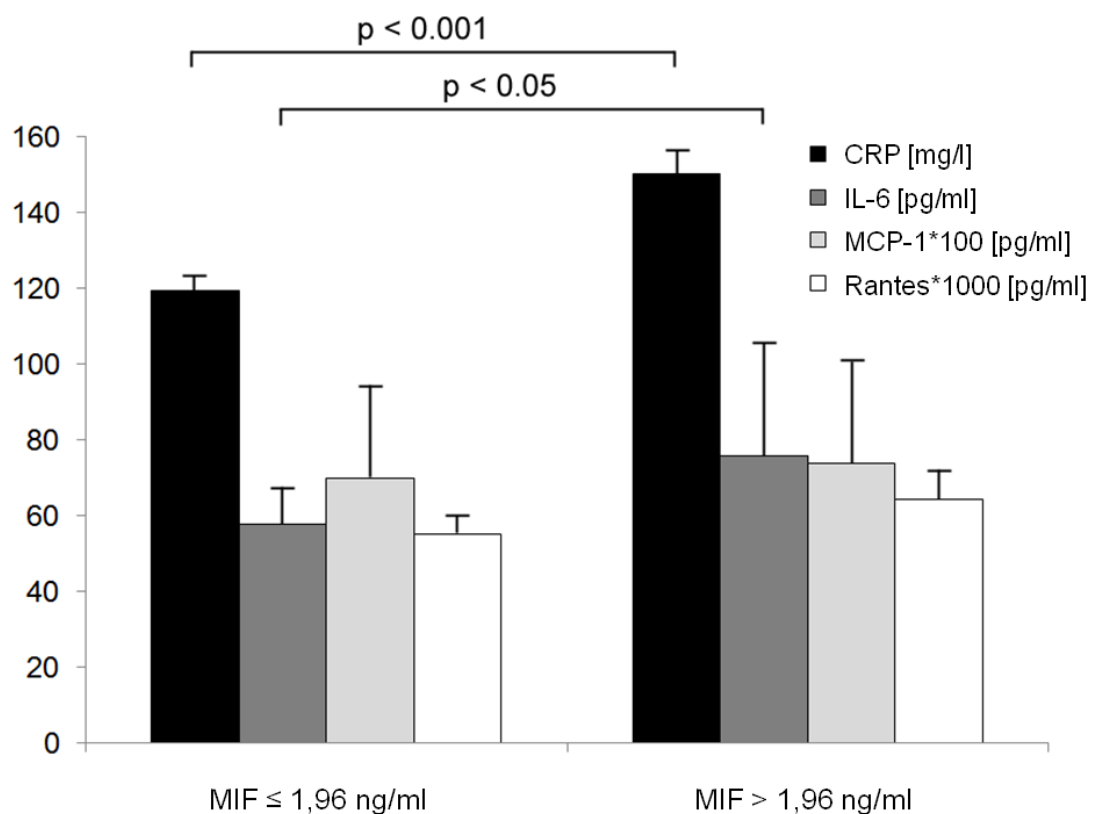
Einteilung des Kollektivs abhängig vom MIF-Median-Wert mit  $MIF \leq 1,96 \text{ ng/ml}$  und  $MIF > 1,96 \text{ ng/ml}$ . Patienten mit niedrigen MIF-Konzentrationen weisen keine erhöhten Werte für die BNP Konzentrationen im Blut auf im Vergleich zu Patienten mit höheren MIF-Konzentrationen.



**Abb. 20:** Assoziation von Brain Natriuretic Peptide (BNP) und MIF (Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor). BNP bei  $MIF \leq 1,96 \text{ ng/ml}$  = 566,3 ng/l (n=28) und bei  $MIF > 1,96 \text{ ng/ml}$  = 301,8 ng/ml (n=11).

### 3.4. Korrelation der MIF-Werte mit Entzündungsmarkern

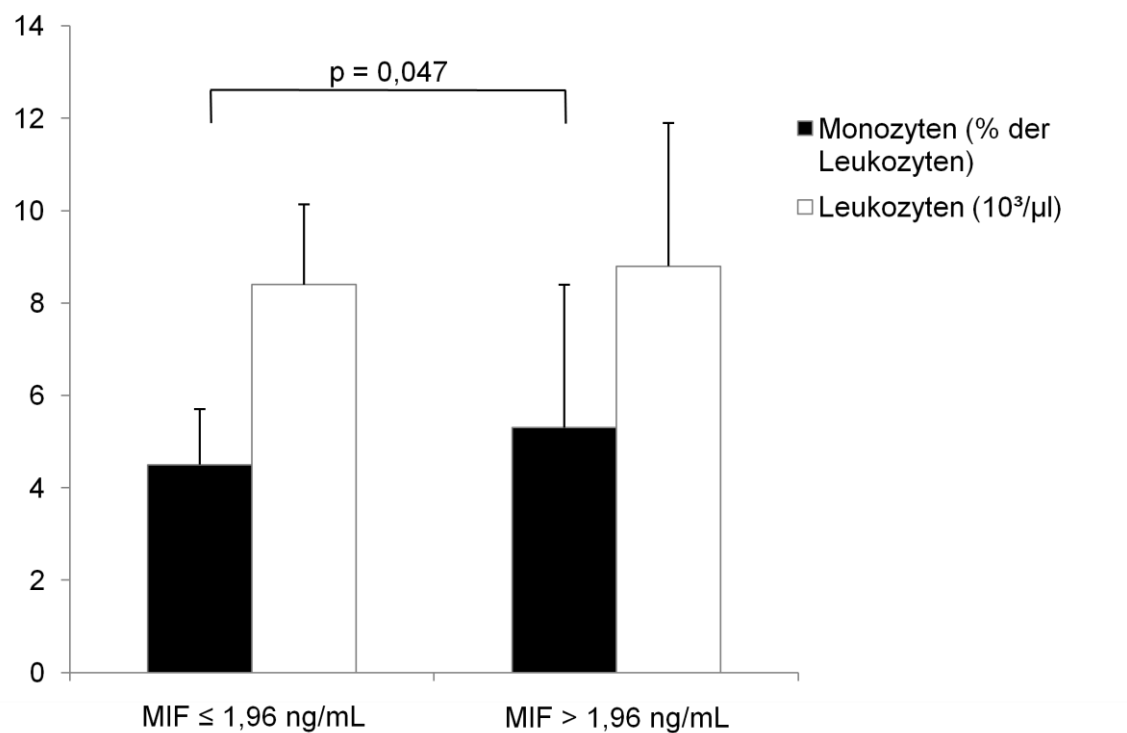
Um die Assoziation der Höhe der MIF-Spiegel mit inflammatorischen Parametern zu analysieren, wurde das untersuchte Kollektiv wieder abhängig vom MIF-Median-Wert in Patienten mit niedrigen MIF-Werten ( $\leq 1,96$  ng/ml) und in Patienten mit hohen MIF-Werten ( $> 1,96$  ng/ml) eingeteilt. Patienten mit höheren MIF-Werten zeigen zugleich signifikant erhöhte Werte für das C-reaktive Protein (CRP) und Interleukin-6 (IL-6). Des Weiteren liegen Erhöhungen von RANTES- und MCP-1 vor, welche jedoch nicht signifikant sind.



**Abb. 21:** Assoziation des Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktor (MIF) mit den Entzündungsmarkern CRP, IL-6, MCP-1 und RANTES. MIF  $\leq 1,96$  ng/ml (n=142), MIF  $> 1,96$  ng/ml (n=142).

### 3.4.1. Assoziation von Monozyten und Leukozyten mit MIF

Der prozentuale Monozytenanteil im Blut weist abhängig vom MIF-Median  $\leq 1,96$  ng/ml und  $>1,96$  ng/ml zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied auf ( $p < 0,047$ ). Eine Untersuchung der Gesamt-Leukozyten ergab dagegen keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 22:** Monozyten- und Leukozytenzahlen nach Einteilung des Kollektivs abhängig vom MIF-Median, Monozyten (% der Leukozyten) bei MIF  $\leq 1,96$  ng/ml = 4,5% und bei MIF  $\geq 1,96$  ng/ml = 5,3%,  $p = 0,047$ . Leukozyten bei MIF  $\leq 1,96$  ng/ml =  $8,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  und bei MIF  $\geq 1,96$  ng/ml =  $8,8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p = 0,136$ .

### 3.5. Residuale Plättchenaggregation

Eine Untersuchung der Plättchenfunktion bei coronararteriellen Erkrankungen und akutem Myokardinfarkt ergab für keine dieser Gruppen einen Zusammenhang zwischen der Höhe des MIF- Spiegels und der residuellen Thrombozyten-Aggregation vor und nach dualer Plättchenhemmung mit ASS und Clopidogrel.

**Tabelle 4:** Residuale Plättchenaggregation unter dualer antithrombozytärer Therapie (ASS und Clopidogrel) abhängig vom MIF-Median

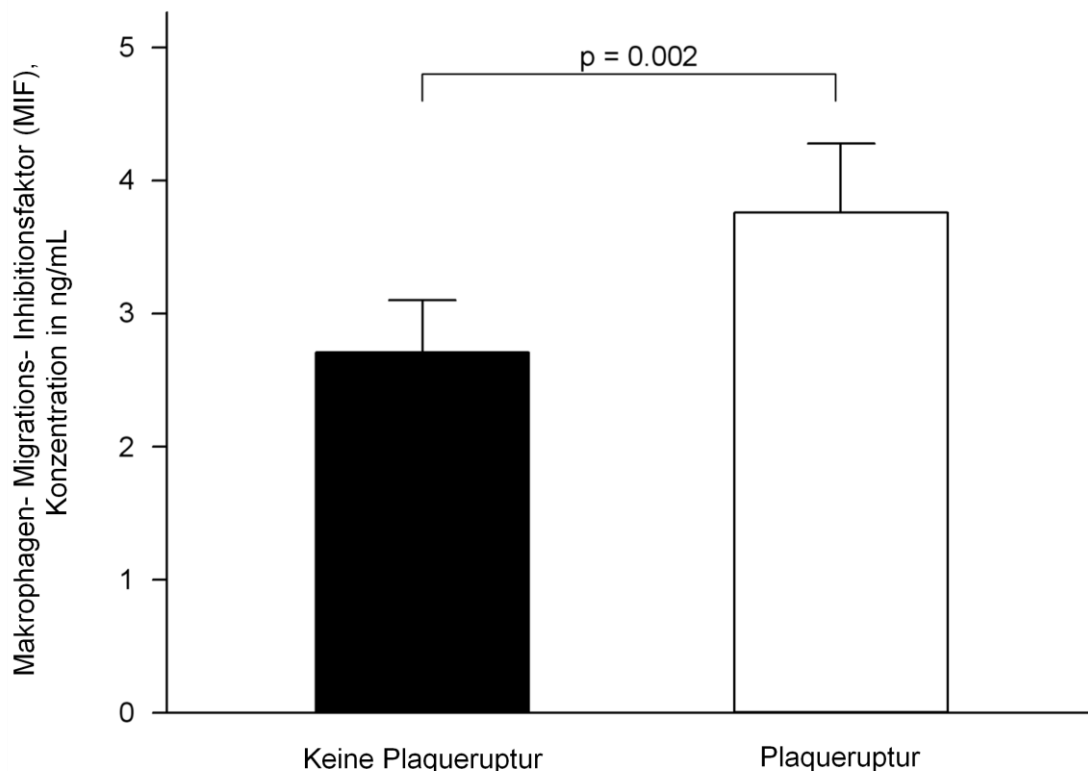
Plättchenfunktion (CAD, AMI: n=73)	MIF ≤ 1.96 ng/ml	MIF > 1.96 ng/ml	p - Wert
Aggregation nach Stimulation mit ADP 5 µmol/l [%]*	30.68±22.91	31.14±25.14	0.942
Aggregation nach Stimulation mit ADP 20 µmol/l [%]*	46.36±17.13	44.92±18.73	0.758
Deaggregation [%]*	15.68±12.75	13.78±12.92	0.565

\* Mittelwert ± Standardabweichung

### 3.5.1. MIF-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit Plaqueruptur

Patienten mit einem ACS sind im Rahmen der Koronarangiographie auf das Vorliegen einer Plaqueruptur hin untersucht worden. Demnach weisen Patienten mit einer angiographisch bestätigten Läsion als Folge einer vulnerablen Plaqueruptur signifikant erhöhte MIF-Plasmakonzentrationen auf als ACS-Patienten mit einer stabilen, aber hämodynamisch relevanten Stenose. ( $p = 0,002$ , Abb. 23)

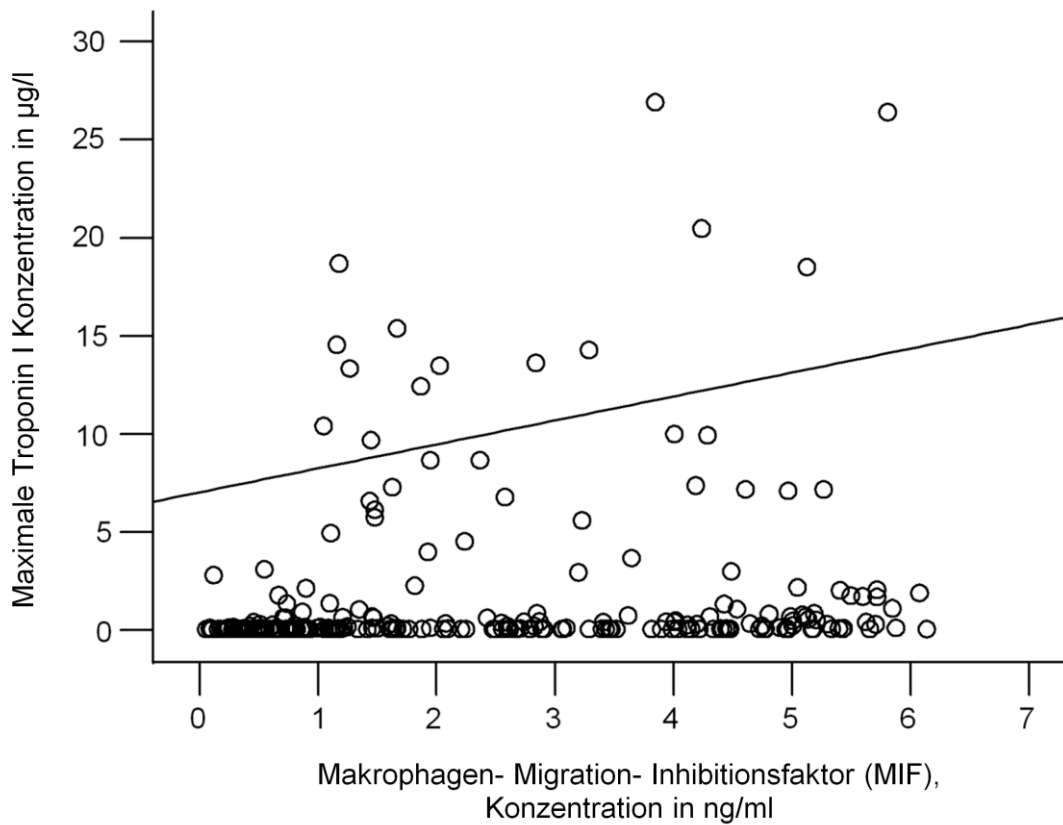
In der Grenzwertoptimierungskurve lag der Cut-off-Wert von ACS-Patienten mit einer Sensitivität von 82% und Spezifität von 56% bei 1,22 ng/ml. Demgegenüber stehen mit 1,7 ng/ml, einer Sensitivität von 67% und einer Spezifität von 62%, Patienten mit einer stabilen koronaren Herzerkrankung. Patienten mit einer Plaqueruptur und einem MIF-Spiegel  $> 5,1$  ng/ml konnten mit einer Spezifität von 92% diagnostiziert werden.



**Abb. 23:** MIF Plasmakonzentrationen mit und ohne Plaquerupturen, keine Plaqueruptur n=71 und MIF=2,72 ng/ml, Plaqueruptur n=42 und MIF=3,78 ng/ml, p=0,002.

### 3.6. Korrelation zwischen MIF- und Troponin I -Werten

Die maximalen Troponin I - Werte nach einer PCI korrelieren bei einem Spearman Rangkoeffizient von 0,31, p<0,001 in der untersuchten Patientenkohorte hochsignifikant mit dem Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor (MIF).

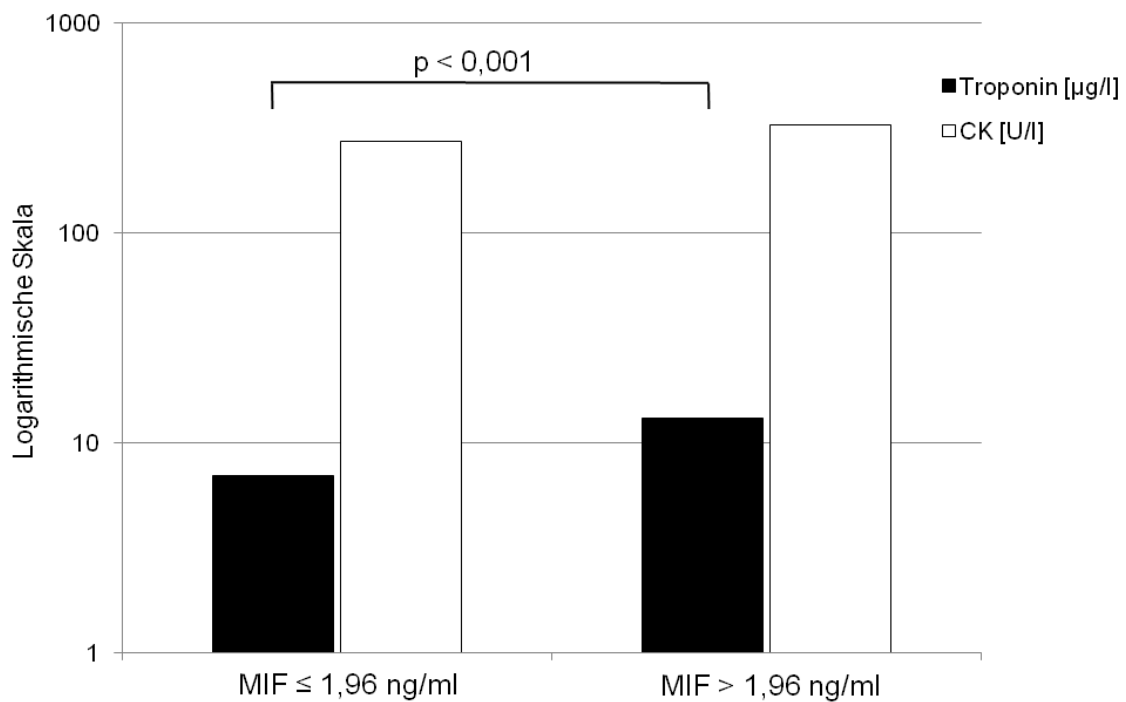


**Abb. 24:** Korrelation maximaler MIF- und Troponin I-Werte nach einer perkutanen Koronarintervention (PCI), n= 284, Spearman Korrelationskoeffizient 0,31, p<0,001.



### 3.6.1. Assoziation von Troponin und Creatinkinase mit MIF

Einteilung des Kollektivs abhängig vom MIF-Median (MIF < 1,96 ng/ml und MIF > 1,96 ng/ml). Patienten mit erhöhten MIF-Werten weisen signifikant erhöhte Troponinkonzentrationen auf ( $p < 0,001$ ). Für die Creatinkinase ergibt sich kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 25:** Assoziation von Troponin und Creatinkinase mit MIF. Troponin (n=262) und  $p < 0,001$ , Kreatinkinase (n=260) und  $p = 0,462$ .

### 3.7. Verlaufsuntersuchung bei Patienten mit CAD und AMI

Nach einer dreimonatigen Verlaufsbeobachtung bei Patienten mit einer stabilen koronaren Herzerkrankung (CAD) und bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt (AMI) ergibt sich für keinen der unten stehenden Parameter ein Zusammenhang mit der Höhe des exprimierten MIF.

**Tabelle 5:** Dreimonatige Verlaufsuntersuchung bei Patienten mit CAD und AMI mit Einteilung in einen MIF- Median

<b>3 monatige Verlaufsuntersuchung (CAD, AMI: n=78)</b>	<b>MIF ≤ 1,96 ng/ml</b>	<b>MIF &gt; 1,96 ng/ml</b>	<b>p - Wert</b>
Akuter Myokardinfarkt, nein. (%)	1 (1,3)	3 (3,8)	0,71
Akute Stentthrombose, nein. (%)	4 (5,1)	11 (14,1)	0,59
Hirnfarkt, nein. (%)	0 (0)	0 (0)	1
Todesfälle, nein. (%)	1 (1,3)	2 (2,6)	0,61
Rehospitalisierung, nein. (%)	12 (15,4)	43 (55,1)	0,31
Unterziehung einer anderen coronaren Intervention, nein. (%)	7 (9,0)	33 (42,3)	0,12

---

Leichte Blutung, nein. (%)	3 (3,8)	7 (9,0)	0,72
Schwere Blutung, nein. (%)	0 (0)	1 (1,3)	0,58

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Die wichtigsten Ergebnisse in der Übersicht

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Expression von MIF bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom in einer frühen Phase des Ereignisses signifikant erhöht ist. Dabei liegen die MIF-Konzentrationen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom mit 2,85 ng/ml deutlich über den MIF-Konzentrationen bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris (1,22 ng/ml,  $p < 0,001$ ). Beide Patientengruppen unterscheiden sich signifikant von der gesunden Probandengruppe mit einer MIF-Konzentration von 0,09 ng/ml,  $p < 0,001$  (siehe Abb. 8). Dieser Effekt ist unabhängig von den untersuchten kardiovaskulären Risikofaktoren, die einen Einfluss auf die Inzidenz und die Prognose eines akuten Koronarsyndroms haben.

### 4.2. Komplexe Interaktion von MIF, Atherosklerose und Chemokinen

MIF ist bereits in vielen inflammatorischen Erkrankungen, wie der Arthritis<sup>13</sup>, dem septischen Schock<sup>14</sup>, der Colitis und dem hypersensitiven Syndrom beschrieben worden. MIF ist ein Chemokin-ähnliches Protein und erfüllt in Bezug auf die Rekrutierung und Chemotaxis inflammatorischer Zellen und der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen eine Chemokin-ähnliche Funktion. Die Assoziation von MIF und der Entwicklung schwerer Gefäßwandläsionen wurde zuvor schon in Tiermodellen mit hypercholesterolämischen Ratten beschrieben.<sup>16</sup>

Weiterhin lassen die Arbeiten von Morand, Bernhagen und Penela auf eine entscheidende Interaktion von MIF, Atherosklerose und Inflammation schließen, da MIF die beiden Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 aktiviert und dadurch die inflammatorisch wirkenden Monozyten und Lymphozyten rekrutiert.<sup>28, 29, 30</sup>

Die Theorie einer vermehrten MIF-Produktion in Zellen arteriosklerotischer Läsionen konnte zudem erfolgreich von Burger und Pan belegt werden.<sup>32, 33</sup>

Die Komplexität einer arteriosklerotischen Läsion macht eine Interpretation der Interaktion von MIF mit Zelltypen und anderen Chemokinen der Läsion weiterhin sehr schwierig, was die vielseitigen Wechselwirkungen mit den Mediatoren

der akuten Inflammation, IL-6, TNF- $\alpha$  und der P-Selectine betrifft, als auch den Einfluss von MIF auf Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und die Th1/2-differenzierenden Zellen. Die hier bestehenden Wechselwirkungen sollten näher untersucht werden.

#### 4.3. Interaktion von MIF mit Entzündungsmarkern

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die Expression von MIF mit der Expression etablierter Entzündungsmarker assoziiert ist. Teilt man das Patientenkollektiv in solche Patienten mit hohem MIF-Plasmaspiegel und solche mit niedrigem Plasmaspiegel ein, wobei der Median der MIF-Konzentrationen von allen untersuchten Patienten als Grenze dient, nämlich 1,96 ng/ml, so zeigt sich bei Patienten mit hohen MIF-Werten eine statistisch signifikante Erhöhung des CRPs und der IL-6-Werte ( $p < 0,001$  und  $p < 0,05$ , siehe Abb. 21). Erhöhungen der plasmatischen MIF-Konzentration nach akuten koronarischämischen Ereignissen sind bereits bekannt.<sup>26</sup>

Die Verstärkung einer entzündlichen Antwort ist für die Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms maßgebend, das seinerseits häufig zu einer perkutanen koronaren Intervention (PCI) führt. Die Tatsache, dass Patienten mit hohen MIF-Werten auch hohe CRP- und IL-6-Werte aufweisen, zeigt, dass in diesen Patienten die inflammatorische Reaktion verstärkt ist. Frühere Studien konnten demonstrieren, dass eine Verbindung zwischen dem Grad einer gemessenen inflammatorischen Antwort, der Thrombozytenhyperaktivität und dem Ergebnis eines koronarinterventionellen Eingriffes existiert.<sup>3, 18</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, inwieweit MIF eine Auswirkung auf die Sekretion von kardialen Nekrosemarkern hat. Hier fand sich eine Korrelation initialer MIF-Konzentrationen mit maximalen Troponinwerten nach einer PCI (Korrelationskoeffizient 0,31,  $p < 0,001$ , siehe Abb.24). Bisher wurden solche Messungen in der Literatur nicht durchgeführt, sodass es keine Vergleichswerte gibt. Es ist denkbar, dass Patienten mit ausgeprägterem Myokardschaden eine verstärkte inflammatorische Antwort zeigen, in deren Rahmen auch vermehrt MIF ausgeschüttet wird. Umgekehrt könnte ein aufgrund eines

allgemein erhöhten inflammatorischen Niveaus erhöhter MIF-Spiegel ein akutes Koronarsyndrom auslösen und in seinem Verlauf aggravieren, so dass es zu einer ausgeprägteren Myokardnekrose kommt. Die tatsächlich zugrunde liegenden Mechanismen sollten in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

#### 4.4. Assoziation kardiovaskulärer Risikofaktoren mit MIF

Es gibt bisher nur wenige Bestimmungen von gemessenen MIF- Werten im Blut von gesunden Probanden. Die MIF- Spiegel der gesunden Probanden dieser Arbeit lagen im Mittel bei 0,18 ng/ml und wurden 3-fach bestimmt.<sup>116</sup> Das Durchschnittsalter lag bei 28,9 Jahren. Kim H. et al. kommen bei ihren Messungen an gesunden Probanden zu Werten von 1,08 ng/mL und bei Yu Xy et al. zu Werten von 1,2 ng/ml.<sup>27</sup> Stoppe et al. dokumentieren MIF Werte von 12,5 ng/ml bei gesunden Erwachsenen.<sup>119</sup> Diese Unterschiede machen eine Vergleichbarkeit mit anderen Daten schwierig. Zum einen wurden in den genannten Studien ELISA- Verfahren anderer Hersteller verwendet und zum anderen das durchschnittliche Alter der gesunden Probanden nicht angegeben. Da es sich bei diesen Studien auch um asiatische Populationen handelt, ist eine ethnisch bedingte und unterschiedlich hohe Konzentration von MIF im peripheren Blut möglich.

In der vorliegenden Arbeit wiesen Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit einem erhöhten MIF- Pegel ein höheres Alter auf und litten häufiger an einer arteriellen Hypertonie und einer Hyperlipidämie. Des Weiteren werden sie häufiger mit Aspirin, Clopidogrel und Statinen behandelt (Abb. 9 und Abb. 10). Aktuell bestehen keine evidenten Erkenntnisse, die den Zusammenhang von MIF und arterieller Hypertonie beschreiben. Dieser Zusammenhang wird nach aktueller Kenntnislage in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Jedoch bestehen Wechselwirkungen zwischen einer Inflammation, der Atherosklerose und einer arteriellen Hypertonie. Angiotensin II löst demnach über Produktion von Superoxidanionen die Expression von IL-6 und MCP-1 in den arteriellen Endothelzellen aus.<sup>120, 121,122</sup>

Dementsprechend bestehen zwischen den kardiovaskulären Risikofaktoren, der Atherosklerose und der Inflammation vielfältige Wechselwirkungen. In einer tierexperimentellen Studie mit Ratten führte eine verminderte MIF- Expression im paraventriculären Nucleus zu einer arteriellen Hypertonie und zur kardialen Hypertrophie.<sup>100</sup> Inwiefern diese Erkenntnis auf den Menschen übertragbar ist, bleibt abzuwarten.

#### **4.5. MIF und seine Assoziation mit Gesamtcholesterin, HDL und LDL**

Die im Plasma gemessenen MIF-Spiegel korrelierten in keiner der Patientengruppen mit den Serumwerten von Gesamt-Cholesterin, LDL und HDL. (Abb.11). In anderen Arbeiten wird beschrieben, dass oxidiertes LDL-Cholesterin zu einer Sekretion von MIF aus Makrophagen und Endothelzellen führt.<sup>117</sup> Atsumi et al. berichten, dass MIF sowohl die Aufnahme von oxidierten LDL in die Zelle, als auch die Degredation von MIF fördert.<sup>118</sup> Dieser komplexe Mechanismus müsste in Zukunft noch besser untersucht werden. Zudem wurden alle Patienten in der vorliegenden Studie mit Statinen behandelt, so dass die Konzentrationen von Gesamtcholesterin, HDL und LDL durch die Einnahme der Statine verändert waren.

##### **4.5.1. MIF und Herzinsuffizienz**

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen den im peripheren Blut gemessenen MIF- und BNP Werten (Abb. 20). BNP wird über die Dehnung der Herzmuskelzellen im Ventrikel sezerniert, wogegen MIF vermehrt in akut- koronarischämischen Ereignissen freigesetzt wird.<sup>123</sup> Eine Korrelation dieser beiden Parameter wird auch in der aktuellen Literatur nicht beschrieben.

#### 4.6. MIF- Plasmaspiegel und das Auftreten von Plaquerupturen

Die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und ihre Migration in die Gefäßwand fördert die Entstehung von Atherosklerose und instabilen Plaques. Die verschiedenen Phasen der Monozyten- und Makrophagenrekrutierung, der Adhäsion und der Transmigration werden durch verschiedene Chemokine reguliert.<sup>11, 12</sup>

Patienten mit einer akuten Plaqueruptur in den Koronararterien weisen deutlich erhöhte Plasmaspiegel von MIF auf (Abb. 23). Das lässt darauf schließen, dass MIF eine wichtige Rolle in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques und der Plaqueinstabilität spielt. MIF könnte damit als ein neuer Marker für das Risiko instabiler Plaques und damit für das Auftreten eines akuten Koronarsyndromes dienen. Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Berichte zu klinischen Untersuchungen über die Assoziation von MIF-Plasmaspiegeln und Markern der Plaque-Instabilität. In einer chinesischen Population konnte bereits eine signifikante Korrelation von MIF mit dem „activator protein-1“ (AP-1) und mit den Konzentrationen der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) gefunden werden.<sup>17</sup>

Dies lässt die Vermutung zu, dass bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, die hohe MIF-Spiegel aufweisen, auch eine höhere Plaque-Instabilität vorliegt. Neben der in dieser Arbeit dargestellten Korrelation zwischen erhöhten MIF-Konzentrationen und der Schwere einer koronararteriellen Erkrankung zeigen auch Arbeiten von Takahashi und Yu erhöhte MIF-Konzentrationen bei Patienten mit koronarischämischen Ereignissen und Myokardinfarkten. Darüber hinaus wird in diesen Studien über eine Assoziation der MIF-Level mit Plaqueinstabilitäten berichtet, die einen Zusammenhang zwischen der inflammatorischen Antwort und der Thrombozytenfunktion nahe legen.<sup>24, 25</sup>



#### 4.7. Assoziation der Plättchenfunktion mit MIF

Die Thrombozytenfunktion wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls analysiert und mit den MIF-Spiegeln im peripheren Blut in Zusammenhang gestellt. Dabei ergab sich für die residuale Plättchenaggregation bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und entsprechend erhöhten MIF- Werten kein relevanter Zusammenhang mit der Höhe der residuellen Plättchenaggregation (siehe Tabelle 4). Nach Durchführung einer dreimonatigen Verlaufsbeobachtung bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ergab sich für keinen der Verlaufsp Parameter ein Zusammenhang mit der Höhe der MIF-Plasmaspiegel (Tabelle 5).

In der Literatur wird ein protektiver Effekt von MIF auf die Apoptose der Kardiomyozyten beschrieben. Dabei inhibiert MIF das intrazelluläre Protein JAB-1, wodurch die MAPK- und ERK Signale moduliert und dadurch die zelluläre Apoptose gehemmt wird.<sup>117</sup> Eine kurzzeitige Inkubation mit MIF vermehrt die Expression des Platelet-derived growth factor BB (PDGF-B) und verstärkt dadurch die Immigration glatter Muskelzellen in die Gefäßwand. Dagegen führt eine langfristige Inkubation mit MIF zu einer verminderten Expression des Platelet-derived growth factor BB (PDGF-B) und folglich zu einer verminderten Immigration glatter Muskelzellen in die Gefäßwand. Die Proliferation der vaskulären Zellen wird von MIF beeinflusst und führt neben anderen Faktoren zu einer kontinuierlichen Restenosierung der Gefäße.<sup>124, 125, 126</sup>

Folglich besitzt MIF bei einer akuten koronaren Ischämie protektive Eigenschaften und in seiner Langzeitwirkung eine progressive atherosklerotische Eigenschaft.

#### 4.8. Limitationen der Studie

Die vorliegende Arbeit beruht auf einer reinen Beobachtungsstudie und ist nicht prospektiv. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind keiner weiteren Analyse unterzogen worden. Demnach wäre eine prospektive Patientenstudie mit größerer Fallzahl erforderlich, um die Güte von MIF als prognostischen Faktor für die Plaqueruptur und damit für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms zu untersuchen. Dies würde den Vergleich mit anderen etablierten Markern und Risikofaktoren verbessern, um die Relevanz von MIF als Marker für das Risiko des akuten Koronarsyndroms zu evaluieren. Somit wäre eine fundiertere Aussage über das Risiko einer Plaqueruptur, dem klinischen Outcome und der Mortalität möglich.

#### 4.9. Schlussfolgerung

Die hier beschriebenen Ergebnisse demonstrieren eine hochsignifikante und unabhängige Assoziation erhöhter MIF-Konzentrationen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris oder gesunden Probanden. Zusätzlich korreliert der MIF-Plasmaspiegel mit der inflammatorischen Antwort und der Höhe kardialer Nekrosemarker im akuten Koronarsyndrom. Diese Erkenntnis ist von klinischer Relevanz, weil ein Zusammenhang zwischen der inflammatorischen Antwort, der Thrombozytenfunktion und dem Auftreten ungünstiger kardiovaskulärer Ereignisse, wie sie bei Stentthrombosen schon beschrieben wurden, besteht.<sup>18</sup>

Dementsprechend sind multimodale Strategien erforderlich, um die Frage zu klären, ob anti-inflammatorische und plaquestabilisierende Ansätze zu einer verbesserten Prognose bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung nach PCI führen können.<sup>19</sup> Die Bestimmung der MIF-Spiegel im peripheren venösen Blut könnte zur Risikostratifizierung beitragen und so die erfolgreiche Behandlung des akuten Koronarsyndroms unterstützen.

Im Einzelnen konnte die vorliegende Arbeit folgende Sachverhalte zeigen:

1. Die Expression des Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktor ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant erhöht.
2. Erhöhte MIF-Konzentrationen gehen mit der Erhöhung etablierter Entzündungsparameter einher, wie CRP und IL-6.
3. Erhöhte MIF-Plasmaspiegel gehen mit erhöhten kardialen Nekrosismarkern einher, wie Troponin I.
4. Patienten mit einer angiographisch nachgewiesenen Plaqueruptur weisen signifikant höhere MIF-Plasmakonzentrationen auf als Patienten mit akutem Koronarsyndrom aufgrund einer stabilen, aber hochgradigen hämodynamisch relevanten Stenose.

## 5. Zusammenfassung

Nach heutigem Wissensstand sind die Kenntnisse über die klinische Bedeutung des Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktors (MIF) bei kardiovaskulären Erkrankungen gering. Ziel dieser Arbeit war die Frage, inwieweit die Messung von MIF zur Risikostratifizierung für kardiovaskuläre Erkrankungen in Frage kommt und ob eine Assoziation mit etablierten inflammatorischen Markern vorliegt.

Es wurden insgesamt 286 Patienten mit einer symptomatischen- koronaren Herzerkrankung und 25 gesunde Probanden untersucht. Mittels eines anti Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktor- ELISA wurde die MIF- Konzentration im EDTA-Plasma bestimmt und die Assoziation mit etablierten Markern (kardiale Risikofaktoren: Cholesterol, HDL, LDL, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus; inflammatorische Marker: CRP, IL-6, MCP-1, Rantes, Monozyten- und Leukozytenzahlen; myokardialer Nekrosemarker: Troponin I; residuelle Thrombozytenaggregation unter dualer Plättchenhemmung) untersucht. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass eine erhöhte MIF- Konzentration mit der Erhöhung von etablierten inflammatorischen Markern assoziiert ist, ebenso wie mit einer Erhöhung kardialer Nekrosemarker und dem Auftreten akuter Plaquerupturen. Insgesamt weisen Patienten mit akutem Myokardinfarkt die höchsten MIF-Spiegel im Blut auf, gefolgt von Patienten mit stabiler Angina pectoris. Gesunde Probanden zeigten die niedrigsten Werte für MIF.

Der Makrophagen- Migration- Inhibitionsfaktor könnte damit als neuer Biomarker für die Vorhersage von Plaquerupturen und der Schwere akuter koronarer Ereignisse herangezogen werden. Zudem könnte eine Therapie, basierend auf einer Beeinflussung der MIF- assoziierten Pathomechanismen, eine mögliche Option für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
- 2 Geisler T, Bhatt DL. The role of inflammation in atherothrombosis: current and future strategies of medical treatment. *Med SciMonit.* 2004;10(12):RA308-16. Review.
- 3 Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.*2005;115(12):3378-84.
- 4 May AE, Kälsch T, Massberg S, et al. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002;106(16):2111-7.
- 5 Gresele P, Falcinelli E, Loffredo F, Cimmino G, Corazzi T, Forte L, Guglielmini G, Momi S, Golino P. Platelets release matrix metalloproteinase-2 in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes: possible role in sustained platelet activation. *EurHeart J.* 2011;32(3):316-25.
- 6 Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89: 36–44.
- 7 Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.*2001;414(6866):920-4.
- 8 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):791-800.
- 9 Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *MicrobesInfect.* 2002;4(4):449-60.
- 10 Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, Graffy C, Garlachs CD, Böckler D, Menschikowski D, Braun-Dullaeus R, Daniel WG, Strasser RH. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability. *Atherosclerosis.*2005;178(1):83-94.

- 11 Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2008;28(11):1897-908.
- 12 Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood.* 2009;114(21):4613-23.
- 13 Calandra T, Roger T, Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*2003;791– 800.
- 14 Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993;365:756–759.
- 15 Schober A, Bernhagen J, Weber C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *JMol Med* 2008;86:761–770.
- 16 Lin SG, Yu XY, Chen YX, Huang XR, Metz C, Bucala R, Lau CP, Lan HY. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res*2000;87:1202–1208.
- 17 Yang LX, Guo RW, Qi F, Miao GH, Wang XM, Shi YK, Li MQ. Association between plasma macrophage migration inhibitory factor concentration and coronary artery lesion severity. *ZhonghuaXinXue Guan Bing ZaZhi.* 2008;36(10):912-5.
- 18 Müller K, Aichele S, Herkommer M, Bigalke B, Stellos K, Htun P, Fateh-Moghadam S, May AE, Flather M, Gawaz M, Geisler T. Impact of inflammatory markers on platelet inhibition and cardiovascular outcome including stent thrombosis in patients with symptomatic coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):256-62.
- 19 Saltzman AJ, Mehran R, Hooper WC, et al. The relative effects of abciximab and tirofiban on platelet inhibition and C-reactive protein during coronary intervention. *J Invasive Cardiol.*2010;22(1):2-6.
- 20 Ouertatani-Sakouhi H, El-Turk F, Fauvet B, Cho MK, Pinar Karpinar D, Le Roy D, Dewor M, Roger T, Bernhagen J, Calandra T, Zweckstetter M, Lashuel HA. Identification and characterization of novel classes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors with distinct mechanisms of action. *J Biol Chem.* 2010;285(34)26581-98.
- 21 Kleemann R, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators of inflammation* 2010;2010:610479.
- 22 Calandra T., et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.*1995;377:68–71.

- 23 Flaster H., Bernhagen J., Calandra T., Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol. Endocrinol.* 2007;21:1267–1280.
- 24 Takahashi M, Nishihira J, Katsuki T, Kobayashi E, Ikeda U, Shimada K. Elevation of plasma levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 2002;89:248-9.
- 25 Yu C.M., Lai K.W., Chen Y.X., Huang X.R., Lan H.Y. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. *J. Histochem. Cytochem.* 2003;51:625–631.
- 26 Jian Z, Li JB, Ma RY, et al. Increase of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in cardiomyocytes during chronic hypoxia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009;405:132-8.
- 27 Yu XY, Chen HM, Liang JL, et al. Hyperglycemic myocardial damage is mediated by proinflammatory cytokine: macrophage migration inhibitory factor. *PLoS one* 2011;6:e16239.
- 28 Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(5):399–410.
- 29 Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007;13(5):587–96.
- 30 Penela P, Ribas C, Mayor F., Jr Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* 2003;15(11):973–81.
- 31 Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19:76–86.
- 32 Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation.*2002;105:1561–6.
- 33 Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*2004;109(25):3149–53.
- 34 Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;109(3):380–5.



- 35 Takahashi M, Nishihira J, Shimpo M, Mizue Y, Ueno S, et al. Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2001;52:438–45.
- 36 Dhanantwari P, Nadaraj S, Kenessey A, Chowdhury D, Al-Abed Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces cardiomyocyte apoptosis. *BiochemBiophys Res Commun.* 2008;371:298–303.
- 37 Weiser, W. Y. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 1989;7522–7526.
- 38 Ishizaka, K., Ishii, Y., Nakano, T. & Sugie, K. Biochemical basis of antigen-specific suppressor T cell factors: controversies and possible answers. *Adv. Immunol.* 2000;74, 1–60.
- 39 Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 2002;4, 449–460.
40. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 1994;179, 1895–1902.
41. Bacher, M. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Amer. J. Pathol.* 1997;150, 235–246.
- 42 Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 1994;179, 1895–1902.
- 43 Bacher, M. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Amer. J. Pathol.* 1997;150, 235–246.
- 44 Fingerle-Rowson, G. et al. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *Am. J. Pathol.* 2003;162, 47–56.
- 45 Leng, L. et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* 2003;197, 1467–1476.
- 46 Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Calandra, T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Endotoxin Res.* 2003;9, 119–123.
- 47 Roger, T., David, J., Glauser, M. P. & Calandra, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001;414, 920–924.

48. Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Calandra, T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Endotoxin Res.* 2003;9, 119–123.
49. Hudson, J. D. et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 1999;190, 1375–1382.
50. Calandra, T. et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995;377, 68–71.
51. Bacher, M. et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996;7849–7854.
52. Donnelly, S. C. et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med.* 1997;3, 320–323.
53. Makita, H. et al. Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158, 573–579.
54. Onodera, S. et al. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* 1999;11, 163–167.
55. Onodera, S. et al. Macrophage migration inhibitory factor upregulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2002;277, 7865–7874.
56. Greten H., Rinninger F., Greten T., *Innere Medizin* 2010:40-41
57. Gerd Herold und Mitarbeiter, *Innere Medizin* 2010:231
58. Gerok, Huber, Meinertz, Zeidler, *Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt* 2007:138
59. Gao XM, Liu Y, White D, et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor protects the heart from severe ischemia-reperfusion injury: a predominant role of anti-inflammation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2011;50:991-9.
60. Chagnon F, Metz CN, Bucala R, Lesur O. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circulation research* 2005;96:1095-102.

- 61 Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;5191-5196.
- 62 Suzuki, H., Kanagawa, H., Nishihira, J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol.Lett.* 1996;51, 141-147.
- 63 Chook, Y. M., Gray, J. V., Ke, H., Lipscomb, W. N. The monofunctional chorismatase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismatase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J.Mol.Biol.* 1994;240, 476-500.
- 64 Subramanya, H. S., Roper, D. I., Dauter, Z., Dodson, E. J., Davies, G. J., Wilson, K. S., Wigley, D. B. Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry* 1996;35, 792-802.
- 65 Swope, M., Sun, H. W., Blake, P. R., Lolis, E. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J.* 1998;17, 3534-3541.
- 66 Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T. & Bucala, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Biol. Chem.* 1999;274, 18100–18106.
- 67 Petrovsky, N., Socha, L., Silva, D., Grossman, A. B., Metz, C., Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol.Cell Biol.* 2003;81, 137-143.
- 68 Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J. A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C. N., Nicod, P., Bucala, R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;4782-4787.
- 69 Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A., Bucala, R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 1994;33, 14144-14155.
- 70 Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Dhabhar, F. S., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., Bucala, R. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol.Med.* 1998;4, 217-230.

- 71 Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K., Bucala, R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med.* 1995;1, 781-788.
- 72 Mitchell, R. A. & Bucala, R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin. Cancer Biol.* 2000;10, 359–366.
- 73 Mitchell, R. A. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 99, 2002;345–350.
- 74 Roger, T., Glauser, M. P. & Calandra, T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J. Endotoxin. Res.* 2001;7, 456–460.
- 75 Foote, A., Briganti, E. M., Kipen, Y., Santos, L., Leech, M., Morand, E. F. Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2004;31, 268-273.
- 76 Kariya, S., Okano, M., Aoji, K., Kosaka, M., Chikumoto, E., Hattori, H., Yuen, K., Nishioka, S., Nishioka, K., Nishizaki, K. Role of macrophage migration inhibitory factor in otitis media with effusion in adults. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 2003;10, 417-422.
- 77 Kitaichi, N., Kotake, S., Mizue, Y., Matsuda, H., Onoe, K., Nishihira, J. Increase of macrophage migration inhibitory factor in sera of patients with iridocyclitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2000;84, 1423-1425.
- 78 Kitaichi, N., Kotake, S., Sasamoto, Y., Namba, K., Matsuda, A., Ogasawara, K., Onoe, K., Matsuda, H., Nishihira, J. Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999;40, 247-250.
- 79 Niino, M., Ogata, A., Kikuchi, S., Tashiro, K., Nishihira, J. Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. *J. Neurol. Sci.* 2000;179, 127-131.
- 80 Sakai, Y., Masamune, A., Satoh, A., Nishihira, J., Yamagiwa, T., Shimosegawa, T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003;124, 725-736.

- 81 Yabunaka, N., Nishihira, J., Mizue, Y., Tsuji, M., Kumagai, M., Ohtsuka, Y., Imamura, M., Asaka, M. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23, 256-258.
- 82 Selvi, E., Tripodi, S. A., Catenaccio, M., Lorenzini, S., Chindamo, D., Manganelli, S., Romagnoli, R., Ietta, F., Paulesu, L., Miracco, C., Cintonino, M., Marcolongo, R. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62, 460-464.
- 83 Steinhoff, M., Meinhardt, A., Steinhoff, A., Gemsa, D., Bucala, R., Bacher, M. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. *Br. J. Dermatol.* 1999;141, 1061-1066.
- 84 Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A., Mizue, Y., Nishihira, J. Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;240, 173-178.
- 85 Lan, H. Y., Yang, N., Nikolic-Paterson, D. J., Yu, X. Q., Mu, W., Isbel, N. M., Metz, C. N., Bucala, R., Atkins, R. C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2000;57, 499-509.
- 86 Matsumoto, K., Kanmatsuse, K. Increased production of macrophage migration inhibitory factor by T cells in patients with IgA nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 2001;21, 455-464.
- 87 Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Weaver AL, Kirwan JP. Elevated circulating levels of macrophage migration inhibitory factor in polycystic ovary syndrome. *Cytokine* 2010;51:240-244.
- 88 Kim H, Lee S, Kim HJ, et al. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in women with metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 2011;43:642-5.
- 89 Miller EJ, Li J, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature* 2008;451:578-82.
- 90 Ma H, Wang J, Thomas DP, et al. Impaired macrophage migration inhibitory factor-AMP-activated protein kinase activation and ischemic recovery in the senescent heart. *Circulation* 2010;122:282-92.
- 91 Koga K, Kenessey A, Powell SR, Sison CP, Miller EJ, Ojamaa K. Macrophage migration inhibitory factor provides cardioprotection during ischemia/reperfusion by reducing oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 2011;14:1191-202.

- 92 Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clinical and experimental immunology* 2001;123:309-14.
- 93 Bansilal S, Farkouh ME, Fuster V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *The American journal of cardiology* 2007;99:6B-14B.
- 94 Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1821-30.
- 95 Festa A, D'Agostino R, Jr., Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002;51:1131-7.
- 96 Atsumi T, Cho YR, Leng L, et al. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J Immunol* 2007;179:5399-406.
- 97 Herder C, Kolb H, Koenig W, et al. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4). *Diabetes care* 2006;29:368-71.
- 98 Church TS, Willis MS, Priest EL, et al. Obesity, macrophage migration inhibitory factor, and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:675-81.
- 99 Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circulation research* 2009;105:99-107.
- 100 Li H, Gao Y, Qi Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor in hypothalamic paraventricular nucleus neurons decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008;22:3175-85.
- 101 Lahoz C, Mostaza JM. Atherosclerosis as a systemic disease. *Rev Esp Cardiol* 2007;60(2):184–195.
- 102 Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
- 103 Chakrabarti SK, Wen Y, Dobrian AD, et al. Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2011;300:E175-87.

- 104 Rodriguez G, Mago N, Rosa F. [Role of inflammation in atherogenesis]. *Investigacion clinica* 2009;50:109-29.
- 105 Böcker, Denk, Heitz, Moch. *Pathologie* 2008:500-503
- 106 Choi ET, Collins ET, Marine LA, et al. Matrix metalloproteinase-9 modulation by resident arterial cells is responsible for injury-induced accelerated atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25:1020-5.
- 107 Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert review of cardiovascular therapy* 2007;5:265-82.
- 108 Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, et al. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *The Journal of cell biology* 2005;171:61-73. 109 Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *The Journal of clinical investigation* 2002;110:905-11.
- 110 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews Immunology* 2003;3:791-800.
- 111 Weber C, Kraemer S, Drechsler M, et al. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:16278-83.
- 112 Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2004;109:3149-53.
- 113 Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, et al. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis* 2006;184:28-38.
- 114 Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular research* 2008;79:360-76.
- 115 Jeffrey M. Vinocur, Wikimedia Commons, lizenziert unter Creative Commons CC-BY 2.5
- 116 Muller, II, Muller KA, Schonleber H, et al. Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. *PloS one* 2012;7:e38376.

- 117 Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1561-6.
- 118 Atsumi T, Nishihira J, Makita Z, Koike T. Enhancement of oxidised low-density lipoprotein uptake by macrophages in response to macrophage migration inhibitory factor. *Cytokine* 2000;12:1553-6.
- 119 Stoppe C, Fries M, Rossaint R, et al. Blood levels of macrophage migration inhibitory factor after successful resuscitation from cardiac arrest. *PloS one* 2012;7:e33512.
- 120 Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999;19:1623-9.
- 121 Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997;29:366-73.
- 122 Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- $\kappa$ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 1997; 95: 1532–1541
- 123 Bhalla V, Willis S, Maisel AS. B-type natriuretic peptide: the level and the drug--partners in the diagnosis of congestive heart failure. *Congest Heart Fail* 2004;10:3-27.
- 124 Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, Fu H, Zhang Y, Satoskar AR, David JR, Metz CN, Bucala R, Fang K, Simon DI, Chapman HA, Libby P, Shi GP. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2004; 109: 3149–3153.
- 125 Schrans-Stassen BH, Lue H, Sonnemans DG, Bernhagen J, Post MJ. Stimulation of vascular smooth muscle cell migration by macrophage migration inhibitory factor. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7: 1211–1216.
- 126 Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005; 96: 784–791.



## 7. Veröffentlichungen

1. Muller, II, Muller KA, Schonleber H, et al. Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. PLoS one 2012;7:e38376.

2. Muller, II, Schonleber H, Muller KA, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor is strongly up-regulated in patients with acute coronary syndrome  
Kreislaufforschung DGfK-H-u. 77. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung vom 27. bis 30. April 2011 in Mannheim. Clinical Research in Cardiology 2011;100:1-.P1634

## 8. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich zuallererst bei Herrn Prof. Dr. Gawaz für die Bereitstellung des Themas und die außerordentliche Betreuung. Er hat sich stets Zeit genommen und mich oft ungemein motiviert weiterzukommen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Iris Müller, die mich immer sehr gut betreut und sich selbst bei hektischem Stationsalltag, Zeit für mich genommen hat.

Herrn PD Dr. rer. nat. Hannes Schröter vom psychologischen Institut Tübingen danke ich für die statistische Betreuung, den Sachverstand, viel schwarzen Humor und Kaffee. Herrn PD Dr. med. Tobias Geisler danke ich ebenfalls für die statistischen Hilfestellungen.

Meinen Eltern danke ich für die unermessliche Unterstützung und Liebe, die sie mir zu allen Zeiten entgegengebracht haben. Ihre Warmherzigkeit und Fürsorge sind mir stets ein Vorbild.

Zum Ende danke ich meiner lieben Vera. Für diese wunderbare Verbindung und die Erkenntnis, dass es im Leben etwas gibt, das wichtiger ist als man selbst.

## 9. Curriculum vitae

Name: Schönleber

Vorname Heiko

Geburtsdatum: 21.09.1983

Geburtsort: Karlsruhe

Familienstand: ledig

**Schule:** 1990 – 1994 Grundschule Leopoldshafen

1994 – 1996 Hauptschule Eggenstein

1996 – 2001 Realschule Neureut

2001 – 2004 Friedrich-List-Gymnasium

2004 Abitur

**Praktika:** 01.10. – 31.12.2004 Pflegepraktikum im städtischen  
Klinikum Karlsruhe

**Ausbildung:** 10.01.2005 – 01.04.2005 Ausbildung zum Rettungs-  
sanitäter

10.04.2005 – 23.09.2005 Ausbildung zum Rettungs-  
assistent mit Staatsexamen

**Studium:** Seit 2007 Studium der Humanmedizin