



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1 in MCF-7 Zellen

Regulation über den MAPK-Pathway

Verfasserin

Andrea Hundsamer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Manfred Hüttinger nicht nur für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit bei ihm machen zu dürfen, bedanken, sondern auch für die Einführung in die Welt hinter den Kulissen eines Studenten als Tutorin und Prüfungsaufsicht.

Mein weiterer Dank gilt insbesondere Dr. Nina Zemann, die mich während dieser Arbeit immer unterstützt hat und mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich konnte von ihr viel Lernen und hatte die Freiheit selbstständig arbeiten zu dürfen. An Dankeschön auch an Mag. Adolf Zemann, der mich in die Welt der PCR eingeführt hat. Ebenso möchte ich mich auch bei allen anderen Leuten unseres Instituts bedanken, vor allem bei Dr. Hilde Laggner, für die gemeinsamen Pausen und Gespräche.

Ein besonderer Dank gilt Brigitte und Moni, die während dieser Arbeit immer Zeit für ein Gespräch und lange Kaffeepausen hatten. Sie hatten immer ein offenes Ohr und haben mich immer motiviert und moralisch unterstützt.

Danke auch an alle, die mich schon lange kennen, egal ob ich sie vor oder während meines Studiums kennengelernt habe, die mich unterstützt haben und während meiner Studienzeit immer für mich da waren. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft! Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester Karin, die immer an mich geglaubt hat!

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Mama, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre und die immer stolz auf mich war. Sie stand immer voll und ganz hinter mir und dafür bin ich ihr sehr dankbar!

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS.....	III
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
III TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR.....	3
2.1 Brustkrebs.....	3
2.2 Zink	5
2.2.1 Zink und Brustkrebs	7
2.2.2 Metallothioneine (MTs).....	10
2.3 MAPKinasen.....	12
2.3.1 ERK (Extrazellulär-regulierte Kinasen).....	14
2.3.2 p38.....	15
2.4 Das uPA-System	18
2.4.1 uPA (Urokinase-Plasminogen-Aktivator).....	19
2.4.2 PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor)	20
2.4.3 PAI-1 und Übergewicht	22
2.4.4 Das uPA-System und Brustkrebs	23
2.5 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	27
3 MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1 Zellkultur.....	31
3.1.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen.....	31
3.1.2 Zelllinie	32
3.1.3 Arbeitsbedingungen	32
3.1.4 Zellkulturmedium	32
3.1.5 Zellkultivierung und Aussetzen der Zellen.....	33
3.1.6 Inkubation mit Zink.....	33
3.2 Lysieren Western Blot.....	36
3.2.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen.....	36
3.3 Proteinbestimmung	38

3.3.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen	38
3.4 Western Blot.....	39
3.4.1 SDS-Gelelektrophorese	39
3.4.2 Western Blot Transfer	42
3.4.3 Immunodetektion	44
3.5 Lysieren PCR.....	47
3.5.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen	47
3.6 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	48
3.6.1 RNA-Isolierung	48
3.6.2 Reverse Transkription - cDNA-Synthese	49
3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
3.7 Wachstumstests	55
3.7.1 MTT-Test.....	55
3.7.2 Kristallviolet-Test.....	56
3.8 Gelatine-Zymogramm.....	59
3.8.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen	59
3.8.2 Probenvorbereitung	60
3.8.3 Beladung der Gele und Elektrophorese	60
3.9 Migrationstest oder Scratch-Test.....	61
3.9.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen	61
4 ERGEBNISSE.....	62
4.1 Einleitung.....	62
4.2 Aktivität verschiedener MAPK nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190.....	62
4.3 Expression des Gens PAI-1 in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190	66
4.4 Expression des Gens PAI-1 in Abhängigkeit der Zink-Konzentration.....	68
4.5 Aktivität der MAPKinasen in Abhängigkeit der Zink-Konzentration.....	70
4.6 MTT-Test.....	72
4.7 Adhäsionstest mittels Kristallviolett	73
4.8 Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen unter verschiedenen Zink- Konzentrationen	74
4.9 Zymogramm	76
5 DISKUSSION	77

6 ZUSAMMENFASSUNG	85
7 ABSTRACT	87
V LITERATURVERZEICHNIS.....	VIII

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Darstellung des MAPK-Pathway	17
Abbildung 2 Darstellung des uPA-Systems.....	19
Abbildung 3 Aufbau des Sandwiches für den Western Blot	43
Abbildung 4 Reduktion des gelben MTT in das blaue Formazan	55
Abbildung 5 Effekt von Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 auf pERK1/2 in MCF-7 Zellenmittels Western Blot.	64
Abbildung 6 Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von phospho-p38 und phospho-MAPKAP2 nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190.....	65
Abbildung 7 Einfluss von Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 auf die Genexpression von PAI-1 in MCF-7 Zellen.....	67
Abbildung 8 Expression von PAI-1 nach Inkubation mit verschiedenen Zink- Konzentrationen.....	69
Abbildung 9 Western Blot Signale von pERK1 und pERK2 bei verschiedenen Zink-Konzentrationen.....	70
Abbildung 10 Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von phospho-p38 und pMAPKAP2 nach mit verschiedenen Zink-Konzentrationen	71
Abbildung 11 MTT-Test nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190.	72
Abbildung 12 Kristallviolett-Test nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190.	73
Abbildung 13 Mikroskopische Darstellung von MCF-7 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Zink-Konzentrationen im Zeitverlauf.	75
Abbildung 14 Gelatinase-Zymogramm nach Inkubation mit verschiedenen Zinkkonzentrationen und den Inhibitoren U0126 und SB202190.....	76

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Pipettierschema zur Inkubation der MCF-7 Zellen.....	34
Tabelle 2 Pipettierschema zur Inkubation der verschiedenen Zinkkonzentrationen.....	35
Tabelle 3 Pipettierschema zur Herstellung eines 10%igen Trenngels.....	40
Tabelle 4 Pipettierschema zur Herstellung eines 4%igen Sammelgels.....	41
Tabelle 5 Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die cDNA- Synthese.....	50
Tabelle 6 Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR	52
Tabelle 7 Sequenzen der verwendeten sense/ anti-sense Primer	54

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
Cu	Kupfer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFS	Disease-free survival
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogen-Rezeptor
ERK 1/2	Extracellular regulated kinases 1/2
FCS	Fetales Kälberserum
FFA	Free Fatty Acid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
JNK	c-Jun-amino-terminale-Kinase
kDa	kiloDalton
LRP	LDL- Receptor-Related Protein
LTED	Long term estradiol deprivation
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAP2	MAPK-Activated Protein Kinase 2
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MNU	N-Methyl-N-Nitrosurea
mRNA	messengerRNA
MT	Metallothionein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid

MT1-MMP	Membrane-type1-MMP
NF-κB	Nuclear Factor-kappaB
OS	Overall Survival
PAI-1/2	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
TBE	Tris-Buffered Saline
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
tPA	Tissue-type Plasminogen Activator
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
Zn	Zink
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Zusammenhängen zwischen Zink, dem MAPK-Pathway und dem Gen PAI-1 in MCF-7 Zellen. In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine Zink-induzierte Stimulierung des MAPK-Pathways in der Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 nachgewiesen werden, ebenso wie eine Stimulierung von PAI-1 durch Zink.

Alle drei Elemente spielen eine sehr wichtige Rolle in der Progression, Migration, Differenzierung und Metastasis bei Brustkrebs. Zink ist ein essentielles Spurenelement in der menschlichen Ernährung und ist eines der häufigsten intrazellulären Elemente (Ho 2004). Es hat vielfältige Funktionen in zellulären Prozessen und ist unter anderem an der Zellproliferation, Immunfunktion, Wachstum, DNA-Synthese und Neurosensorik beteiligt (Wood 2000). PAI-1 ist ein Glycoprotein (Duffy and Duggan 2004) und der primäre Inhibitor des uPA-Systems (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Es wird von sehr vielen Zelltypen exprimiert, darunter auch Fibroblasten und Adipozyten (Beaulieu, Whitley et al. 2007). PAI-1 hat nicht nur die biologische Rolle eines Proteaseinhibitors alleine (Stefansson, McMahon et al. 2003). Der MAPK-Pathway ist an der Genexpression, dem Zellmetabolismus, der Apoptose, Differenzierung und vielem mehr beteiligt (Krishna and Narang 2008). Dieser Signaltransduktionsweg wird durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli, wie Hormone, Wachstumsfaktoren und umweltbedingten Stress, aktiviert (Krishna and Narang 2008).

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Zink auf die speziellen Vertreter pERK1, pERK2 und p-p38 des MAPK-Pathway untersucht sowie die Spezifität der Inhibitoren dieser beiden MAPKinasen mittels Western Blot überprüft. Als nächster Schritt wurde der Zusammenhang zwischen PAI-1 sowie Zink und dem MAPK-Pathway genauer betrachtet. Es wurde die Genexpression von PAI-1 unter dem Einfluss von Zink und den MAPK

untersucht. Damit konnte eine Verbindung zwischen diesen Elementen hergestellt werden.

Des Weiteren wurde bestimmt, ab welcher Konzentration die Stimulierung durch Zink in MCF-7 Zellen stattfindet. Das ist deswegen wichtig, weil Zink im Plasma in einer Konzentration von circa 10-20µM vorkommt. Allerdings wurden die vorherigen Versuche mit einer Konzentration von 100µM durchgeführt, was einem Vielfachen des üblichen physiologischen Werts entspricht.

Zum Schluss befasst sich die Arbeit auch noch mit der Adhäsion, Proliferation und Migration von MCF-7 Zellen, um einen eventuellen Einfluss von Zink auf diese Prozesse festzustellen. Diese Versuche sind bedeutend, da Adhäsion, Proliferation und Migration in der Entwicklung von Krebs eine entscheidende Rolle spielen. Des Weiteren wurde die Gelatinaseaktivität gemessen, um die Aktivität der MMPs 2 und 9 in MCF-7 Zellen zu untersuchen. Diese MMPs sind wichtig im Zusammenhang mit Krebs, infektiösen Erkrankungen, Wundheilung und vielen vaskulären Erkrankungen (Mathews-Roth, Michel et al. 1995; Kahari and Saarialho-Kere 1997; Coussens, Tinkle et al. 2000). Bei Brustkrebs sind diese zwei MMPs teilweise am Prozess der Metastasis beteiligt (Collier, Krasnov et al. 1992; Kallakury, Karikahalli et al. 2001).

Der Schwerpunkt der Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Zink-induzierten Stimulierung von PAI-1 und dem Zusammenhang mit dem MAPK-Pathway in MCF-7 Zellen. Diese Interaktionen sind von enormer Wichtigkeit bezüglich weiterer Forschungen auf dem Gebiet der Brustkrebsprävention sowie dem besseren Verstehen der Zusammenhänge in der Brustkrebsentwicklung.

2 LITERATUR

2.1 Brustkrebs

Eine der häufigsten Krebsarten, unter der Frauen heutzutage leiden, ist Brustkrebs (Daniele, Zito et al. 2010). Es gibt mehr als 10 Millionen neue Krebsfälle jedes Jahr, welche für 12% aller Todesfälle verantwortlich sind (Navarro Silvera and Rohan 2007). Brustkrebs ist die führende Todesursache bei Frauen zwischen 35 und 65 Jahren weltweit (Daniele, Zito et al. 2010). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau in ihrem Leben an Brustkrebs erkranken wird, beträgt 1:7 (Smigal, Jemal et al. 2006).

Die Ätiologie von Brustkrebs ist multifaktoriell und noch nicht vollständig aufgeklärt (Kelleher, Seo et al. 2009). Die Dauer, die eine Frau Östrogenen, auch künstlich zugeführten wie z.B. durch die Anti-Baby-Pille, ausgesetzt war, ist einer der Hauptrisikofaktoren (Smigal, Jemal et al. 2006). Weitere Risikofaktoren für Brustkrebs, die beeinflussbar sind, sind unter anderem Übergewicht, exzessiver Alkoholkonsum und Bewegungsmangel (Smigal, Jemal et al. 2006). Es gibt immer mehr epidemiologische Daten, die eine Korrelation zwischen einer hohen Fettzufuhr in der westlichen Ernährung und Brustkrebs bei Menschen vermuten lassen (Bingham, Luben et al. 2003; Calle, Rodriguez et al. 2003; Duncan 2004). Es gibt Indizien dafür, dass eine größere Beachtung einer gesunden Ernährung in den USA dazu führen könnte, dass viele Krebstote vermieden werden könnten (Ho 2004).

Der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei Krebspatienten ist die Bildung von Metastasen (Duffy 2002). Die Hauptmechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind Migration und Invasion (Yang, Kuo et al. 2011). Tumorzellen haben die Möglichkeit sich innerhalb des Organismus, den sie befallen haben, zu bewegen und so haben Metastasen die Möglichkeit sich auszubreiten (Daniele, Zito et al. 2010). Der Prozess der Metastasis besteht aus sequentiellen und selektiven Schritten, darunter Proliferation, Induktion der Angiogenese, Ablösen

vom primären Tumor, Beweglichkeit, Invasion in Gewebe, Zirkulation, Aggregation und Überleben in der Zirkulation und Extravasation in das Organparenchym (Yang, Kuo et al. 2011). Krebszellen des Originaltumors können sich sowohl durch das lymphatische System als auch durch das Blutzirkulationssystem bewegen (Daniele, Zito et al. 2010).

Die Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM) durch Proteasen, wie MMPs und uPA, spielt eine wichtige Rolle in der Tumordinvasion und Metastasierung (Westermarck and Kahari 1999). Solche Enzyme erleichtern das Ablösen von Tumorzellen und deren Invasion in angrenzende Gewebekompartimente (Talvensaari-Mattila, Paakko et al. 1998). Die Rolle der ECM ist vor allem die Erhaltung der Adhäsion zwischen den Zellen und die Vermittlung von Signalen durch Adhäsionsrezeptoren (Daniele, Zito et al. 2010). Die ECM des Tumors sowie die Stromazellen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorderegulation (King, Zhao et al. 2003). Interaktionen zwischen der ECM und den Tumorzellen beeinträchtigen stark die Tumorentwicklung betreffend Zellüberleben, Proliferation und Migration (Das, Banerji et al. 2008). Während der Krebsprogression wird die ECM des Gewebes, in welchem der Tumor wächst, extensiv remodeliert sowohl durch die Degradierung als auch durch die Neusynthese von ECM-Komponenten (Kaspar, Zardi et al. 2006). Die Inhibierung von MMP und/oder uPA-vermittelter Migration oder Invasion könnte einen potentiellen Behandlungsansatz für die Inhibierung der Krebsmetastasierung sein (Yang, Kuo et al. 2011).

Es gibt ebenfalls einige Hinweise für eine Assoziation zwischen Zink und Brustkrebs, allerdings werden noch prospektive Studien benötigt, um dies tatsächlich zu bestätigen (Navarro Silvera and Rohan 2007). Es gibt aber bereits eine eindeutige Beweislage einer dysregulierten Zinkhomöostase in der Brustkrebsentwicklung (Chakravarty, Ghosh et al. 1986; Costello, Feng et al. 2004; Li, Zhang et al. 2007).

2.2 Zink

Metalle sind nötig für das normale Funktionieren von Zellen und das Überleben von Organismen (Galaris and Evangelou 2002). In der Forschung sind Spurenelemente von besonderem Interesse, da die Mengen, denen man ausgesetzt wird, von außen beeinflussbar sind (Navarro Silvera and Rohan 2007). Zink ist der Menge nach das zweitmeiste Spurenelement im menschlichen Körper (Vallee and Falchuk 1993) und wird als eines der häufigsten intrazellulären Elemente beschrieben (Ho 2004). Zink ist in einer Vielzahl von zellulären, metabolischen Prozessen, wie der Regulation von Proteinen, die in die DNA-, Proteinsynthese, Mitose und Zellteilung involviert sind (Kelleher, Seo et al. 2009), der Zellproliferation, Reproduktion, Immunfunktion und Verteidigung gegen freie Radikale wichtig (Bray and Bettger 1990; Powell 2000), des weiteren ist Zink für Wachstum, normale Entwicklung, neurosensorische Funktionen notwendig (Wood 2000). Es beeinflusst zudem Formation und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Haase, Ober-Blobaum et al. 2008). Zink ist ein Bestandteil von mehr als 3000 Zink-assoziierten Transkriptionsfaktoren, wie DNA-bindenden Proteinen mit Zink-Fingern und mehr als 300 Enzymen, wie Cu/Zn Superoxid Dismutase und mehreren Proteinen, die in die DNA-Reparatur involviert sind (Prasad 1998; Prasad and Kucuk 2002; Prasad 2003). Mehr als 300 DNA-Bindungsproteine besitzen Zink-Bindungsdomänen (Galaris and Evangelou 2002). Diese Zink-abhängigen Proteine scheinen eine zentrale Rolle in der Regulierung der Expression von vielen Genen zu spielen (Galaris and Evangelou 2002). Zink ist ebenfalls an der Metallothionein-Synthese beteiligt, von der man glaubt, dass sie die Produktion freier Radikale inhibiert (O'Connor 2001). Zink hat einen großen Einfluss darauf, zelluläre Komponenten vor Oxidation zu schützen und Schäden an der DNA vorzubeugen (Ho 2004). Zink ist ebenso an der Regulation der Apoptose beteiligt (Ho 2004). Apoptose ist ein Mechanismus, der der Zelle den programmierten Zelltod ermöglicht und ist charakterisiert durch verschiedene morphologische und biochemische Ereignisse, wie z.B. Zellschrumpfung, Platzen der Membran und DNA-Fragmentierung (Ho 2004).

Es besteht eine Verbindung zwischen Zinkmangel und gesteigerter Apoptose in verschiedenen Zellen und Geweben (Ho 2004).

Spurenelemente kommen natürlich in der Umwelt vor und sind in einer Vielzahl von Quellen wie Luft, Trinkwasser und Lebensmittel enthalten (Navarro Silvera and Rohan 2007). Für den Menschen ist Nahrung die primäre Quelle von Zink (Navarro Silvera and Rohan 2007). Die durchschnittliche Zinkzufuhr durch Ernährung reicht von 5,2 – 16,2 mg/Tag und Zink-Level in tierischen Produkten variieren in Abhängigkeit von lokalen Boden- und Wasserkonzentrationen (Navarro Silvera and Rohan 2007). Zinkreiche Nahrungsmittel sind rotes Fleisch und Meeresfrüchte (Ho 2004). Zahlreiche pflanzliche Quellen, wie Vollkorn und Leguminosen, enthalten ebenfalls Zink, allerdings ist das Zink aus diesen Quellen weniger bioverfügbar (Ho 2004).

Im Körper wurde Zink primär intrazellulär gefunden (Wood 2000). Eine geringe Menge von Körperzink wurde auch im Zirkulationssystem gefunden, hauptsächlich an Plasmaprotein gebunden (Wood 2000). Zink kommt im Zellkern, im Nucleolus und in den Chromosomen vor und stabilisiert die Struktur von DNA, RNA und Ribosomen (Wu and Wu 1987). Plasmalevel von Zink werden homöostatisch geregelt, aber die Signale und Prozesse, die involviert sind, sind noch nicht ausreichend aufgeklärt (Wood 2000). Plasmazinklevels werden auch von anderen Faktoren, wie dem täglichen Rhythmus, Stress, Infektionen, Hungern und Plasmaproteinlevel verändert (Wood 2000).

Zinkmangel führt zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Taylor, Bettger et al. 1988) und könnte das Risiko für die Krebsentstehung erhöhen (Ho 2004).

Über die Symptome eines Zinkmangels bei Menschen wurde erstmals in den 1960ern berichtet (Prasad, Halsted et al. 1961; Prasad, Miale et al. 1963). Die pathologischen Zeichen eines Zinkmangels umfassen verlangsamtes Wachstum, kognitive Beeinträchtigungen, Neuropathie, gesunkene Nahrungsaufnahme, Diarrhøe, Dermatitis, Haarverlust, Blutungsneigung, Hypotonie und Hypothermie (Sandstead, Prasad et al. 1967). Zinkmangel hat

einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Integrität und ist schädlich für DNA (Ho 2004).

Während die meisten Kationen die Entstehung von oxidativem Stress begünstigen, scheint Zink vor diesem zu schützen (Galaris and Evangelou 2002). Zink scheint protektiv zu sein, wenn Zink-defiziente Individuen mit jenen verglichen werden, die Zink-gesättigt sind (Sattar, Scott et al. 1997).

2.2.1 Zink und Brustkrebs

Die Belastung mit höheren als den normalen physiologischen Mengen von einigen Metallen könnte zu Tumorentwicklung führen (Galaris and Evangelou 2002). Die exakten molekularen Mechanismen von Metall-induzierter Karzinogenese sind allerdings nicht klar (Galaris and Evangelou 2002). Es gibt Beweise dafür, dass eine Metall-induzierte Entwicklung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielen könnte (Galaris and Evangelou 2002). Metalle haben das Potential DNA zu schädigen und können Mutationen in menschlichen Körperzellen verursachen (Galaris and Evangelou 2002).

Ein Mangel an Zink, Selen und/ oder Calcium könnte an der Karzinogenese mitwirken aufgrund deren Funktionen in der Regulierung von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Whitfield, Boynton et al. 1979; Schrauzer 2000; Ho 2004). Zusätzlich haben Zink und Selen immunfördernde und anti-oxidative Effekte (Kiremidjian-Schumacher, Roy et al. 1996; Schrauzer 2000; Prasad and Kucuk 2002). Es gibt einige Hinweise darauf, dass relativ hohe Levels von Zink und Calcium in bösartigen Brustgewebe positiv assoziiert sind mit einem gesteigertem Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs (Cui, Vogt et al. 2007). Dies könnte vermuten lassen, dass benigne Brustgewebe, die relativ hohe Konzentrationen von diesen essentiellen Elementen akkumulieren, prädisponierend sind um Brustkrebs zu entwickeln, weil ein adäquater Zusatz von diesen beiden notwendig ist um die Proliferation im Brustgewebe zu erhalten (Cui, Vogt et al. 2007). Auch der Gehalt von Kupfer und Zink im Serum

und Gewebe von Brustkrebspatienten war viel höher im Vergleich mit gesunden Brustgewebe (Kuo, Chen et al. 2002). Ein Anstieg von Kupfer und Zink resultiert in einem erhöhtem oxidativen Stress in Brustkrebszellen (Huang, Sheu et al. 1999).

Eine Vielzahl von Tumoren wächst weniger schnell, wenn sie in Zink-defiziente Tiere implantiert werden (DeWys and Pories 1972; Minkel, Dolhun et al. 1979; Mills, Broghamer et al. 1981). Eine verminderte Zinkzufuhr durch verminderte Aufnahme kann effektiv Tumorwachstum verlangsamen (Mills, Broghamer et al. 1984). Es wurden abnormal hohe Zinklevel in der Leber von Krebspatienten (Olson, Heggen et al. 1958; Wright and Dormandy 1972; Griffith, Wright et al. 1973) ohne ähnliche Erhöhungen in anderen Geweben (Griffith, Wright et al. 1973) oder Veränderungen in der Konzentration von anderen Elementen gefunden (Mills, Broghamer et al. 1984). Die Restriktion von spezifischen Mineralien wie Zink oder Magnesium könnte das Tumorwachstum in Krebspatienten limitieren ohne dabei exzessiven metabolischen Stress zu verursachen (Mills, Broghamer et al. 1984).

Die Veränderung von intra- und extrazellulären Zinkkonzentrationen alleine genügt um metabolische Veränderungen oder Apoptose in 2 Modellen von humanen Brustkrebszelllinien, MCF-7 und MDA-MB468, zu induzieren (Hashemi, Ghavami et al. 2007). Veränderungen der Zink-Homöostase können sich durch zahlreiche Erkrankungen, darunter auch Krebs, bemerkbar machen (Carter, Truong-Tran et al. 2002; Ho, Courtemanche et al. 2003).

Die Brustdrüse hat einen enormen Zinkbedarf, der daraus resultiert, dass eine sehr große Menge an Zink während der Laktation in die Milch transferiert werden muss (Kelleher, Seo et al. 2009). Ein veränderter Zinkmetabolismus der Brustdrüse wurde mit Brustkrebsübergang, Progression und Metastasis in Zusammenhang gebracht (Kelleher, Seo et al. 2009). Die Verbindung zwischen der Regulierung der Zinkhomöostase und Brustkrebs ist bis jetzt indirekt (Kelleher, Seo et al. 2009), wie bereits vorher erwähnt. Eine Dysregulierung des

Zinkmetabolismus könnte mit einer abnormen zellulären Funktion und Krebsprogression einhergehen (Kelleher, Seo et al. 2009). Biopsien von Mastektomien oder Lumpektomien zeigten signifikant höhere Zinklevel im Vergleich mit normalem Brustgewebe (Margalioth, Schenker et al. 1983; Geraki, Farquharson et al. 2002; Geraki, Farquharson et al. 2004). Studien haben eine Korrelation zwischen hohen Zinklevels in Brustgewebe und dem Ausbruch der Karzinogenese gefunden (Cui, Vogt et al. 2007). Die Signifikanz von dysregulierten Zinktransportprozessen könnte beweisen, dass die enge Regulation des zellulären Zinkmetabolismus eine wichtige Rolle in der Modulation der Zellproliferation (MacDonald 2000) und dem programmierten Zelltod spielt (Clegg, Hanna et al. 2005), Prozesse, die bei Krebs unabhängig agieren können (Kelleher, Seo et al. 2009). Deswegen könnte das Verstehen des Zusammenhangs zwischen dysregulierter Zinkhomöostase und deren zellulären Funktion bei Brustkrebs, in Anbetracht von Prävention, Diagnose und der Behandlung von Patienten, wichtige Ansätze bieten (Kelleher, Seo et al. 2009).

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass Zink in N-Methyl-N-Nitrosourea-induzierten Brusttumoren, die in Ratten implantiert wurden, akkumuliert und dass eine niedrige Zink-Aufnahme diese induzierte Tumorgenese in Ratten unterdrücken kann (Lee, Woo et al. 2003; Lee, Simpson et al. 2004). In N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) induzierten Drüsentumoren war die Zink-Konzentration, die gefunden wurde 12mal höher als in normalen Säugetierdrüsen (Lee, Woo et al. 2003).

Auch einige humane Studien konnten zeigen, dass Zink-Konzentrationen im Brustkrebsgewebe höher sind als im gesunden Brustgewebe (Mulay, Roy et al. 1971; Margalioth, Schenker et al. 1983; Rizk and Sky-Peck 1984). Der Grund dafür und die Bedeutung für die Brustkrebsentwicklung sind noch unbekannt (Lee, Woo et al. 2003). Gesunde Brustgewebe enthalten eine beachtliche Menge von Fettgewebe, das im Normalfall wenig Mineralien enthält, so auch Zink (Lee, Woo et al. 2003). Unterschiede könnten durch histologische und

biochemische Veränderungen oder aber auch durch eine mögliche veränderte Zink-Homöostase im Brustkrebsgewebe entstehen (Lee, Woo et al. 2003). Die Zink-Homöostase wird durch die Balance von Influx, Efflux und Retention reguliert (Lee, Woo et al. 2003). Veränderungen hin zu einem anders balancierten Influx, Efflux und einer zellulären Retention würde somit also die Gewebszinkkonzentrationen verändern (Lee, Woo et al. 2003). Gesteigerte Zink-Konzentrationen in MNU-induzierten Brusttumoren, wie oben erwähnt, sind wahrscheinlich das Resultat eines reduzierten Zink-Efflux (Lee, Woo et al. 2003). Da Zink essentiell ist für die Zellproliferation (Chesters, Petrie et al. 1993; Prasad, Beck et al. 1996; Paski and Xu 2001) und wenn man die bereits bewiesene Mitwirkung beim Tumorwachstum bedenkt (DeWys, Pories et al. 1970; Mills, Broghamer et al. 1984; Takeda, Goto et al. 1997), sind die gesteigerten Zink-Konzentrationen im Brustkrebsgewebe somit ein Indikator für die Involvierung in der Tumorentwicklung (Lee, Woo et al. 2003).

2.2.2 Metallothioneine (MTs)

Eine der biologischen Funktionen von Metallothioneinen ist die Aufrechterhaltung der Zink-Homöostase durch die Bildung eines Zink-Metallothionein-Komplexes (Moffatt and DenizEAU 1997). Deswegen hängen die Level des Gewebsmetallothioneins sehr eng zusammen mit den Zink-Gewebskonzentrationen (Bremner 1991). Die Injektion von Zink oder eine ernährungsbedingt hohe Zufuhr von Zink steigert nicht nur alleine das Zinklevel, sondern auch das Gewebsmetallothioneinlevel im selben Ausmaß, was vermutlich auch daran liegt, dass Zink generell an Metallothionein gebunden ist (Richards and Cousins 1976). Freies ionisches Zink ist hingegen nur in sehr geringen Konzentrationen erhalten in biologischen Systemen (Lee, Woo et al. 2003). Es scheint so, dass Metallothionein die Zinkakkumulation in Brusttumoren fördert (Lee, Woo et al. 2003). Die Zinkanreicherung in Brusttumoren könnte somit das Ergebnis aus einer veränderten Zink-Homöostase durch eine reduzierte ZnT-1 Expression (ein Zinktransporter) und einer überregulierten Metallothionein-Expression zu sein (Lee, Woo et al. 2003).

Um die Zellproliferation zu steigern, wie das im Fall der Tumorgenese geschehen muss, benötigt man vermehrt Zink (Lee, Woo et al. 2003). So ist es möglich, dass die Maschinerie, die in die Zink-Homöostase involviert ist, aufgerüstet wird, um diesen gesteigerten Bedarf zu bewältigen (Lee, Woo et al. 2003). Beim Menschen ist eine Überexpression von Metallothioneinen im Brustkrebsgewebe primär assoziiert mit einer höheren Aggressivität und einem höherem Tumorgrad (Jin, Bay et al. 2001; Sens, Somji et al. 2001; Jin, Chow et al. 2002) und daraus resultierend mit einer schlechteren Prognose (Schmid, Ellis et al. 1993; Zhang, Zhang et al. 2000; Sens, Somji et al. 2001). Daraus kann man schließen, dass Metallothioneine ebenfalls eine Rolle in der Brustkrebszellproliferation spielen (Lee, Woo et al. 2003). Es wurde auch bewiesen, dass eine Runterregulierung der Metallothionein-Expression das Zellwachstum inhibiert und Apoptose induziert (Lee, Woo et al. 2003).

2.3 MAPKinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind Bestandteile von Pathways, die Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zelltod kontrollieren (Pearson, Robinson et al. 2001). MAPKs wurden zuerst als Mitogen-stimulierende Tyrosin Phosphoproteine in den frühen 80ern gefunden (Rossomando, Payne et al. 1989). Ihre Handlungen sind sehr spezifisch (Krishna and Narang 2008) und sie haben überlappende Substratspezifität (Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997; Lewis, Shapiro et al. 1998).

MAPKs können durch eine Vielzahl von Faktoren aktiviert werden, darunter befinden sich Hormone, Wachstumsfaktoren, Entzündungszytokine der TNF (Tumornekrosisfaktor)-Familie und umweltbedingter Stress wie Strahlung, osmotischer Schock und ischämische Verletzung (Krishna and Narang 2008). Die Aktivierung des MAPK-Pathway beeinflusst diverse Zellaktivitäten wie Genexpression, Zellzyklus, Zellmetabolismus, Beweglichkeit, Überleben, Apoptose und Differenzierung (Krishna and Narang 2008). Der MAPK-Signaltransduktionsweg unterstützt nicht nur die Proliferation, sondern vermittelt auch Zellüberleben und ist in Krebszellen prinzipiell hinauf reguliert (Sebolt-Leopold and Herrera 2004).

Das zentrale dreistufige Kernsignalmodul ist typisch bei dieser Art von Pathways (Krishna and Narang 2008) bestehend aus MAPKKK oder MAP3K, MAPKK oder MAP2K und MAPK. MAP3Ks sind Serin/ Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und/oder durch deren Interaktion mit kleinen GTP Proteinen der Ras/Rho-Familie als Antwort auf extrazelluläre Stimuli (Krishna and Narang 2008). Jede MAPKK phosphoryliert nur eine oder ein paar der MAPK (Pearson, Robinson et al. 2001). Einige MAPKKKs können mehr als eine MAPK-Kaskade regulieren und einige Kaskaden können durch zahlreiche MAPKKKs kontrolliert werden (Pearson, Robinson et al. 2001).

Multizelluläre Organismen haben 3 gut charakterisierte Familien von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die eine Vielzahl von physiologischen Prozessen kontrollieren (Johnson and Lapadat 2002). Diese 3 Hauptgruppen sind: ERKs (extrazellulär-regulierte Kinasen), JNKs (Jun NH₂ terminale Kinasen) und p38-MAPKs (Geest and Coffey 2009). Sie regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellwachstum, Migration, Proliferation, Differenzierung und Überleben (Geest and Coffey 2009). Im Menschen gibt es mindestens 11 Mitglieder der MAPK-Familie, die aufgrund einer Sequenzähnlichkeit in 6 Untergruppen unterteilt werden können: ERK1/2, JNK1/2/3, p38MAPKs (Alpha – Delta), ERK5, ERK3 und ERK7 (Schaeffer and Weber 1999; Pearson, Robinson et al. 2001). Jede Gruppe der MAPKs wird durch eine Kinasen-Kaskade aktiviert, in welcher entweder eine MAP3K phosphoryliert und eine Downstream 2fach-spezifische MAP2K aktiviert wird, welche wiederum die MAPK-Aktivität durch zweifache Phosphorylierung an Threonin- oder Tyrosin Resten stimuliert (Cobb and Goldsmith 1995). MAPKs sind wichtige regulatorische Elemente, durch die verschiedene extrazelluläre Signale in intrazelluläre Ereignisse übersetzt werden (Wang, Martindale et al. 1998). MAPKs phosphorylieren spezifisch Serine und Threonine von Zielproteinen und regulieren dadurch die zelluläre Aktivität (Johnson and Lapadat 2002). MAPK-katalysierte Phosphorylierung von Substratproteinen funktioniert wie ein Schalter, der die Aktivität von diesen an- oder abschaltet (Johnson and Lapadat 2002).

Extrazelluläre Stimuli, wie Mitogene, Zytokine und Wachstumsfaktoren, können zu Abweichungen von normalen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und Invasion führen, was charakteristisch ist für die Entstehung eines Tumors (Hanahan and Weinberg 2000). Dieser Prozess wird zum Teil durch Membranrezeptoren wie den Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) und MAPKs vermittelt (Guo, Fang et al. 2003). ERK wird vor allem durch Wachstumsfaktorensignalen aktiviert, während JNK und p38 neben Wachstumsfaktoren von einem großen Spektrum von Stress-bezogenen Stimuli aktiviert werden (Kyriakis and Avruch 2001).

Frauen im fortgeschrittenem Stadium von Brustkrebs reagieren auf die initiale Hormontherapie häufig mit Tumorrückgang, aber nach 12-18 Monaten kommt es oft zu einem Wiederauftreten der Erkrankung (Jeng, Yue et al. 2000). Dieses Wachstum von Brustkrebszellen nach einer Hormontherapie wird durch eine Überregulierung von MAPK-vermittelten Mechanismen angeregt (Jeng, Yue et al. 2000). MAPKs können in solchen Fällen zwei separate mechanistische Effekte in LTED- Zellen, einer Brustkrebszelllinie, anwenden (Jeng, Yue et al. 2000). Ein Effekt stimuliert die Proliferation unabhängig von der Estrogenrezeptor (ER)-Transaktivierung und die andere beeinflusst die ER-Funktionalität an einem Upstream, transkriptionalen Level (Jeng, Yue et al. 2000). Die Aktivierung der MAPKs in Brustkrebszellen könnte als einer der Mechanismen für Wiederwachstum nach einem Langzeitestradiol-Entzug dienen (Jeng, Yue et al. 2000). Die Aktivierung der MAPKs könnte durch Veränderungen in den MAPKs selbst oder durch die Handlung von mehr proximalen Stimulanzen hervorgerufen werden (Jeng, Yue et al. 2000). Die Involvierung der MAPKs in die gesteigerte DNA-Synthese und Zellproliferation in humanen Brustkrebszellen, die nach einem Langzeitestrogen-Entzug auftreten, ist wahrscheinlich (Jeng, Yue et al. 2000).

2.3.1 ERK (Extrazellulär-regulierte Kinasen)

ERK1 und 2 sind Proteine mit 43 und 41kDa, die zu circa 85% identisch sind (Boulton, Yancopoulos et al. 1990; Boulton, Nye et al. 1991). Beide werden ubiquitär exprimiert, aber deren relative Menge in den Geweben ist variabel (Pearson, Robinson et al. 2001). ERK1 und 2 werden von einem Paar von nahe verwandten MEKs, MEK1 und 2, aktiviert (Pearson, Robinson et al. 2001). Sie sind in die Regulation von Meiose, Mitose und postmitotische Funktionen in differenzierten Zellen involviert (Johnson and Lapadat 2002). Viele verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Virusinfektion und Karzinogene, können den ERK1/2 Pathway aktivieren (Johnson and Lapadat 2002). In differenzierten Zellen haben ERKs verschiedene Rollen und sind bei

Funktionen des Zentralnervensystems wie z.B. Lernen und Gedächtnis beteiligt (Johnson and Lapadat 2002).

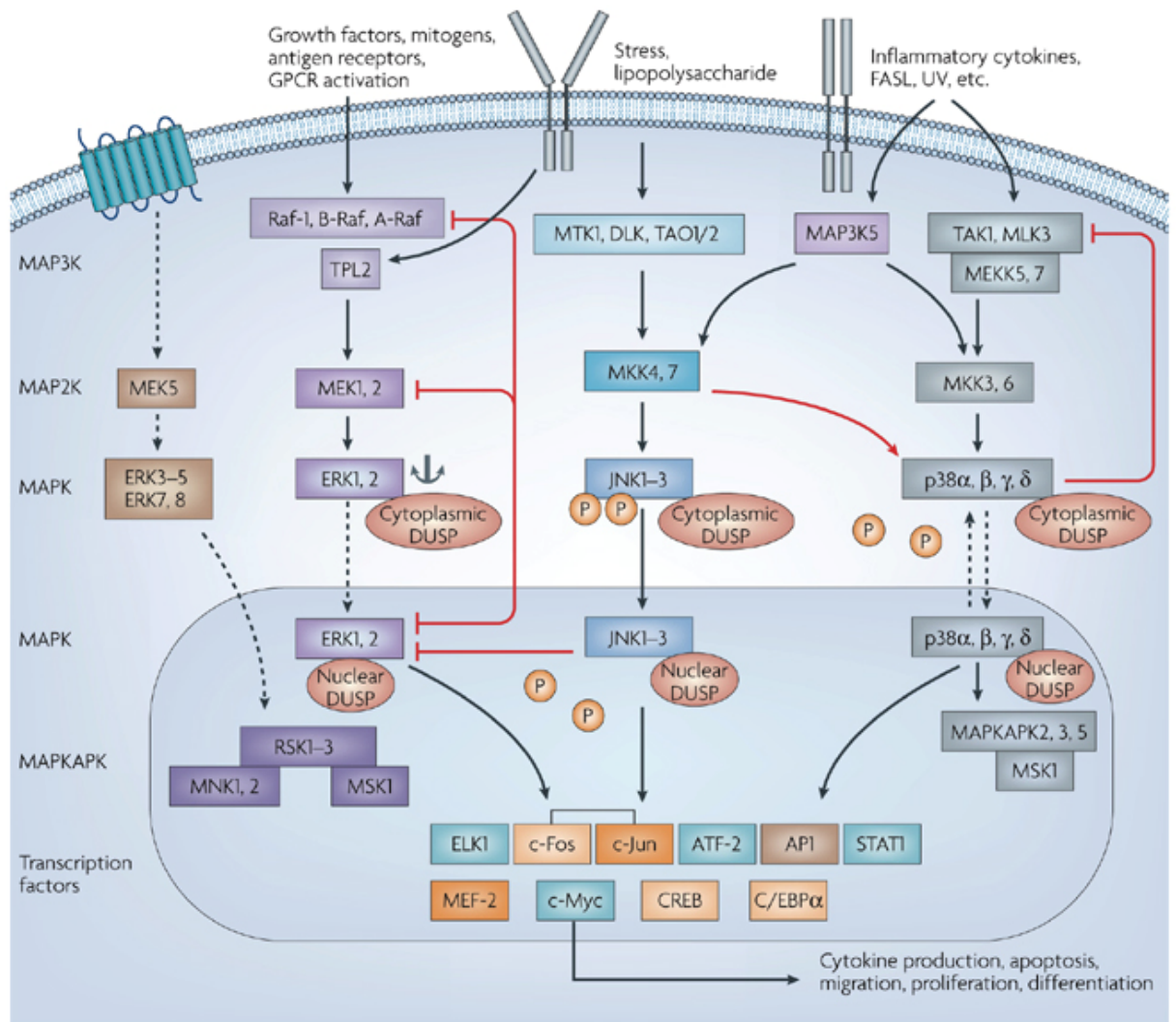
Die ERK-Kaskade wird durch eine große Anzahl an extrazellulären und intrazellulären Stimulanzen aktiviert (Krishna and Narang 2008): sehr stark durch Wachstumsfaktoren, Serum- und Phorbol-Estern und etwas weniger durch Liganden von GPCRs, Zytokinen, osmotischen Stress und mikrotubuläre Desorganisation (Lewis, Shapiro et al. 1998). Das Signal, das durch diese Kaskade hervorgerufen wird, wird üblicherweise durch Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren initiiert (Goldsmith and Dhanasekaran 2007; McKay and Morrison 2007). Relevante potentielle Downstream-Ziele von ERK spielen wichtige Rollen in Angiogenesis, Zellmigration, Invasion und Metastasis (Reddy, Nabha et al. 2003; Giehl 2005). Der ERK1/2-Pathway ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation sowohl durch Kontrolle des Zellwachstums als auch der Zellzyklusprogression (Krishna and Narang 2008). Der ERK-Pathway ist in circa einem Drittel aller menschlichen Krebsarten dereguliert (Krishna and Narang 2008). Die Höhe der ERK-Aktivität beeinflusst das Überleben der Krebszellen (Krishna and Narang 2008). So ist es z.B. so, dass eine hohe ERK-Aktivität die Apoptose-Rate in Darmkrebszellen reduziert (Krishna and Narang 2008). Die Funktion der unterschiedlichen ERKs liegt in der Kontrolle der Zellteilung und deswegen sind Inhibitoren dieser Enzyme auch als Anti-Krebs-Substanzen bekannt (Johnson and Lapadat 2002).

2.3.2 p38

p38 α wurde als Tyrosinphosphoprotein in Extrakten von Zellen, die mit inflammatorischen Zytokinen behandelt wurden (Han, Lee et al. 1994) und als reaktivierende Kinase für MAPK-aktiviertes Protein (MAPKAP) Kinase-2 gefunden (Rouse, Cohen et al. 1994). p38-MAPKs reagieren auf zahlreiche extrazelluläre Stimuli, vor allem zellulären Stress, wie osmotischer Schock, UV-Strahlung, Hypoxie, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Raman, Chen et al. 2007). p38 reguliert außerdem die Expression von vielen Zytokinen (Johnson and Lapadat 2002). p38-MAPKs phosphorylieren und

regulieren eine breite Anzahl an Substraten (Chang and Karin 2001), wie Transkriptionsfaktoren (Dong, Davis et al. 2002), Proteinkinasen wie MAPKAP2/3 (Wada and Penninger 2004) und weitere.

Die Rolle von p38 wurde vor allem intensiv in Hinblick auf das Immunsystem untersucht (Krishna and Narang 2008). p38 hat eine Funktion als Tumorerdrücker und seine Aktivierung ist bedeutend in der inflammatorischen Antwort (Krishna and Narang 2008). Es wirkt unter Umständen bei Krankheiten wie Asthma oder bei Erkrankungen des Autoimmunsystems mit (Johnson and Lapadat 2002). Die Inhibierung von p38 senkt die Apoptose (Geest and Coffey 2009). Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress selektiv die p38-MAPK aktivieren kann, die wiederum mit einer Kaskade verbunden ist, die zu einer anormalen Zellzyklusprogression führen kann (Kurata 2000).



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 1 Darstellung des MAPK-Pathway (Jeffrey, Camps et al. 2007)

2.4 Das uPA-System

Das uPA-System besteht aus der Serinprotease uPA (Urokinase-Plasminogenaktivator), dem Rezeptor uPAR (Urokinase-Plasminogenaktivator-Rezeptor) und den beiden Serpin-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 (Plasminogenaktivator-Inhibitor) (Andreasen, Kjoller et al. 1997; Duffy 2004).

Serpine kontrollieren die proteolytische Aktivität während normaler und pathologischer Prozesse (Silverman, Bird et al. 2001; Law, Zhang et al. 2006). Alle Komponenten des uPA-Systems sind in die Regulierung der Zellmigration und Invasion involviert (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Diese Interaktionen sind komplex, Zelltyp-spezifisch und oftmals auch kontextspezifisch (Beaulieu, Whitley et al. 2007).

uPA, uPAR und PAI-1 spielen eine wichtige Rolle während der Krebsinvasion und Metastasis (Andreasen, Kjoller et al. 1997; Duffy 2004). Es ist mittlerweile bekannt, dass diese Faktoren bei Krebs sehr kritisch sind (Duffy and Duggan 2004) und in verschiedene Stadien der Formation und Progression von Brustkrebs involviert sind (Duffy 2004). Hohe Levels dieser drei Parameter korrelieren mit einem ungünstigen Patientenausgang in verschiedenen Krebsarten, darunter auch Brustkrebs (Duffy and Duggan 2004). Es wurde gezeigt, dass uPA, uPAR und PAI-1 in den meisten Krebsarten raufreguliert sind (Duffy and Duggan 2004). Das uPA-System fördert durch eine Beteiligung an der Angiogenese wahrscheinlich Tumorstadium, Invasion und Metastasis (Durand, Bodker et al. 2004). uPA und sein Inhibitor PAI-1 sind Tumor-assoziierte proteolytische Faktoren, die eine Schlüsselrolle in der physiologischen und pathophysiologischen Degradierung und Remodellierung der ECM spielen (Reuning, Magdolen et al. 1998; Andreasen, Egelund et al. 2000). Das uPA-System ist außerdem an vielen anderen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt, darunter Chemotaxis, Migration/ Invasion, Adhäsion, Proliferation und Angiogenese (Reuning, Magdolen et al. 1998); (Preissner, Kanse et al. 2000; Blasi and Carmeliet 2002).

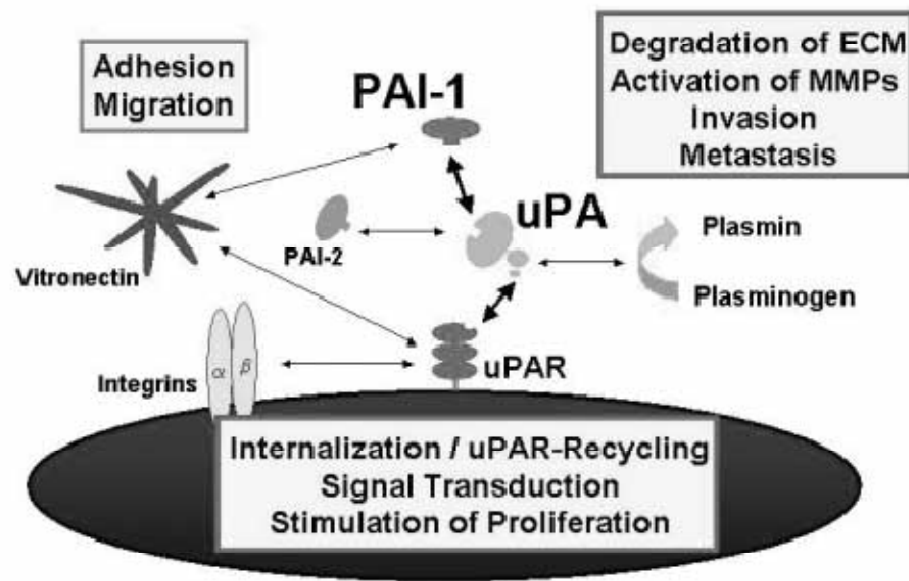


Abbildung 2 Darstellung des uPA-Systems (Harbeck, Kates et al. 2004)

2.4.1 uPA (Urokinase-Plasminogen-Aktivator)

uPA ist eine 53kDa große Serinprotease und ist in viele zelluläre Prozesse involviert wie z.B. die Aktivierung von Plasmin durch Plasminogen und auch die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Im Gegensatz zu den meisten anderen ECM-degradierenden Proteasen hat uPA beschränkte Substratspezifität (Duffy and Duggan 2004). Die am besten bekannte katalytische Eigenschaft von uPA ist die Umwandlung des inaktiven Plasminogens in das aktive Plasmin (Duffy and Duggan 2004). Plasmin ist ebenfalls eine Serinprotease, allerdings mit einer breiteren Substratspezifität (Duffy and Duggan 2004) und kann fast alle Proteine in der ECM degradieren (Duffy and Duggan 2004). Außerdem kann Plasmin mehrere MMPs aktivieren, darunter die MMPs 3,9,12,13 (Carmeliet, Moons et al. 1997). Die Aktivierung dieser MMPs führt zu weiterer Degradierung und Remodulierung der ECM (Duffy and Duggan 2004). Plasmin ist, wie auch uPA, in der Lage eine Rolle in mehreren Phasen der Krebsinvasion und Metastasis zu spielen (Duffy and Duggan 2004).

Während uPA Plasminogen zu Plasmin umwandelt, ist es an den Membranrezeptor uPAR gebunden (auch CD87 genannt) (Duffy and Duggan 2004). Der uPA/uPAR Komplex fördert also die Proteolyse (Ellis, Behrendt et al. 1991) und stimuliert die Zellproliferation und die Zellmigration und moduliert die Zelladhäsion (Duffy 2004). Die Bindung von uPA an uPAR ist assoziiert mit der Initiation von mehreren intrazellulären Pathways, darunter auch der MEK-ERK Pathway (Kjoller 2002).

2.4.2 PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor)

PAI-1 und PAI-2 gehören zur Serpin (**Ser**in **P**rotease **I**nhibitor) Familie der Protease-Inhibitoren (Silverman, Bird et al. 2001). PAI-1 ist ein Glycoprotein mit einer Größe von 43kDa (Duffy and Duggan 2004) und ist der primäre Inhibitor des PA-Systems sowohl von uPA als auch von tPA (Beaulieu, Whitley et al. 2007). PAI-1 ist in der Lage uPA, das an der Zelloberfläche an uPAR gebunden ist, sehr schnell zu inhibieren (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Der PAI-1/ uPA/ uPAR-Komplex interagiert wiederum im Rahmen der Endozytose mit LRP (Lipoprotein Rezeptor related Protein) (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Dabei werden uPAR und LRP an die Zelloberfläche recycelt, während PAI-1 und uPA degradiert werden (Nykjaer, Conese et al. 1997). PAI-1 wird von vielen Zelltypen exprimiert darunter endotheliale Zellen, Fibroblasten, Adipozyten, Zellen der glatten Muskulatur, zahlreiche epitheliale Zellen, Keratinozyten und Granulosa-Zellen (Beaulieu, Whitley et al. 2007). PAI-1 reagiert sehr schnell mit uPA, indem es einen stöchiometrischen und stabilen 1:1 Komplex bildet (Duffy and Duggan 2004). Es besitzt zweifache Funktion (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009): einerseits spielt PAI-1 eine wichtige Rolle als direkter Inhibitor des Plasminogen-Aktivatorsystems und andererseits spielt seine Interaktion mit dem adhäsiven Glycoprotein Vitronectin eine Rolle in der Geweberemodulierung und Metastasis (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009). Diese Funktion ist unabhängig von seinen Protease-inhibitorischen Eigenschaften (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009). PAI-1 kann in Anwesenheit von Vitronectin oder Heparin auch die Serinprotease Thrombin

inhibieren (Beaulieu, Whitley et al. 2007). PAI-1 ist konformationsmäßig instabil (Hekman and Loskutoff 1985), wobei die Bindung an das ECM-Protein Vitronectin stabilisierend wirkt (Declerck, De Mol et al. 1988; Mimuro, Sawdey et al. 1989). Durch die Anhaftung von Vitronectin kann PAI-1 Zelladhäsion und Migration modulieren (Duffy 2004). PAI-1 existiert in 3 verschiedenen Formen (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009):

- Aktiv
- nicht-aktiv – latent
- gespalten

Studien mit Zellkulturen haben gezeigt, dass PAI-1 die Zelladhäsion, Migration und Invasion durch 3 Typen von molekularen Interaktionen reguliert (Durand, Bodker et al. 2004):

- Durch die Inhibierung von uPA
- Durch die Bindung an Vitronectin und
- Durch die Bindung des uPA/ PAI-1 Komplexes an Endozytose-Rezeptoren

Die Unterschiedlichkeit der beobachteten Effekte beruht wahrscheinlich auf dem Fakt, dass proteolytische und nicht-proteolytische Aktivitäten des uPA-Systems simultan ablaufen können (Durand, Bodker et al. 2004). PAI-1 hat unterschiedliche Funktionen in tierischen Tumormodellen, die vom Zelltyp und dem Level der Expression abhängen (Durand, Bodker et al. 2004). Unter pathologischen Bedingungen sezernieren endotheliale und Tumorzellen eine große Menge an PAI-1 (Binder, Christ et al. 2002).

Die biologische Rolle von PAI-1 geht also über die eines Proteaseinhibitors alleine weit hinaus (Stefansson, McMahon et al. 2003). PAI-1 funktioniert nicht nur als fibrinolytischer Inhibitor (Loskutoff, van Mourik et al. 1983), sondern spielt auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Zelladhärenz und Zellmigration (Harbeck, Kruger et al. 2001). PAI-1 ist als Vermittler an Prozessen, wie Fibrosis, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose,

Tumorangiogenese, bakteriellen Infektionen und anderem beteiligt (Jankun, Aleem et al. 2007; Lim, Stirling et al. 2007; Renckens, Roelofs et al. 2007). Bei einer Vielzahl von Krankheiten wie Krebs, Adipositas, renalen Erkrankungen und dem metabolischen Syndrom ist PAI-1 in gesteigertem Level und Aktivität präsent (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009). Hohe Level werden außerdem assoziiert mit einem gesteigerten Risiko für koronare Herzerkrankungen und Myokardinfarkt aufgrund der Inhibierung der Fibrinolyse (Jood, Ladenvall et al. 2005). Schließlich gibt es klinische Beweise, die vermuten lassen, dass PAI-1 ein Schlüsselfaktor für Tumorinvasion und Metastasis ist (Castello, Estelles et al. 2002).

2.4.3 PAI-1 und Übergewicht

Das Metabolische Syndrom, das infolge von Übergewicht auftreten kann, betrifft mehr als 50% der Erwachsenen in den USA (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Ein bekannter Parameter des Metabolischen Syndroms ist die Raufregulierung von PAI-1 (Alessi and Juhan-Vague 2006; Griffiths and Grainger 2006; Mertens, Verrijken et al. 2006). Es ist bewiesen, dass hohe Level von Triglyceriden und freien Fettsäuren (FFAs) im Blut mit Übergewicht korrelieren (Byon, Hardy et al. 2009). Erhöhte Plasmakonzentrationen von FFAs sind wiederum mit Brustkrebs assoziiert (Loskutoff and Samad 1998). Die molekularen Mechanismen dieser in der Brustkrebspathogenese sind allerdings noch unbekannt (Byon, Hardy et al. 2009). Klinische Studien sehen PAI-1 sowohl in Tumorgewebe als auch im Plasma als prognostischen Schlüsselfaktor in Brustkrebs (Byon, Hardy et al. 2009). PAI-1 ist bei Übergewicht sehr stark raufreguliert und die erhöhten FFA-Konzentrationen korrelieren positiv mit PAI-1 Plasmalevel (Bastard, Bruckert et al. 1995; Alessi, Bastelica et al. 2000). PAI-1 könnte dadurch unter Umständen also wichtig sein im Vermitteln der Effekte von freien Fettsäuren (Byon, Hardy et al. 2009). FFAs induzieren die Expression von PAI-1 in Brustkrebszellen, die dann bei der gesteigerten Migration mitwirken (Byon, Hardy et al. 2009). Die FFA-induzierte PAI-1 Expression wird durch den Transkriptionsfaktor SMAD4 vermittelt (Byon, Hardy et al. 2009). Hochinvasive MDA-MB-231 Zellen

exprimieren größere Mengen von PAI-1 im Vergleich zu weniger invasiven Hs578T Zellen, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt, dass PAI-1 ziemlich sicher an der Invasion und Metastasis in Brustkrebs mitwirkt (Byon, Hardy et al. 2009).

Ein kausaler Zusammenhang von PAI-1 und der Entwicklung von Adipositas wurde bisher noch nicht gefunden (Jankun and Skrzypczak-Jankun 2009). Es wurde aber bereits gezeigt, dass Gewichtsverlust geringere PAI-1 Werten fördert (Sola, Vaya et al. 2008).

2.4.4 Das uPA-System und Brustkrebs

uPA und PAI-1 sind die am meisten validierten biologischen Faktoren bei Brustkrebs (Schmitt, Harbeck et al. 1997; Duffy 2002). uPA und PAI-1 gehören zu den ersten biologischen Faktoren, deren prognostischer Wert sowohl durch eine prospektiven randomisierten Studie als auch durch eine Pooled Analysis bestätigt wurde (Duffy and Duggan 2004). Sowohl uPA als auch PAI-1 können über den Ausgang der Erkrankung unabhängig von den klassischen prognostische Faktoren wie Lymphknotenstatus, Tumorgöße oder Tumorgad eine Aussage treffen (Schmitt, Harbeck et al. 1997; Duffy 2002). Der prognostische Einfluss von uPA und PAI-1 ist stärker ausgeprägt als der von anderen biologischen Markern (Duffy and Duggan 2004). Patienten mit niedrigen Level dieser Marker haben ein geringeres Risiko eines Rückfalls (Duffy and Duggan 2004). Hohe Konzentrationen von uPA und/ oder PAI-1 korrelieren mit Tumoraggressivität und einem schlechten Patientenausgang in verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Ovarienkrebs, ösophagialem, kolorektalem, Magen-, Lungen- oder Leberkrebs (Harbeck, Schmitt et al. 2007). Am wichtigsten ist die Bedeutung der beiden aber eindeutig bei Brustkrebs (Harbeck, Schmitt et al. 2007). Hohe uPA und/ oder PAI-1 Konzentrationen in primären Brustkrebsgeweben sind assoziiert mit einem mehr als doppelt so hohem Risiko für einen Krankheitsrückfall oder Tod durch Brustkrebs (Harbeck, Schmitt et al. 2007).

Die starke prognostische Aussagekraft von beiden für DFS (disease-free survival) und OS (Overall survival) bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs wurde in allen bisher publizierten Studien bestätigt (Foekens, Schmitt et al. 1994; Eppenberger, Kueng et al. 1998). Seine größte klinische Relevanz hat die Kombination von uPA/ PAI-1 in Lymphknoten-negativen Brustkrebspatientinnen (Harbeck, Schmitt et al. 2007). Durch die steigende Anzahl an Lymphknoten-negativen Patientinnen (was auch durch die routinemäßig durchgeführte Mammographie erreicht wurde) und dem immer stärker aufkommendem Thema der „Überbehandlung“ bei potentiell geheilten Frauen, ist eine adäquate Risikogruppenbeurteilung von enormer Wichtigkeit in dieser Patientengruppe (Harbeck, Schmitt et al. 2007). Aufgrund dieser Fakten sollte die Bestimmung von uPA und PAI-1 daher für eine routinemäßige Bestimmung bei Brustkrebspatientinnen bedacht werden, v.a. bei Lymphknoten-negativen Untergruppen (Duffy and Duggan 2004).

Hohe uPAR-Level sind ebenfalls mit einem ungünstigen Outcome assoziiert (Duggan, Maguire et al. 1995; Riisbro, Christensen et al. 2002), aber der prognostische Einfluss ist weit weniger stark (Duggan, Maguire et al. 1995).

Die bekannte biochemische Funktion von PAI-1 widerspricht der pathologischen Funktion in Krebs (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Bei einem gesteigertem PAI-1 Level würde man erwarten, dass die durch uPA hervorgerufene Bildung von Plasmin inhibiert wird und somit die ECM vor Proteolyse geschützt und die Invasion inhibiert wird. Genau im Gegenteil korrelieren aber hohe PAI-1 Level mit einer schlechten Prognose und reduzieren die Überlebenswahrscheinlichkeit in vielen Krebsarten, darunter auch bei Brustkrebs (Look, van Putten et al. 2002). Genau deswegen existiert das sogenannte PAI-1 Paradoxon, weil angenommen wurde, dass ein erhöhter PAI-1 Level bei Krebs schützend wirkt, vor allem bei Metastasis (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Genau das Gegenteil ist aber der Fall.

Bei Brustkrebs sind erhöhte PAI-1 Level an Zelladhäsion, Migration, Invasion, Apoptose, Proliferation, Zellsignalen und Tumorangio-genese über einen Mechanismus, der teilweise unabhängig ist von der inhibitorischen Funktion von PAI-1, beteiligt (Stefansson and Lawrence 2003; Durand, Bodker et al. 2004; Dano, Behrendt et al. 2005). PAI-1 kann sich durch uPA/ uPAR an Zellen anhängen, was die Zellmorphologie verändert und die Brustkrebszellmigration fördert (Chazaud, Ricoux et al. 2002). Dieser Anstieg der Migration kann allerdings nur erfolgen, wenn alle Komponenten des uPA-Systems verfügbar sind (Chazaud, Ricoux et al. 2002). PAI-1 kann aber gleichzeitig auch die Tumorzellmigration inhibieren (Stefansson, Lawrence et al. 1996; Degryse, Sier et al. 2001; Praus, Collen et al. 2002). Abhängig von der aktiven Form kann überexprimiertes PAI-1 in Brust- und Ovarienkrebszellen Zellmigration und Invasion reduzieren (Whitley, Palmieri et al. 2004). PAI-1 bildet einen Komplex mit uPA und durch dessen Bindung an uPAR, kommt auch LRP hinzu (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Dieser Komplex wird internalisiert, was in einem Verlust der Komponenten des uPA-Systems und einer Reduktion der Zellmigration resultiert (Degryse, Sier et al. 2001). Die PAI-1 vermittelte Inhibierung der Migration kann aber auch unabhängig von seiner uPA-inhibierenden Rolle sein (Beaulieu, Whitley et al. 2007).

Die Komponenten des uPA-Systems können auch die Apoptose regulieren (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass PAI-1 die Apoptose durch die Inhibierung von uPA verhindert, wenn es exogen zu normalen und Tumorzellen hinzugefügt wurde (Kwaan, Wang et al. 2000). Diese Tatsache alleine ist wichtig für das Verstehen des PAI-1 Paradox (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Überexprimiertes PAI-1 schützt die Krebszellen wiederum vor Apoptose (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Ein Resultat daraus könnte die Unterstützung von PAI-1 zur Formation eines aggressiveren Tumors sein (Beaulieu, Whitley et al. 2007).

Es könnte auch sein, dass PAI-1 die Balance zwischen Zelladhäsion und Zellablösung regelt (Deng, Curriden et al. 1996). PAI-1 ist, wie auch uPA, stark mit dem Invasionsprozess vernetzt (Bouchet, Hacene et al. 1999). Es wurde

berichtet, dass eine in vitro Behandlung mit PAI-1 die Ablösung von Krebszellen von der Gefäßoberfläche induziert (Jankun, Aleem et al. 2007; Binder and Mihaly 2008).

2.5 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von 23 strukturell verwandten Zink-abhängigen Endopeptidasen, die an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Reproduktion und Angiogenese beteiligt sind (Daniele, Zito et al. 2010). Sie werden nach ihrer Substratspezifität in Gelatinasen, Stromelysinen und Kollagenasen klassifiziert (Sato, Takino et al. 1994; Birkedal-Hansen 1995; Basbaum and Werb 1996). MMPs werden in einer inaktiven Form oder als Zymogen mit einem Aminoterminalen Propeptid, das erst gespalten werden muss, um das aktive Enzym zu erhalten, synthetisiert (Liotta and Stetler-Stevenson 1991; Birkedal-Hansen 1995; Basbaum and Werb 1996). Erhöhte Expression von MMPs fördert zahlreiche pathologische Prozesse, wie rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Angiogenese sowie Invasion und Metastasis bei Krebs (Murphy and Docherty 1992; Chambers and Matrisian 1997; Egeblad and Werb 2002). MMPs sind in verschiedenen Karzinomen wie Brust-, Darm-, Pankreas- und Leberkrebs erhöht (Stetler-Stevenson 1990; Bissell and Radisky 2001; Sternlicht and Werb 2001).

MMPs sind involviert in pathologische Prozesse, wie z.B. Tumordinvasion und Metastasis, in denen die Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM) von entscheidender Bedeutung ist (Johansson, Ahonen et al. 2000; McCawley and Matrisian 2000). MMPs sind in der Lage die verschiedenen Komponenten der ECM und der Basismembran aufzuschließen (Das, Banerji et al. 2008). Die ECM gibt den Zellen strukturelle Unterstützung und spielt eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion, Differenzierung, Proliferation und Migration (Das, Banerji et al. 2008). Damit eine Metastasis erfolgen kann, müssen Veränderungen des Zell-Zell- und Zell-Matrix-Anhaftens geschehen, gefolgt von einer proteolytischen Degradierung der ECM und einer Migration von Tumorzellen (Das, Banerji et al. 2008). Diese Art der Degradierung der ECM wird ebenfalls von MMPs katalysiert (Das, Banerji et al. 2008). Plasmin kann indirekt auch die ECM-Degradierung vermitteln, indem es bestimmte latente MMPs wie -3, -9, -

12 und -13 aktiviert (Carmeliet, Moons et al. 1997). Diese Bildung von aktiven MMPs erlaubt dann eine weitere Proteolyse der ECM (Duffy 2002).

Die 92 kDa Gelatinase (Gelatinase B oder MMP-9) und die 72 kDa Gelatinase (Gelatinase A oder MMP-2) können native Kollagen-Typen IV und V, Fibronectin, Entactin und Elastin degradieren (Esparza, Vilardell et al. 1999). Es wird vermutet, dass diese Proteasen von enormer Bedeutung bei Prozessen sind, die die Spaltung der Basismembran betreffen, wie z.B. Tumordinvasion und Metastasis (Liotta and Stetler-Stevenson 1991; Birkedal-Hansen 1995; Basbaum and Werb 1996), ebenso wie die Gewebeeinfiltration durch Leukozyten, die das pathologische Substrat von chronischen inflammatorischen Erkrankungen darstellen (Esparza, Vilardell et al. 1999).

MMP-2 und -9 kommen somit sehr kritische Rollen in Krebs, infektiösen Krankheiten, Wundheilung, Inflammation und vielen vaskulären Erkrankungen zu (Mathews-Roth, Michel et al. 1995; Kahari and Saarialho-Kere 1997; Coussens, Tinkle et al. 2000). Die Expression und die Aktivität von MMP-9 wurde mit verschiedenen Stadien der Krebsprogression, die mit einem Durchbrechen der Basismembran in Verbindung stehen, assoziiert (Stetler-Stevenson, Liotta et al. 1993; Zeng and Guillem 1996). Außerdem ist MMP-9 im Plasma von Patienten mit Darm- oder Brustkrebs deutlich erhöht (Zucker, Lysik et al. 1993) und diese Erhöhung kann nicht nur die Tumordinvasionsfähigkeit, sondern auch Tumorstadium und Angiogenese induzieren (Sang 1998).

MAPKs wie ERK, JNK und p38 sind in die Regulation der MMP-9 Transkription involviert (Simon, Simon et al. 2001). Der MMP-9 Promoter hat mehrere Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1, NF- κ B und Sp-1 (Himmelstein, Lee et al. 1998). Die Aktivierung von MMP-9 ist primär reguliert durch das Gleichgewicht zwischen Pro-Enzym-Aktivierung und Inhibierung durch TIMP-1 (Brown, Levy et al. 1990), während MMP-2 konstitutiv exprimiert und als latentes Zymogen Pro-MMP-2 sekretiert wird (Yang, Kuo et al. 2011). Sowohl die MMP-2 als auch die MMP-9 Expression und Aktivität sind für die Entstehung einer Metastasis von Bedeutung (Das, Banerji et al. 2008).

Bei Brustkrebs sind genau diese 2 MMPs, nämlich MMP-2 und MMP-9, an dem Prozess der Metastasis beteiligt (Collier, Krasnov et al. 1992; Kallakury,

Karikehalli et al. 2001). Erhöhte Serumlevel von beiden Gelatinasen korrelieren positiv mit einer hohen Inzidenz von Metastasis (Bjorklund and Koivunen 2005; Nikkola, Vihinen et al. 2005). Eine erhöhte Expression im Tumorgewebe ist assoziiert mit einer aggressiven Erkrankung und ungünstigem Ausgang (Giannelli, Fransvea et al. 2002). Bezüglich der MMP-2 und -9 Serumexpression, die durch Zymogramme ermittelt wurden, zeigt die Analyse der Resultate von Daniele et al. bei Patienten, egal ob mit oder ohne metastasierenden Brustkrebs, eine höhere Konzentration von MMP-2 und -9 im Vergleich mit einer Gruppe von gesunden Frauen (Daniele, Zito et al. 2010). Die Serumlevel von beiden Gelatinasen lassen keinen Schluss auf die Tumorgroße zu, aber sie scheinen für andere Tumorcharakteristika wie seine Invasionsfähigkeit oder sein hohes malignes Potential von Bedeutung zu sein (Turpeenniemi-Hujanen 2005). Hohe Serumlevels von MMP-9 werden mit einer schnellen Krankheitsprogression, schlechtem Überleben und Metastasis in Zusammenhang gebracht (Giannelli, Erriquez et al. 2004).

Mehrere Studien mit unterschiedlichen Zelltypen haben bestätigt, dass MAPKs, wie ERK, p38 und JNK eine zentrale Rolle in der Regulierung der Expression von MMPs oder auch uPA spielen (Westermarck and Kahari 1999). Somit könnte die Inhibierung des MAPK-Pathway potentiell die Invasion und Metastasis von einer Vielzahl von Tumoren verhindern (Westermarck and Kahari 1999). Laut Das et al. zeigte die Inhibierung des ERK-Pathway eine partielle Inhibierung der MMP-2 Aktivierung, aber keine Veränderung in der Expression von MMP-2 oder MMP-9 (Das, Banerji et al. 2008). Daraus lässt sich schließen, dass die MMP-2 Expression und Aktivität nur partiell abhängig vom ERK-Pathway zu sein scheint (Das, Banerji et al. 2008), allerdings könnten andere Proteasen, die für eine MMP-2 Aktivierung wichtig sind, wie z.B. MT1-MMP oder TIMP-2, von ERK kontrolliert werden (Das, Banerji et al. 2008). MMP-2 ist also anscheinend kein Zielgen von ERK (Das, Banerji et al. 2008). Im Fall von MCF-7 Zellen scheint das auch der Fall für MMP-9 zu sein (Das, Banerji et al. 2008).

Tumorzellmodelle von Brustkrebs haben demonstriert, dass gesteigerte MMP-Expressionslevel mit gesteigerter Tumoraggressivität und metastatischem Potential zusammenhängen (Bachmeier, Nerlich et al. 2001). Die Kontrolle der MMP-Synthese und Aktivierung kann daher als wichtiges Ziel für die Prävention der Tumorprogression angesehen werden (Yang, Kuo et al. 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Laminar Flow Hood Biosafe 2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Mikroskop	Zeiss Axiovert 135
Wasserbad Thermo-Boy	MGW Lauda
Zellkulturflaschen	Greiner
12-Well-Platten	Greiner
Trockenschrank	Binder
DMEM	BioWhittaker, Lonza
FCS	Gibco
L-Glutamin (200mM in 0,85% NaCl Solution)	BioWhittaker, Lonza
Penicillin/ Streptomycin (10 000U/ml)	BioWhittaker, Lonza
Ethanol 70%	MERCK
Trypsin	PAA
Zinkchlorid $ZnCl_2$ 200mM	SIGMA
HCl 30mM	PROLABO
p-p38-Inhibitor SB202190 1mM	Alomane Labors
pERK-Inhibitor U0126 5mM	Alomane Labors
DMSO	MERCK

3.1.2 Zelllinie

MCF-7 Zellen (Mamma-Karzinom Zelllinie)

Dr. Herbert Soule entwickelte die MCF-7 Brustkrebszelllinie (Levenson and Jordan 1997). Die Zellen wurden von einer pleuralen Effusion von einer Brustkrebspatientin mit metastasierendem Brustkrebs (Soule, Vazquez et al. 1973) in der Detroit Area entnommen und in der Michigan Krebsforschung, Detroit, entwickelt. Sie sind zu einem Standardmodell für hunderte Laboratorien in der ganzen Welt geworden (Levenson and Jordan 1997).

3.1.3 Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten in der Zellkultur werden in einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Diese Werkbank wird über Nacht mit UV-Licht desinfiziert. Ebenso sind alle Geräte und Produkte, die in der Zellkultur verwendet werden steril. Plastikpipettenspitzen werden vor Gebrauch autoklaviert (bei 120°C) und danach im Trockenschrank bei 70°C getrocknet. Glaspipetten, die mehrmals verwendet werden, werden bei 180°C 14 Stunden lang sterilisiert. Alle Behälter dürfen nur in der Werkbank geöffnet werden.

3.1.4 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wird Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 500ml) verwendet. Um komplementiertes Medium zu erhalten, wird 50ml FCS, 5ml 200mM L-Glutamin sowie 5ml Penicillin/ Streptomycin hinzugefügt. DMEM lagert bei 4°C und wird vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Bei unkomplementiertem Medium werden nur 5ml Penicillin/ Streptomycin dazugegeben.

3.1.5 Zellkultivierung und Aussetzen der Zellen

Die Zellen werden in Flaschen mit einer Größe von 25 cm² kultiviert, in denen sich jeweils 5ml komplementiertes Medium (DMEM) befinden. Sie werden im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre gezüchtet. Unter dem Mikroskop wird die Dichte der Zellen beobachtet. Wenn sie konfluent sind (meistens nach 2-3 Tagen), werden sie wieder neu ausgesetzt oder verdünnt. Dafür wird das alte Medium abgesaugt und für ca. 30 sec. wird 1,5ml Trypsin hinzugegeben, um die Zellen zu lösen. Während dieser Einwirkzeit werden die Flaschen in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach wird das Trypsin wieder abgesaugt, die Zellen durch vorsichtiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst, und frisches Medium hinzugefügt. Je nachdem welche Dichte die Zellen erreicht haben, werden sie dementsprechend verdünnt.

Beim Aussetzen der Zellen werden die oben genannten Schritte wiederholt, sie werden dann allerdings in eine 12-Well-Platte übergeführt. Diese wird wieder 2-3 Tage hochgezüchtet, bis die gewünschte Dichte erreicht ist.

3.1.6 Inkubation mit Zink

Nachdem die Kultivierung der Zellen in der 12-Well-Platte erfolgreich abgeschlossen ist, erfolgt die Inkubation mit Zinkchlorid in DMEM mit 5%FCS. Die Platte wird mit Zinkchlorid, pERK-Inhibitor U0126 und p38-Inhibitor SB202190 nach folgendem Schema inkubiert.

Inkubation (1 Stunde):

Substanz	Anfangs-Konzentration	Volumen	End-Konzentration
p-p38 Inhibitor	1mM	2µl/ml DMEM	2µM
SB202190			

Inkubation (4 Stunden):

Substanz	Anfangs- Konzentration	Volumen	End- Konzentration
pERK Inhibitor U0126 (Trägersubstanz: DMSO)	5mM	2µL/ml DMEM	10µM
Zinkchlorid ZnCl ₂ in 30mM HCl	200mM	0,5µl/ml DMEM	100µM

Tabelle 1 Pipettierschema zur Inkubation der MCF-7 Zellen

Der p38-Inhibitor SB202190 muss zuerst inkubiert werden, da er nur 1 Stunde einwirkt. Nach dieser Inkubation werden das Zinkchlorid und der pERK-Inhibitor U0126 pipettiert. Die Trägersubstanzen der beiden werden jeweils in die Wells, die noch kein DMSO und HCl enthalten, in der gleichen Konzentration aufgetragen, um gleichmäßige Bedingungen zu schaffen. Diese inkubieren dann nochmals für 4 Stunden. Pro Well werden 0,5ml aufgetragen.

Des Weiteren werden auch Inkubationen mit verschiedenen Zinkkonzentrationen für 4 Stunden durchgeführt. Das Pipettierschema für zwei 12-Well-Platten, in die pro Well 0,5ml aufgetragen werden, sieht folgendermaßen aus:

Substanz	Ausgangs- Konzentration	Volumen	End- Konzentration
Zink 10 μ M	200mM	0,05 μ l ZnCl ₂ + 0,95 μ l HCl/ml DMEM	10 μ M
Zink 20 μ M	200mM	0,1 μ l ZnCl ₂ + 0,9 μ l HCl/ml DMEM	20 μ M
Zink 50 μ M	200mM	0,25 μ l ZnCl ₂ + 0,75 μ l HCl/ml DMEM	50 μ M
Zink 100 μ M	200mM	0,5 μ l ZnCl ₂ + 0,5 μ l HCl/ml DMEM	100 μ M
Zink 200 μ M	200mM	1 μ l ZnCl ₂ /ml DMEM	200 μ M

Tabelle 2 Pipettierschema zur Inkubation der verschiedenen Zinkkonzentrationen

30mM HCl dient wieder als Trägersubstanz von Zinkchlorid ZnCl₂ und wird eingesetzt, um die Volumensunterschiede auszugleichen.

3.2 Lysieren Western Blot

3.2.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Zentrifuge	Eppendorf 5417R
------------	-----------------

5x PBS, 1000ml

40g NaCl	Roth
----------	------

14,5g Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	MERCK
--	-------

1g Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	MERCK
---	-------

1g Kaliumchlorid KCl	MERCK
----------------------	-------

1M NaOH (pH-Wert Einstellung)	MERCK
-------------------------------	-------

Aqua dest. zum Auffüllen

Lysis Buffer, 100 ml

876,6mg Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Roth
---	------

876,6mg NaCl	Roth
--------------	------

74,4mg EDTA	MERCK
-------------	-------

0,5ml 0,5% Nonidet-P	USB
----------------------	-----

37%ige HCl (ph-Wert Einstellung)	MERCK
----------------------------------	-------

Aqua dest. zum Auffüllen

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
-----------------------------	-------

Nach der Inkubation wird die Platte sofort auf Eis gestellt, um Stoffwechselvorgänge zu stoppen. Das Medium wird abgesaugt und in jedes Well kommt 1ml 1x PBS (im Kühlschrank bei 4°C gelagert) zum Waschen. Die Platte wird kurz geschwenkt und das 1x PBS wieder abgesaugt. Danach wird Lysis-Puffer aufgetragen (100µl/ Well), um die Zellen zu lösen. Dem Lysis-Puffer wird davor noch Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Nach ca. 10 Minuten Einwirkzeit werden die Zellen vom Boden abgeschabt und sie werden in Eppis übergeführt. Diese werden kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen auf Eis zentrifugiert werden die Eppis 15 Minuten bei 13

500rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Eppis übergeführt. Die Proben werden dann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3 Proteinbestimmung

3.3.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

BCA Protein Assay Kit	Pierce
BCA Protein Solution A und B	
Albumin Standard (BSA) 2mg/ml	
96-Well-Platte	Greiner
8 Kanalpipette	Eppendorf 300 Research
Parafilm	Manesha
Plattenreader	Bio-Rad
Prism 3.02	GraphPad

BSA mit einer Konzentration von 2mg/ml wird als Proteinstandard verwendet. Es wird eine Verdünnungsreihe (1:2) aus 8 Verdünnungsschritten mit destilliertem Wasser hergestellt, wobei in Standard 8 nur destilliertes Wasser vorkommt.

Die Proben werden 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. In einer 96-Well-Platte wird jeweils 3x 10µl der Standards bzw. der Proben aufgetragen.

Anschließend wird in jedes Well 200µl Detektionslösung hinzugefügt. Diese besteht aus BCA Protein Solution A und B im Verhältnis 1:50.

Die Platte wird mit Parafilm bedeckt und kommt für 30 Minuten bei 37°C in den Brutschrank. Danach lässt man sie bei Raumtemperatur ca. 20-30 Minuten abkühlen. Die Extinktion wird photometrisch am Plattenreader bei 550nm gemessen. Das Ergebnis wird mittels Prism 3.02 ausgewertet.

3.4 Western Blot

3.4.1 SDS-Gelelektrophorese

3.4.1.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

3M Tris-HCl/ pH 8,45/ 0,3% SDS, 500ml	
182g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base	Roth
400ml Aqua dest. (zum Lösen)	
37%ige HCl (pH-Wert Einstellung)	MERCK
1,5g SDS ultra pure	Roth
Aqua dest. (zum Auffüllen)	
30% Acrylamid/ Bis	
29g Acrylamid	Sigma
1g Bis	Sigma
100ml Aqua dest. (zum Lösen)	
10% APS	
0,1g Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech
1ml Aqua dest. (zum Lösen)	
TEMED	GERBU
Isopropanol 30%	MERCK
Ethanol 70%	MERCK
Glasplatten 0,75mm	Bio-Rad
15-Well-Kämme 0,75mm	Bio-Rad
Mini-PROTEAN II Apparatur	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Sample Buffer, 100µl	
50µl Glycerol (87%)	MERCK

45µl 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	
5µl 2-Mercaptoethanol	MERCK
Bromphenolblau (einige Brösel)	MERCK

10x Tris-Glycin Buffer, 1000ml	
30g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base	Roth
144g Glycin	Roth
100ml 10% SDS-Lösung	
Aqua dest. (zum Auffüllen)	

10% SDS-Lösung, 100 ml	
10g SDS ultra pure	Roth
100ml Aqua dest. (zum Lösen)	

Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas
--------------------------------------	-----------

3.4.1.2 Herstellung der Gele

Zuerst werden die Glasplatten vorbereitet, indem sie gereinigt und danach mit Ethanol fettfrei gemacht werden. Nachdem sie mit einem Microfasertuch getrocknet wurden, werden sie in die vorgesehene Halterung eingespannt.

Die Substanzen eines 10%igen Trenngels mit einer Stärke von 0,75mm werden für 4 Gele nach folgendem Schema pipettiert:

Substanz	Volumen
Aqua dest.	4ml
30% Acrylamid	4ml
3 M Tris-HCl (pH 8,45)	4ml
10% APS	60µl
TEMED	6µl

Tabelle 3 Pipettierschema zur Herstellung eines 10%igen Trenngels

Kurz vor dem Gießen des Gels wird erst 10% APS und TEMED hinzugegeben, da diese die Polymerisation initiieren. Nach dem nochmaligen Durchmischen der Substanzen wird das Gel sofort zwischen die Glasplatten bis zur Markierung gegossen. Darüber wird noch eine Schicht 30% Isopropanol pipettiert, um Luftblasen zu vermeiden. Nach ca. 30 Minuten ist das Trenngel fest und das 4%ige Sammelgel wird hergestellt.

Substanz	Volumen
Aqua dest.	1,54ml
30% Acrylamid	340µl
3M Tris-Hcl (pH 8,45)	620µl
10% APS	20µl
TEMED	2µl

Tabelle 4 Pipettierschema zur Herstellung eines 4%igen Sammelgels

Nach 30 Minuten wird das Isopropanol wieder entfernt und mehrmals mit destilliertem Wasser nachgespült. Reste des Wassers werden mittels Filterpapier entfernt. Das fertige Sammelgel wird zwischen die Platten bis zum oberen Rand gefüllt. Danach werden vorsichtig die vorher gereinigten und fettfreien Kämme (15 Taschen) hineingesteckt. Das Sammelgel ist ebenfalls nach ca. 30 Minuten auspolymerisiert.

3.4.1.3 Probenvorbereitung

Die Proben werden auf Eis aufgetaut und mit Sample Buffer (frisch hergestellt) und 1x PBS (um die Proteinkonzentrationen laut Proteinbestimmung auszugleichen) versetzt. Sample Buffer macht ein Viertel des Volumens aus. Alles wird am Vortex vor Beladung der Gele gut durchmischt und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

3.4.1.4 Beladung der Gele und Elektrophorese

Wenn die Gele fertig auspolymerisiert sind, werden sie in der Elektrophoresekammer eingespannt. Diese wird mit 1x Tris-Glycin Buffer gefüllt bis sie ganz voll ist. Der Kamm wird vorsichtig herausgenommen und die Geltaschen werden mit einer Spritze, die mit 1x Tris-Glycin Buffer gefüllt ist, gut gespült. Anschließend werden die Leiter (Prestained Protein Ladder) und die Proben im jeweiligen Volumen mit Gelbeladungsspitzen in die Taschen aufgetragen. Die Leiter dient als Größenmarker und zur Orientierungshilfe. Die Elektrophorese wird konstant bei 180 V und 4°C im Kühlschrank durchgeführt. Die Dauer beträgt etwa 90 Minuten. Danach wird der Tris-Glycin Buffer entfernt und die Glasplatten werden aus der Kammer genommen. Das Gel wird vorsichtig von den Platten gelöst und das Sammelgel wird mit einer Rasierklinge entfernt.

3.4.2 Western Blot Transfer

3.4.2.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Transfer Buffer 1000ml
 100ml 10x Tris-Glycin Buffer
 200ml Methanol
 10ml 10% SDS-Lösung
 Aqua dest. (zum Auffüllen)

MERCK

Ponceau S 1000 ml

10g Ponceau S

MERCK

300g Trichloressigsäure

MERCK

300g Sulfosalicylsäure

MERCK

Aqua dest. (zum Auffüllen)

Pure Nitrocellulose-Membran Trans-Blot	Bio-Rad
0,45µm	
Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad

Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und anschließend immunologisch detektiert.

3.4.2.2 Aufbau des Sandwichs

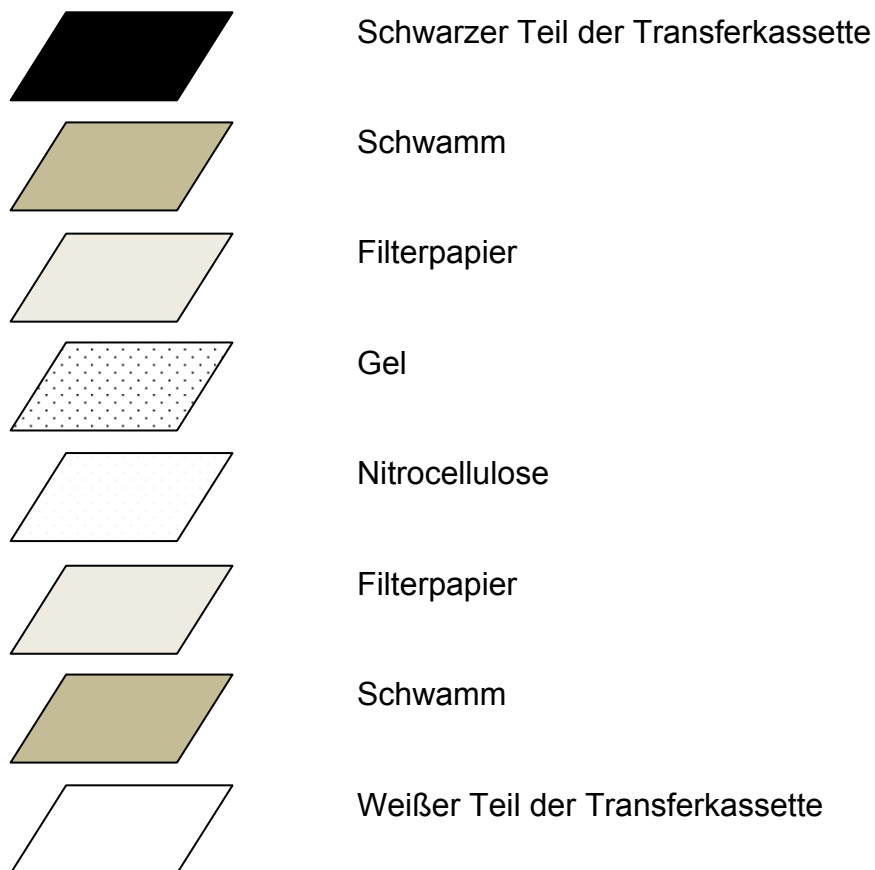


Abbildung 3 Aufbau des Sandwichs für den Western Blot

Bevor das Gel aufgelegt wird, werden die Schwämme, das Filterpapier und die Nitrocellulose in Transfer-Buffer getränkt. Dann wird das Gel auf die Nitrocellulose gelegt und mittels eines feuchten Spatels von der Glasplatte

entfernt. Das Filterpapier wird auf das Gel gelegt und dann werden eventuell vorhandene Luftblasen, die den Transfer stören könnten, zwischen Gel und Filterpapier durch sanftes Rollen mit einer Glaseprouvette entfernt. Der schwarze Teil der Transferkassette schaut zur schwarzen Seite in der Transferkammer. In die Transferkammer wird ein Eisblock gestellt zur Kühlung und die Kammer wird mit Transfer-Buffer aufgefüllt. Der Transfer läuft konstant bei 400mA und 4°C 45 Minuten lang im Kühlschrank. Da der Transfer-Buffer mehrmals verwendet werden kann, sollte die Spannung beim Starten des Transfers unbedingt überprüft werden (>90V).

Anschließend wird die Nitrocellulose vorsichtig ausgepackt und mit Ponceau S ca. 5 Minuten eingefärbt. Der Überschuss an Ponceau S wird mit destilliertem Wasser durch mehrmaliges Schwenken entfernt. Danach sind die Proteinbanden gut sichtbar. Durch die Färbung werden die Gleichmäßigkeit und die Effizienz des Transfers überprüft und außerdem kann man den Blot exakt zurechtschneiden.

3.4.3 Immunodetektion

3.4.3.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

10x TBS Buffer (pH 7,4), 1000ml	
24,2g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base	Roth
84,8g NaCl	Roth
37%ige HCl (pH-Wert Einstellung)	MERCK
Aqua dest. (zum Auffüllen)	
Washing Buffer 1000ml	
100ml 10x TBS	
1ml Tween	MERCK
Aqua dest. (zum Auffüllen)	

Blocking Buffer

2g Magermilchpulver

Fixmilch INSTANT

40ml Washing Buffer

Primär-Antikörper-Lösung

0,3g Bovines Serumalbumin (BSA)

Amresco

10ml Washing Buffer

1 Spatelspitze Natriumazid NaN_3

Sekundär-Antikörper-Lösung

Goat Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP Conjugate

Bio-Rad

Goat Anti-mouse-IgG (H+L)-HRP Conjugate

Bio-Rad

1:15 000 in Blocking Buffer

SuperSignal West Femto; West Dura; West Pico

Pierce

Belly Dancer

Stovall Lifesciences

Chemilmager 4400

Biozym

AlphaEaseFC-Chemilmager 4400

Alpha Innotec

Prism 3.02

GraphPad

Alle nachfolgenden Schritte werden am Belly Dancer unter ständiger Bewegung bei mittlerer Stufe durchgeführt. Nach der Färbung mit Ponceau S wird der Blot mittels Blocking Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach wird zweimal 5 Minuten mit Washing Buffer gewaschen und der Blot wird mit der Primär-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C versetzt.

Am nächsten Tag wird der Antikörper in einem Falcon gesammelt, da er mehrmals wiederverwendet werden kann. Der Blot wird 3x 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen und anschließend für eine Stunde mit der Sekundär-Antikörper-Lösung inkubiert. Danach wird der Blot nochmals 3x 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen.

Im Anschluss wird der Blot mit einer 1:1 Lösung der SuperSignal West-Lösungen 5 Minuten inkubiert, die Menge wird nach der Größe des Blots bestimmt. Mit dem Chemilmager 4400 wird der Blot zwischen 30 Sekunden bis zu 30 Minuten belichtet. Die Banden werden dann mittels des Programms AlphaEaseFC-Chemilmager 4400 semi-quantitativ ausgewertet. Die Signalstärke wird als Integrated Density angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mit den Programmen Microsoft Excel und Prism 3.02.

3.5 Lysieren PCR

3.5.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

5x PBS 1000ml	
40g NaCl	Roth
14,5g Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	MERCK
1g Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	MERCK
1g Kaliumchlorid KCl	MERCK
1M NaOH (pH-Wert Einstellung)	MERCK
Aqua dest. zum Auffüllen	
peqGOLD TriFast	PEQLAB

Nach der Inkubation werden die 12-Well-Platten sofort auf Eis gestellt, um Stoffwechselvorgänge zu stoppen.

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden mit 1ml 1x PBS gewaschen. Danach kommen 0,5ml TriFast für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen (unter dem Abzug). Die Zellen werden mit einer Pipettenspitze vom Boden gelöst und in Eppis übergeführt. Diese werden bei -20°C gelagert.

3.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.6.1 RNA-Isolierung

3.6.1.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Zentrifuge	Eppendorf 5417R
------------	-----------------

DEPC	SIGMA
------	-------

DEPC-Wasser RNasefrei

100µl DEPC	SIGMA
------------	-------

1l Aqua dest. zum Lösen (3h unter Abzug)

2h bei 120°C autoklavieren

DEPC-Pipettenspitzen, -Eprövetten RNasefrei

in DEPC-Wasser über Nacht tränken

2h bei 120°C autoklavieren; bei 70°C trocknen

Chloroform	MERCK
------------	-------

Isopropanol	MERCK
-------------	-------

75% Ethanol in DEPC-Wasser	MERCK
----------------------------	-------

Für die RNA-Isolierung werden die mit TriFast lysierten Zellen unter dem Abzug bei Raumtemperatur aufgetaut. Inzwischen wird die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt. Pro eingesetztem ml TriFast werden 200µl Chloroform CHCl_3 zugegeben und 30 Sekunden kräftig geschüttelt, so dass eine gute Durchmischung besteht. Die Proben bleiben ca. 2 Minuten im Abzug stehen. Anschließend wird 10 Minuten bei 12 000rcf zentrifugiert.

In der Zwischenzeit werden neue Tubes vorbereitet. Diese werden auf Eis gestellt und 500µl Isopropanol pro ml eingesetztem TriFast werden vorgelegt. Nach der Zentrifugation ist eine deutliche Phasentrennung erkennbar. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wird vorsichtig in 100µl-Schritten

abgenommen und in die Tubes mit dem Isopropanol überführt. Es darf zu keiner Verunreinigung mit den anderen Phasen kommen. Die Tubes werden kurz durchgeschwenkt und dann für ca. 30-60 Minuten im Tiefkühler bei -20°C gelagert.

Anschließend erfolgt die nächste Zentrifugation (15 Minuten bei 12 000 rcf). Dadurch entsteht ein RNA-Pellet. Das Isopropanol wird verworfen und es wird 2x mit 1ml 75%igen Ethanol gewaschen. Die Probe wird am Vortex gut durchmischt und nochmals für 10 Minuten bei 12 000rcf zentrifugiert. Das restliche Ethanol wird weggeleert und das Pellet wird im Abzug bei geöffneten Deckel der Tubes luftgetrocknet.

3.6.2 Reverse Transkription - cDNA-Synthese

3.6.2.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
NanoDrop ND 1000	Thermo Scientific
DEPC	SIGMA
DEPC-Wasser RNasefrei	
100µl DEPC	SIGMA
1l Aqua dest. zum Lösen (3h unter Abzug)	
2h bei 120°C autoklavieren	
DEPC-Pipettenspitzen, -Eprouvetten RNasefrei	
in DEPC-Wasser über Nacht tränken	
2h bei 120°C autoklavieren; bei 70°C trocknen	
Random Hexamer Primer 0,2µg/µl	Fermentas
Reaction Buffer	Fermentas

dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 100mM) Fermentas

dNTP's 10mM; 100µl

80µl Aqua dest. steril filtriert

je 5µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM

RiboLock RNase Inhibitor 40U/µl Fermentas

RevertAid M-MuL V Reverse Transkriptase Fermentas

200U/µl

Die nächsten Schritte erfolgen alle in der Laminar-Airflow Werkbank. Das getrocknete Pellet wird in 20µl DEPC-Wasser wieder gelöst und kommt dafür 10 Minuten bei 55°C in ein Wasserbad. 2µl dieser Lösung werden für die Messung des RNA-Gehalts (ng/µl) mittels NanoDrop verwendet. Dadurch wird die benötigte Menge an Probe ausgerechnet.

11,5µl der Probe werden mit 1µl Random Hexamer Primer in einer PCR-Tube versetzt und 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend werden noch je 7,5µl Mastermix hinzugefügt, der vorher nach folgendem Pipettierschema für hergestellt wird:

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen	End- konzentration
Reaction Buffer	5x	4µl	1x
dNTP's	100mM	2µl	10mM
Reverse Transkriptase	200U/µl	1µl	2U/µl
RNase Inhibitor	40U/µl	0,5µl	4U/µl

Tabelle 5 Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die cDNA-Synthese

Danach kommen die Proben nochmals 1 Stunde bei 37°C und 15 Minuten bei 60°C in den Thermocycler und die cDNA wird für die nachfolgende PCR bei -20°C gelagert.

3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.6.3.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Aqua dest. steril filtriert	
Sterilfilter Sterile Acrodisc 0,2µm	Gelman Sciences
PCR Master-Mix Y	peqLab
Taq Buffer	Fermentas
MgCl ₂ 25mM	Fermentas
dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 100mM)	Fermentas
dNTP's 10mM; 100µl	
80µl Aqua dest. steril filtriert	
je 5µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM	
Taq DNA Polymerase recombinant 1U/µl	Fermentas
Gen-spezifische Primer 100µM	VBC-Genomics
1:10 mit Aqua dest. steril filtriert gemischt	
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Agarose Pulver	MERCK
Ethidiumbromid 0,5mg/ml	MERCK
Mikrowelle	Moulinex
Elektrophoresekommer	Bio-Rad
Elektrophoresestation	Bio-Rad
5x TBE Buffer, 1000ml	
54g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	MERCK
27,5g Borsäure H ₃ BO ₃	MERCK
20ml 0,5M EDTA-Lösung	
Aqua dest. (zum Auffüllen)	
0,5M EDTA-Lösung; pH 8 (bei Raumtemperatur)	

93g Titriplex	MERCK
in 40 ml Aqua dest. Lösen	
10N NaOH (pH-Wert Einstellung)	MERCK
Aqua dest. (zum Auffüllen)	
6x Loading Dye	UVP
2 UV Transilluminator	Alpha Innotec
Prism 3.02	GraphPad

Mit der PCR werden bestimmte Nucleinsäuresequenzen der cDNA exponentiell vervielfältigt. Nach Auftauen aller Substanzen wird zunächst ein Mastermix für die Proben nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Substanz	Ausgangs- Konzentration	Volumen	End- konzentration
Aqua dest.		31 μ l	
Buffer	10x	5 μ l	1x
MgCl ₂	25mM	5 μ l	2,5mM
dNTP's	10mM	4 μ l	0,8mM
Primer (sense/ antisense)	10 μ M	je 1,5 μ l	je 0,3 μ M
Taq DNA Polymerase	1U/ μ l	1 μ l	0,02U/ μ l

Tabelle 6 Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR

Es werden 49 μ l Mastermix mit je 1 μ L Probe versetzt. Alles wird am Vortex gut durchmischt und anschließend im Thermocycler inkubiert. Je nachdem welche Sequenz betrachtet wird, werden unterschiedliche Primer verwendet und die dementsprechenden Temperaturen und Cycles eingestellt. (GAPDH: 62°C/ 25 cycles; PAI-1: 61°C/ 32 cycles)

Bei der PCR werden folgende Schritte durchlaufen:

- Initiale Denaturierung: die doppelsträngige cDNA wird durch Erhitzen auf 94°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Dauer: 3 Minuten)
- Denaturierung: bei 94°C (Dauer: 40 Sekunden)
- Annealing: es erfolgt eine Abkühlung auf die Primer-spezifische Temperatur (GAPDH: 62°C, PAI-1 61°C), damit diese an die DNA hybridisieren können (Dauer: 1 Minute)
- Elongation: der Zweitstrang wird durch die Anbindung der dNTPs bei 72°C (Temperaturoptimum der Taq Polymerase) gebildet (Dauer: 1 Minute)
- Finale Elongation (Dauer 5 Minuten)

Die entstandenen DNA-Fragmente werden danach mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung eines 1,5%igen Gels werden 0,6g Agarose mit 40ml 1x TBE-Buffer in einem Becherglas gemischt und anschließend in der Mikrowelle ca. 20 Sekunden aufgeköcht, um eine klare Lösung zu erhalten. Das Becherglas wird kurz geschwenkt, um Luftblasen zu entfernen. Die Lösung wird kurz abgekühlt und anschließend wird 20µl Ethidiumbromid (0,5mg/ml) hinzugefügt und das Becherglas nochmals kurz geschwenkt. Das flüssige Gel wird in einen Gelschlitten gegossen und ein 8-Well-Kamm wird hineingesteckt.

Nach ca. 30 Minuten ist das Gel fest und der Kamm kann entfernt werden. Der Gelschlitten wird in eine Elektrophoresekammer eingelegt, die mit 1x TBE gefüllt ist.

Für die Gelelektrophorese werden die Proben im Verhältnis 1:6 mit Loading Dye versetzt (15µl Probe und 3µl Loading Dye). Jeweils 15µl dieser Mischung werden in die Geltaschen pipettiert und anschließend bei 100V konstant (ca. 60mA) 20 min. lang aufgetrennt.

Danach werden die Banden, die unter UV-Licht fluoreszieren, im Transilluminator mit unterschiedlichen Belichtungszeiten fotografiert und mit der Software AlphaEaseFC Chemilmager 4400 sowie Prism 3.02 ausgewertet.

	Sequenz
GAPDH	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3' 5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'
PAI-1	5'-TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT-3' 5'-CGG TCA TTC CCA CGT TCT CTA-3'

Tabelle 7 Sequenzen der verwendeten sense/ anti-sense Primer

3.7 Wachstumstests

3.7.1 MTT-Test

3.7.1.1 Prinzip

Der MTT-Test misst die Lebensfähigkeit bzw. die Viabilität der Zellen nach der Inkubation mit bestimmten Substanzen. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Farbstoffs MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid in ein blaues wasserunlösliches Formazan (Mosmann 1983).

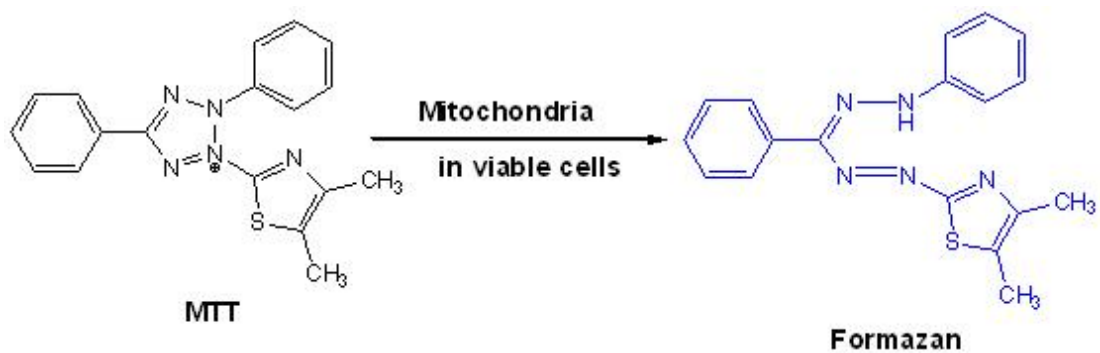


Abbildung 4 Reduktion des gelben MTT in das blaue Formazan (Mosmann 1983)

3.7.1.2 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid)	GERBU
---	-------

5x PBS 1000ml

40g NaCl

Roth

14,5g Na₂HPO₄ * 12 H₂O

MERCK

1g Kaliumhydrogenphosphat KH₂PO₄

MERCK

1g Kaliumchlorid KCl

MERCK

1M NaOH (pH-Wert Einstellung)	MERCK
Aqua dest. zum Auffüllen	
DMSO	MERCK
12-Well-Platten	Greiner
96-Well-Platten	Greiner
Plattenreader	Bio-Rad
Prism 3.02	GraphPad

50mg MTT werden in 10ml 1x PBS gelöst und filtriert. Diese Lösung wird bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

3.7.1.3 Ablauf

Nach der Inkubation in 12-Well-Platten für 1-3 Tage werden die Zellen 2x mit 1ml warmem 1x PBS gewaschen. Danach werden 0,5ml MTT pro Well hinzugefügt, das vorher 1:10 mit unkomplementiertem Medium verdünnt wurde. Die Zellen werden etwa eine halbe Stunde bei 37°C mit der MTT-Lösung inkubiert. Nach der halben Stunde werden die Zellen wieder 2x mit 1ml warmem 1x PBS pro Well gewaschen. Die blau gefärbten Zellen werden in 1ml DMSO aufgelöst. Von dieser Lösung werden je 3x 100µl von jedem Well in eine 96-Well-Platte überführt und anschließend bei 595nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels Prism 3.02.

3.7.2 Kristallviolett-Test

3.7.2.1 Prinzip

Durch den Kristallviolett-Test kann auf den Grad der Zellablösung nach der Behandlung mit Zink sowie den Inhibitoren U0126 und SB202190 rückgeschlossen werden.

3.7.2.2 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Crystalviolet Stock (2% in 20% Ethanol)

Glutaraldehyd (25%ige Lösung in Wasser) MERCK

5x PBS 1000ml

40g NaCl Roth

14,5g Na₂HPO₄ * 12 H₂O MERCK

1g Kaliumhydrogenphosphat KH₂PO₄ MERCK

1g Kaliumchlorid KCl MERCK

1M NaOH (pH-Wert Einstellung) MERCK

Aqua dest. zum Auffüllen

Isopropanol Neuber

Ethanol MERCK

12-Well-Platten Greiner

96-Well-Platten Greiner

Plattenreader Bio-Rad

Prism 3.02 GraphPad

3.7.2.3 Ablauf

Nach der Inkubation in 12-Well-Platten für 1 Tag werden die Zellen 2x mit 1ml 1x PBS/ Well gewaschen. Es kommt Glutaraldehyd für 10min bei 4°C auf die Zellen, um das Kristallviolett in der folgenden Behandlung der Zellen zu fixieren. Dieses wurde vorher 1:100 mit 1x PBS verdünnt. Nach den 10 min wird 3x mit 1ml Leitungswasser gewaschen. Danach werden 0,5ml Crystalviolet auf die Zellen gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Crystalviolet wird vorher 1:10 mit 1x PBS verdünnt. Anschließend wird wieder 3x mit je 1ml Leitungswasser gewaschen. Zum Schluss wird 1ml eines 1:1 Gemisches von Isopropanol und 50% Ethanol hinzugefügt. Nachdem sich alle Zellen gelöst

haben, werden je 3x 100µl pro Well in eine 96-Well-Platte übergeführt und bei 550nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels Prism 3.02.

3.8 Gelatine-Zymogramm

3.8.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

Page Blue Protein Staining Solution	Fermentas
-------------------------------------	-----------

Entfärbelösung 1000ml	
-----------------------	--

200ml Methanol	MERCK
----------------	-------

100ml Essigsäure	PROLABO
------------------	---------

Aqua dest. zum Auffüllen	
--------------------------	--

Washing Buffer 500ml (pH 7,5)	
-------------------------------	--

3g Tris-HCl	
-------------	--

400ml Aqua dest.	
------------------	--

HCl (pH-Wert Einstellung)	MERCK
---------------------------	-------

12,5ml Triton X100	MERCK
--------------------	-------

Aqua dest. zum Auffüllen	
--------------------------	--

Inkubations Buffer 1000ml (pH 7,5)	
------------------------------------	--

11,6g NaCl	Roth
------------	------

1,47g CaCl ₂	Roth
-------------------------	------

6g Tris-HCl	
-------------	--

HCl (pH-Wert Einstellung)	MERCK
---------------------------	-------

Aqua dest. zum Auffüllen	
--------------------------	--

Sample Buffer, 100µl	
----------------------	--

50µl Glycerol (87%)	MERCK
---------------------	-------

45µl 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	
-----------------------------	--

5µl Aqua dest.	
----------------	--

Bromphenolblau (einige Brösel)	MERCK
--------------------------------	-------

Gelatine	
----------	--

Prism 3.02	GraphPad
------------	----------

3.8.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung verläuft wie beim Western Blot. Es gibt nur eine Ausnahme: statt Mercaptoethanol enthält der Sample Buffer nur destilliertes Wasser. Das Verhältnis Probe zu Sample Buffer beträgt 4:1.

3.8.3 Beladung der Gele und Elektrophorese

Die Gelherstellung gleicht ebenfalls dem Western Blot, es werden allerdings noch 66µl Gelatine pro Gel hinzugefügt. Beladung und Elektrophorese laufen ebenfalls wie beim Western Blot ab. Die Elektrophorese dauert 90 min.

Nach der Elektrophorese wird das Gel aus der Apparatur genommen und in eine Plastischüssel gelegt, die mit Washing Buffer gefüllt ist. Es wird 3x 30min am Belly Dancer bei Stufe 3 gewaschen, wobei der Washing Buffer jedes Mal gewechselt wird. Anschließend wird das Gel 2x mit Aqua dest. gespült, um den Washing Buffer zu entfernen.

Als nächster Schritt wird dem Gel Inkubationsbuffer zugesetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird das Gel circa 90 Minuten mit der Färbelösung am Belly Dancer gefärbt. Anschließend wird das Gel wieder entfärbt. Es wird solange entfärbt, bis helle Banden auf einem dunkelblauen Hintergrund zu sehen sind. Die hellen Banden zeigen an, dass die Gelatine an diesen Punkten verbraucht wurde von den MMPs. Das Gel wird dann noch fotografiert und mittels AlphaEaseFC Chemilmager 4400 und Prism 3.02 ausgewertet.

3.9 Migrationstest oder Scratch-Test

3.9.1 Verwendete Geräte/ Materialien/ Substanzen

12-Well-Platten	Greiner
DMEM	BioWhittaker, Lonza
FCS	Gibco
L-Glutamin (200mM in 0,85% NaCl Solution)	BioWhittaker, Lonza
Penicillin/ Streptomycin (10 000 U/ml)	BioWhittaker, Lonza
Zinkchlorid	SIGMA
HCl	PROLABO

Die Zellen werden gleichmäßig in 12-Well-Platten ausgesetzt und in komplementiertem Medium fast bis zur vollständigen Konfluenz gezüchtet (ca. 2 Tage). Anschließend werden die Zellen mit einer gelben Pipettenspitze vorsichtig in der Mitte des Wells gescratched. Die Zellen werden 1x mit komplementiertem Medium gewaschen und es wird unter dem Mikroskop ein Foto gemacht.

Die Zellen werden nun mit verschiedenen Zinkkonzentrationen für 24h inkubiert. Nach den 24h wird unter dem Mikroskop wieder ein Foto gemacht, dann wird jeweils alle 24h ein Foto gemacht bis die Zellen wieder zusammengewachsen sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einleitung

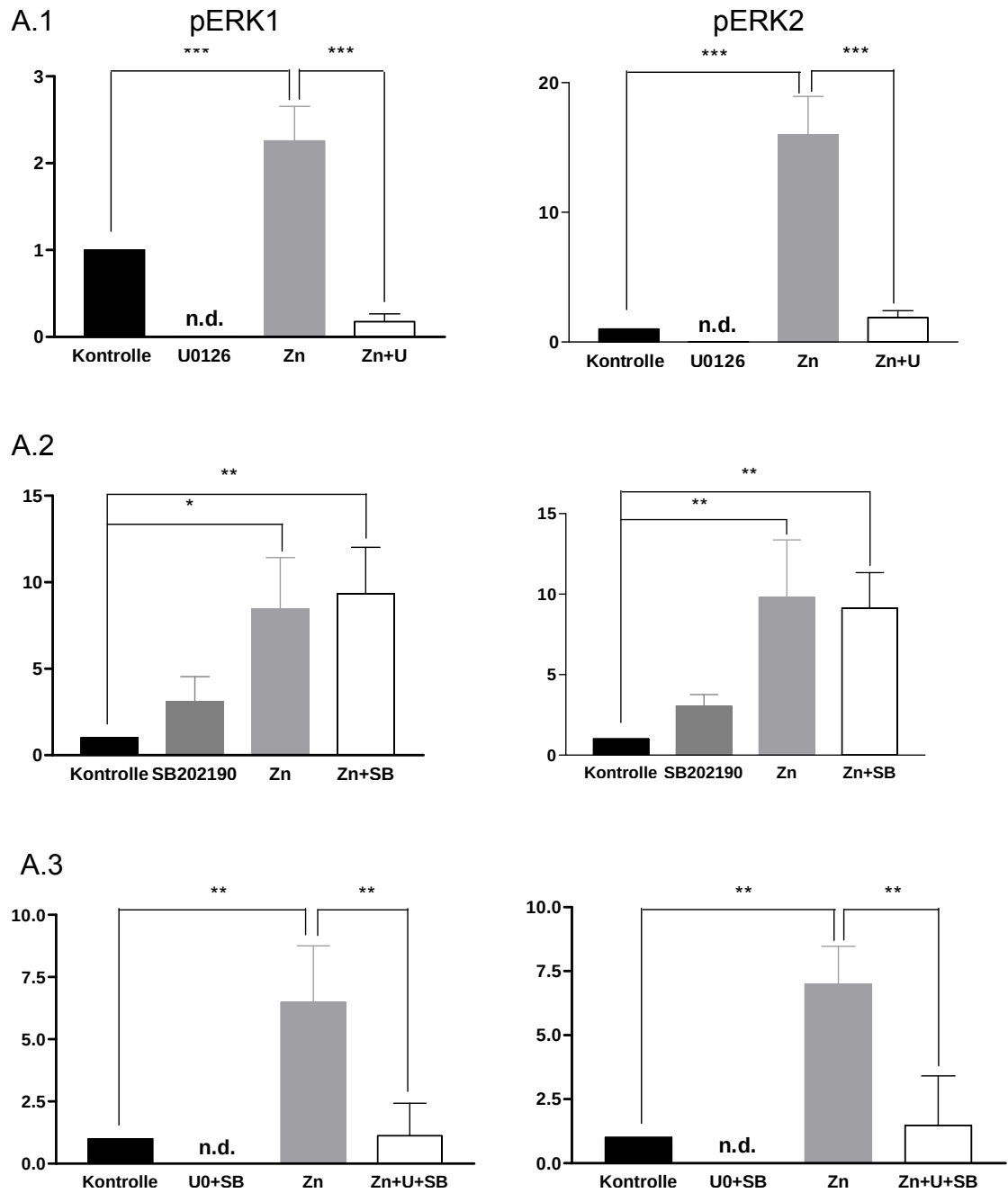
Unsere Arbeitsgruppe konnte in den letzten Jahren in unterschiedlichen Zelllinien, vor allem in der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo2, eine Stimulierung durch Zink auf den MAPK-Pathway feststellen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Beobachtungen auch auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zutrifft.

Des Weiteren wurde auch die Zink-induzierte Stimulierung des Gens PAI-1 untersucht und wie dieser Effekt mit der Zink-induzierten Stimulierung des MAPK-Pathway zusammenhängt. Dafür wurden mittels Western Blot und PCR die Level der Protein- und Genexpression analysiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen und Diagrammen zusammengefasst.

Es wurde außerdem untersucht, ab welcher Konzentration die Stimulierung durch Zink stattfindet. Des Weiteren wurde das Adhäsions- und Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren von pERK (U0126) und p-p38 (SB202190) sowie die Gelatinaseaktivität analysiert.

4.2 Aktivität verschiedener MAPK nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190

Zunächst wurde der Einfluss von Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 auf die Aktivität verschiedener MAPKinasen in MCF-7 Zellen untersucht. Es wurde analysiert, ob die Inhibitoren von phospho-ERK 1/2 und phospho-p38 spezifisch wirken und ob es eine Stimulierung durch Zink, in einer Konzentration von 100µM, in MCF-7 Zellen gibt, die davor bereits in anderen Zelllinien festgestellt wurde (Ostrakhovitch and Cherian 2005).



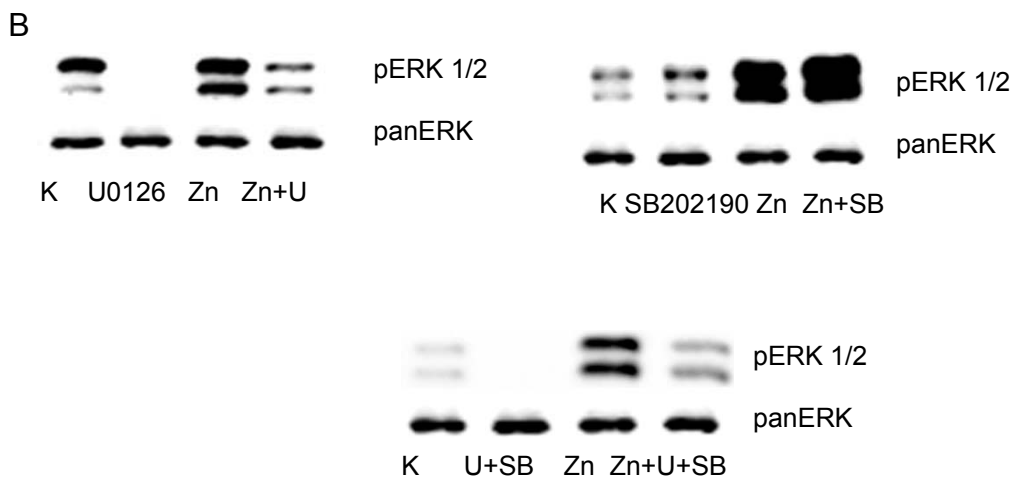


Abbildung 5 Effekt von Zink (100 μ M) und den Inhibitoren U0126 (10 μ M) und SB202190 (2 μ M) auf pERK1/2 in MCF-7 Zellen gemessen nach 4-stündiger Inkubation mittels Western Blot. A: Grafische Darstellung der Wirkung auf pERK1/2 durch U0126 und Zink (A.1), SB202190 und Zink (A.2) und U0126, SB202190 und Zink (A.3). Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA-Test und Bonferroni's Multiple Comparison Test (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). B: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Signale von pERK1 und pERK2 nach 4-stündiger Inkubation mit Zink (100 μ M). panERK wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Abbildung 5.A1 zeigt einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von pERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit 100 μ M Zink, während der pERK-Inhibitor U0126 die Phosphorylierung der Proteine vollständig hemmt. Auch die Stimulierung durch Zink wird durch Zugabe von U0126 rückgängig gemacht und die Aktivität von pERK 1/2 fällt in diesem Fall sogar unter Kontrollniveau. Dagegen hat der p-p38-Inhibitor SB202190 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von pERK 1/2 und dessen Stimulierung durch Zink, was für die Sensitivität des Inhibitors spricht (Abbildung 5.A2). Bei der Inkubation mit beiden Inhibitoren (Abbildung 5.A3) zeigt sich wieder ein ähnliches Bild wie bei der Inkubation alleine mit U0126. pERK 1/2 wird durch die Inhibitoren wieder gehemmt und auch die Stimulierung durch Zink wird rückgängig gemacht.

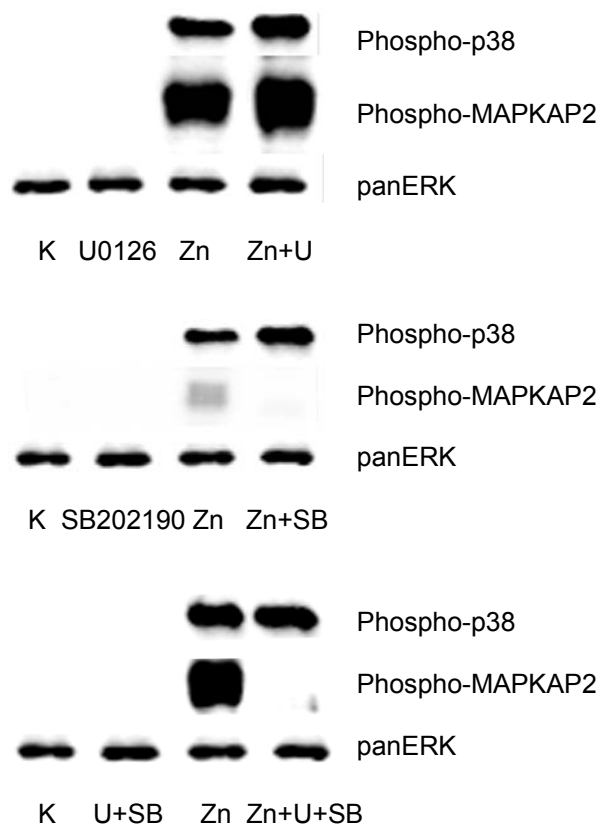


Abbildung 6 Repräsentative Abbildungen von 3 unabhängigen Experimenten der Western Blot Signale von phospho-p38 und phospho-MAPKAP2 nach 4-stündiger Inkubation mit Zink (100µM) und den Inhibitoren U0126 (10µM) und SB202190 (2µM). panERK wurde als Ladekontrolle verwendet.

In Abbildung 6 wird die Wirkung von SB202190 ersichtlich. Die phospho-p38 Banden sind bei der Kontrolle und der Inkubation mit den Inhibitoren kaum erkennbar, da es vor allem durch Stressfaktoren aktiviert wird. Bei der Zink-Stimulation sind hingegen deutliche Banden erkennbar.

Da die Inhibierung von phospho-p38 erst eine Ebene unterhalb ersichtlich ist, wurde auch pMAPKAP2 analysiert, um die Wirkungen der Inhibitoren auf phospho-p38 zu untersuchen. pMAPKAP2 wird direkt durch p-p38 reguliert. Es liegt in der MAPK-Kaskade downstream von p38. Auch das pMAPKAP2-Protein ist ohne Zink-Stimulierung nur schwach erkennbar. Es ist aber gut erkennbar, dass der Inhibitor von pERK 1/2 U0126 keine Auswirkungen auf die Aktivität von pMAPKAP2 hat. Dagegen wird die Stimulation durch Zink mit SB202190 vollständig wieder rückgängig gemacht. Bei der Inkubation mit beiden

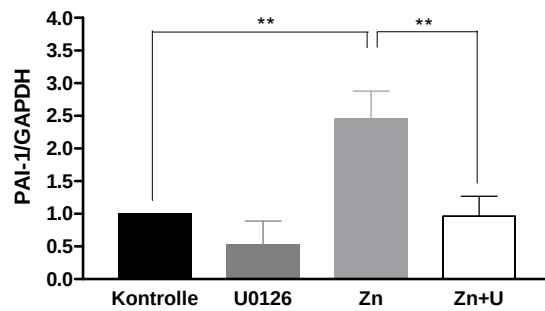
Inhibitoren zeigt sich das gleiche Bild. Wegen der fehlenden Kontrollbande konnte auch keine statistische Auswertung erfolgen.

Aufgrund dieser deutlichen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibitoren U0126 und SB202190 wirklich nur spezifisch bei ihren Proteinen wirken und keinen Einfluss auf die jeweils andere MAPKs haben. Außerdem konnte eine signifikante Stimulation durch Zink auf die untersuchten MAPK nachgewiesen werden.

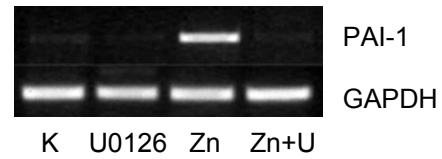
4.3 Expression des Gens PAI-1 in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190

Als nächstes wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Stimulierung der MAPKs und dem Gen PAI-1 gibt, das ebenfalls von Zink stimuliert werden kann, wie bereits in unserer Arbeitsgruppe anhand von CaCo2 Zellen nachgewiesen werden konnte.

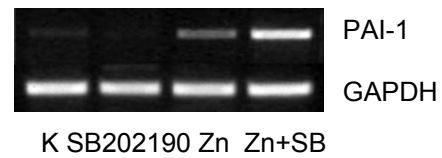
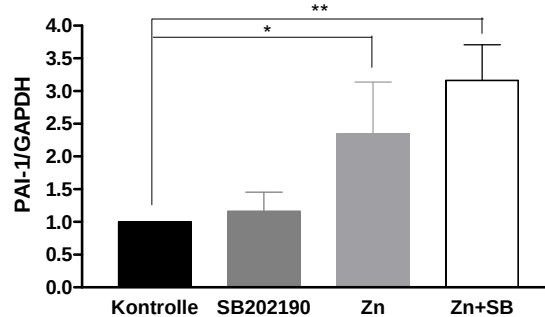
A.1



B



A.2



A.3

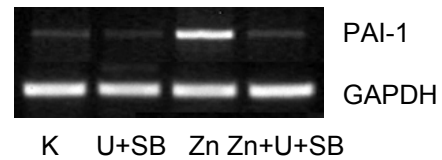
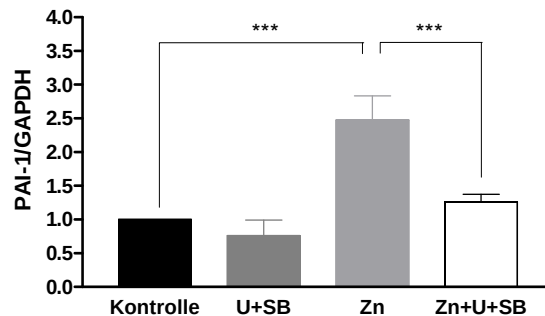


Abbildung 7 Einfluss von Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 nach 4-stündiger Inkubation auf die Genexpression von PAI-1 in MCF-7 Zellen mittels PCR.

A: Grafische Darstellung der PAI-1 Stimulierung durch Zink (100µM) und U0126 (10µM) (A.1), Zink und SB202190 (2µM) (A.2) und Zink, U0126 und SB202190 (A.3). Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA-Test und Bonferroni's Multiple Comparison Test (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

B: Repräsentative Abbildungen der PAI-1 Stimulierung durch Zink, U0126 und SB202190. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

In Abbildung 7 zeigt sich bezüglich der Effekte ein sehr ähnliches Bild zu jenen Western Blots mit pERK 1/2 (siehe Abbildung 5.A1). Es gibt eine signifikante Steigerung der PAI-1 Expression durch Zink in einer Konzentration von 100µM. Des Weiteren bewirkt eine Inhibierung von pERK 1/2 durch U0126 einen signifikanten ($p < 0,01$) Abfall der Zink-Stimulierung, etwa auf Kontrollniveau zurück, während der Inhibitor von phospho-p38 keinen Einfluss auf die Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1 zeigt.

Beide Inhibitoren gemeinsam zeigen das gleiche Bild, wie nur U0126 alleine. Anhand dieser Ergebnisse und denen des Western Blots kann man davon ausgehen, dass Zink die PAI-1 Expression über den ERK-Pathway reguliert.

4.4 Expression des Gens PAI-1 in Abhängigkeit der Zink-Konzentration

Um zu untersuchen ab welcher Zink-Konzentration die Stimulierung des Gens PAI-1 beginnt, wurde ein Konzentrationsverlauf durchgeführt. Im Plasma kommt Zink üblicherweise in Konzentrationen zwischen 10 und 20µM vor (Holtkamp, Thiery et al. 1990). Deswegen ist es von Bedeutung, ab welcher Konzentration eine Stimulation von PAI-1 vorliegt. In diesem Versuch wurden Konzentrationen zwischen 10 und 200µM gewählt.

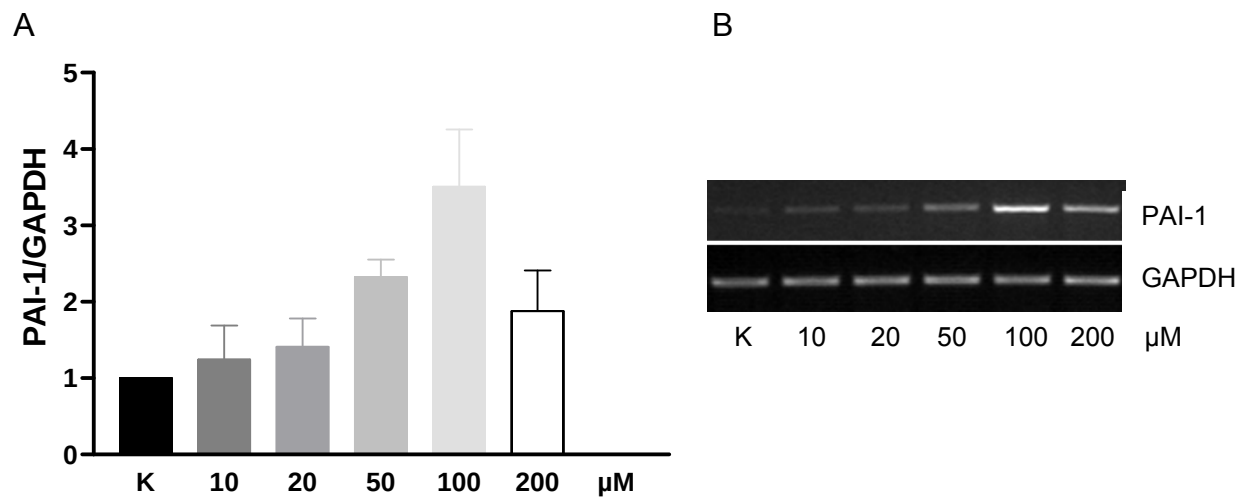


Abbildung 8 Expression von PAI-1 nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Zink-Konzentrationen gemessen mittels PCR.

A: Grafische Darstellung der mRNA-Expression von PAI-1 bei Zink-Konzentrationen von 10-200µM. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

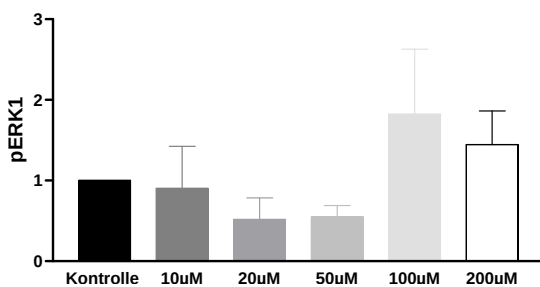
B: Repräsentative Abbildung der PAI-1 Stimulierung durch verschiedene Zink-Konzentrationen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich ist, erfolgt eine Stimulierung der PAI-1 Expression durch Zink ab etwa 50µM. Im Vergleich zur Kontrolle steigt die Expression etwa um das Doppelte an. Bei 10 und 20µM Zink ist, wenn überhaupt nur eine sehr schwache Stimulation erkennbar. Bei 100µM ist die stärkste Stimulierung durch Zink erreicht. Die Expression von PAI-1 steigt circa um das 3,5fache im Vergleich zur Kontrolle an. Bei 200µM Zink gibt es wieder einen Abfall ungefähr auf das Niveau bei 50µM Zink. Das ist eventuell auch dadurch erklärbar, dass für MCF-7 Zellen diese Konzentration bereits toxisch wirkt (siehe Abbildung 13).

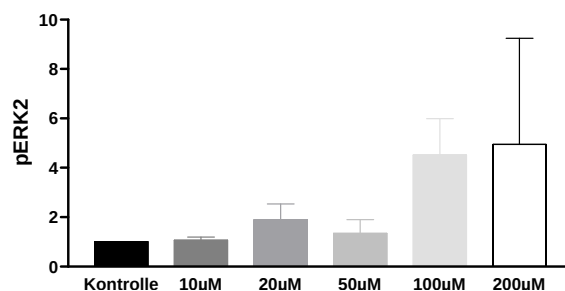
4.5 Aktivität der MAPKinasen in Abhängigkeit der Zink-Konzentration

Der gleiche Versuch wurde auch für die Phosphorylierung der MAPKs durchgeführt, um zu sehen ab welcher Konzentration von Zink hier die Stimulation beginnt.

A.1



A.2



B

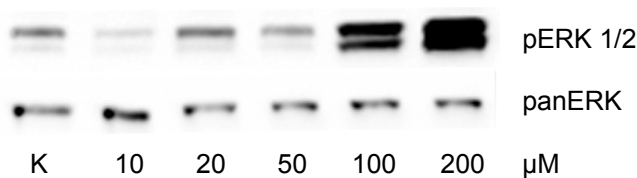


Abbildung 9 Western Blot Signale von pERK1 und pERK2 bei verschiedenen Zink-Konzentrationen nach 4-stündiger Inkubation.

A: Grafische Darstellung des Konzentrationsverlaufs von pERK1 (A.1) und pERK2 (A.2) bei Zink-Konzentrationen von 10-200μM. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt.

B: Repräsentative Abbildung der Stimulierung von pERK1/2 durch verschiedene Zink-Konzentrationen. panERK wurde als Ladekontrolle verwendet.

Wie in Abbildung 9 gezeigt wird, ist erkennbar, dass es eine Stimulierung erst ab 100μM Zink gibt, die im Vergleich zur Kontrolle in etwa 100% bei pERK1 und 400% bei pERK2 beträgt. Ebenfalls eine starke Stimulation von pERK 1/2

bewirkt eine Zink-Konzentration von 200µM. Diese ist etwa gleich stark ausgeprägt wie jene bei 100µM Zink.

Bei den niedrigeren Konzentrationen von Zink im Bereich zwischen 10 und 50µM ist allerdings keine genaue Aussage möglich, da es große Schwankungen gibt. Der Grund dafür ist nicht genau bekannt. Es ist daher auch keine genaue Aussage möglich ab welcher Konzentration von Zink die Stimulierung von pERK 1/2 in MCF-7 Zellen beginnt.

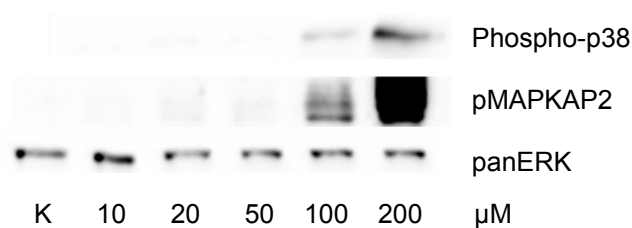


Abbildung 10 Repräsentative Abbildungen von 3 unabhängigen Experimenten der Western Blot Signale von phospho-p38 und pMAPKAP2 nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Zink-Konzentrationen (10-200µM). panERK wurde als Ladekontrolle verwendet.

In Abbildung 10 wird der Einfluss der verschiedenen Zinkkonzentrationen auf phospho-p38 und phospho-MAPKAP2 gezeigt. Hier wird ersichtlich, dass bei phospho-p38 erst ab 100µM eine Stimulierung durch Zink erfolgt. Bei 200µM Zink wird die Stimulation noch stärker. Das liegt eventuell daran, dass phospho-p38 vor allem durch Stress (Johnson and Lapadat 2002; Raman, Chen et al. 2007), wie es bei dieser Zink-Konzentration für die MCF-7 Zellen der Fall ist, aktiviert wird.

Die Phosphorylierung von pMAPKAP2 zeigt ein ähnliches Bild. Hier ist zwar bereits bei 20µM eine Bande erkennbar, aber eine deutliche Stimulierung durch Zink erfolgt erst bei 100 und 200µM. Bei 200µM ist wie schon zuvor bei phospho-p38 nochmals eine Steigerung sichtbar. Da keine Kontrollbande sichtbar wurde, konnte weder bei phospho-p38 noch bei pMAPKAP2 eine statistische Auswertung erfolgen.

4.6 MTT-Test

Im folgenden Experiment wurde beobachtet wie sich Zink in einer Konzentration von 150µM in Anwesenheit oder Abwesenheit der Inhibitoren U0126 und SB202190 auf die Zellproliferationsrate auswirkt. Es wurde Zink in einer Konzentration von 150µM gewählt, da durch vorherige Versuche unserer Arbeitsgruppe mit CaCo2 Zellen bekannt ist, dass bei dieser Konzentration bereits ein Zell-Detachment stattfindet, während 100µM Zink darauf noch keinen Einfluss ausübt.

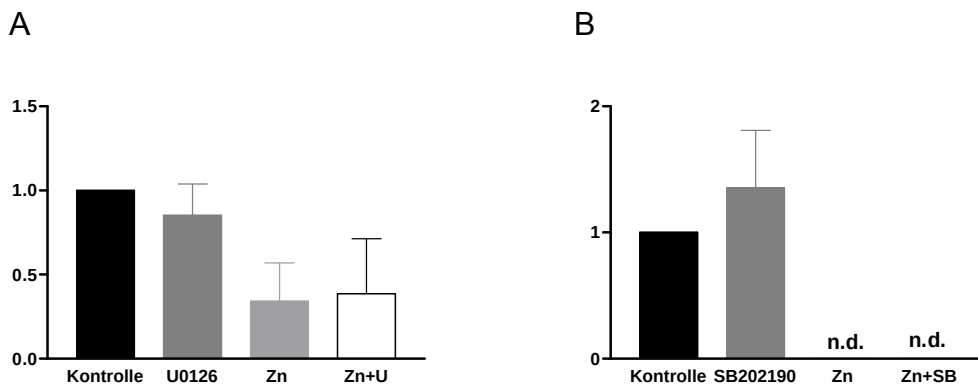


Abbildung 11 MTT-Test nach 24-stündiger Inkubation mit 150µM Zink und den Inhibitoren U0126 (10µM) (A) und SB202190 (2µM) (B).

Grafische Darstellung des MTT-Tests. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte nach Abzug des Leerwerts von DMSO und die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt. (n.d.=not detectable)

In Abbildung 11 werden die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt. Während die Inhibitoren U0126 und SB202190 keinen Einfluss auf die Proliferation haben, ist die Abnahme durch 150µM Zink sehr deutlich. In der grafischen Darstellung A erfolgt eine Abnahme der Proliferation um circa 50%, ebenfalls bei Zink gemeinsam mit dem Inhibitor U0126. Der Inhibitor hat also keinen Einfluss auf die Proliferation.

In der grafischen Darstellung B erfolgt nach der Inkubation mit 150µM Zink sogar ein vollständiges Detachment der MCF-7 Zellen. Auch hier hat der Inhibitor SB202190 keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

4.7 Adhäsionstest mittels Kristallviolett

Der Kristallviolett-Test lässt Rückschlüsse auf den Grad der Zellablösung der MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 zu.

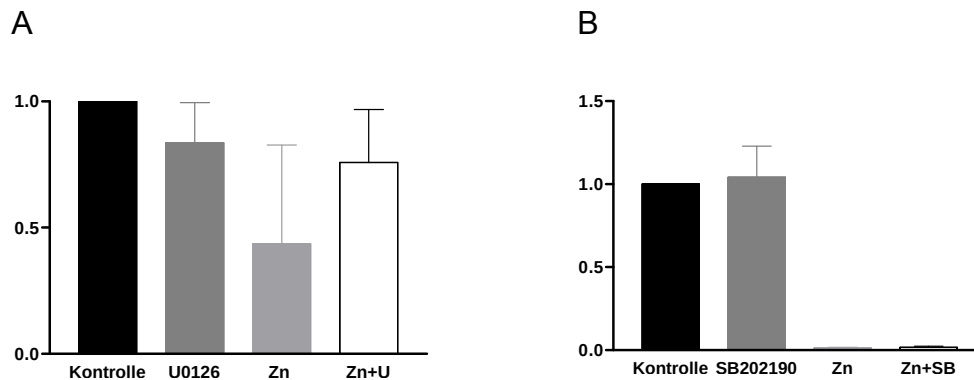
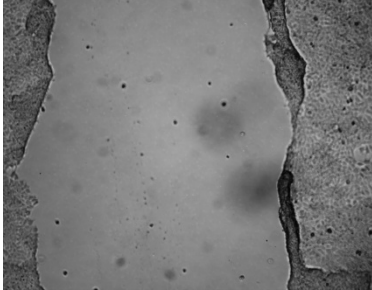


Abbildung 12 Kristallviolett-Test nach 24-stündiger Inkubation mit 150µM Zink und den Inhibitoren U0126 (10µM) und SB202190 (2µM).

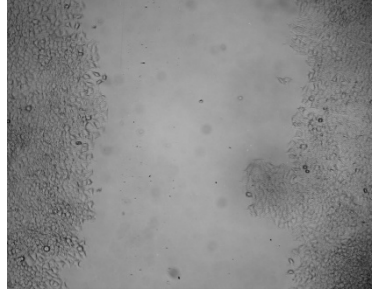
Grafische Darstellung der Zellablösung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte nach Abzug des Leerwerts von einer 1:1 Mischung von Isopropanol und 50% Ethanol und die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt.

In Abbildung 12 wird der Grad der Zellablösung von MCF-7 Zellen nach der 24-stündigen Inkubation mit 150µM Zink und den Inhibitoren U0126 und SB202190 dargestellt. Das Ergebnis ist nicht eindeutig interpretierbar. Es ist zwar eine deutliche Zellablösung durch Zink erkennbar, allerdings ist die Schwankungsbreite sehr groß. Aufgrund dieses Ergebnisses ist kein Rückschluss bezüglich der Zellablösung durch Zink und die Inhibitoren möglich.

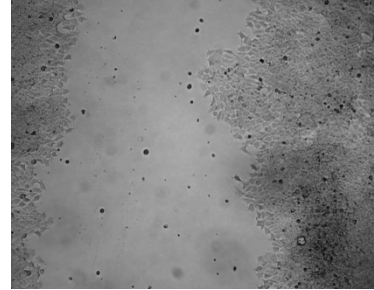
4.8 Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen unter verschiedenen Zink-Konzentrationen



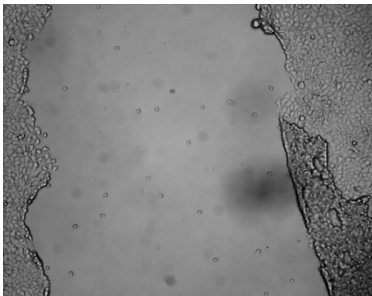
Kontrolle 0h



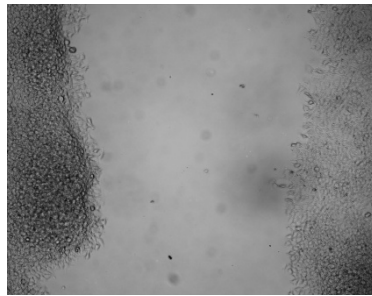
Kontrolle 24h



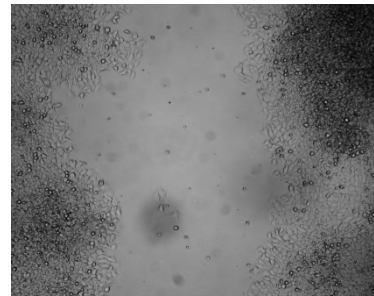
Kontrolle 48h



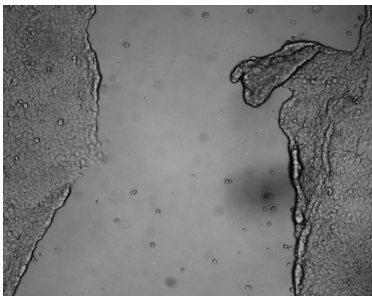
10µM Zink 0h



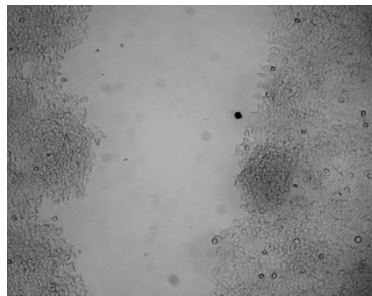
10µM Zink 24h



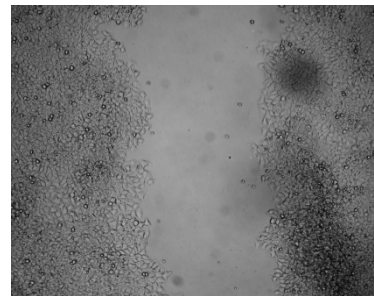
10µM Zink 48h



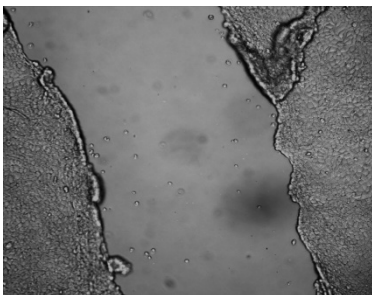
20µM Zink 0h



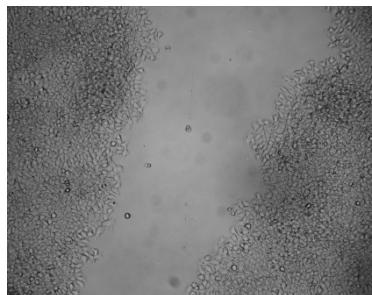
20µM Zink 24h



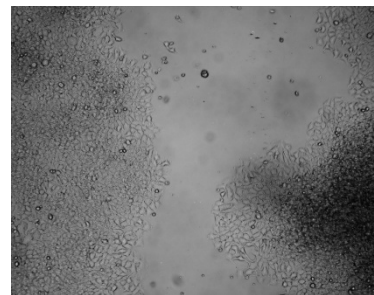
20µM Zink 48h



50µM Zink 0h



50µM Zink 24h



50µM Zink 48h

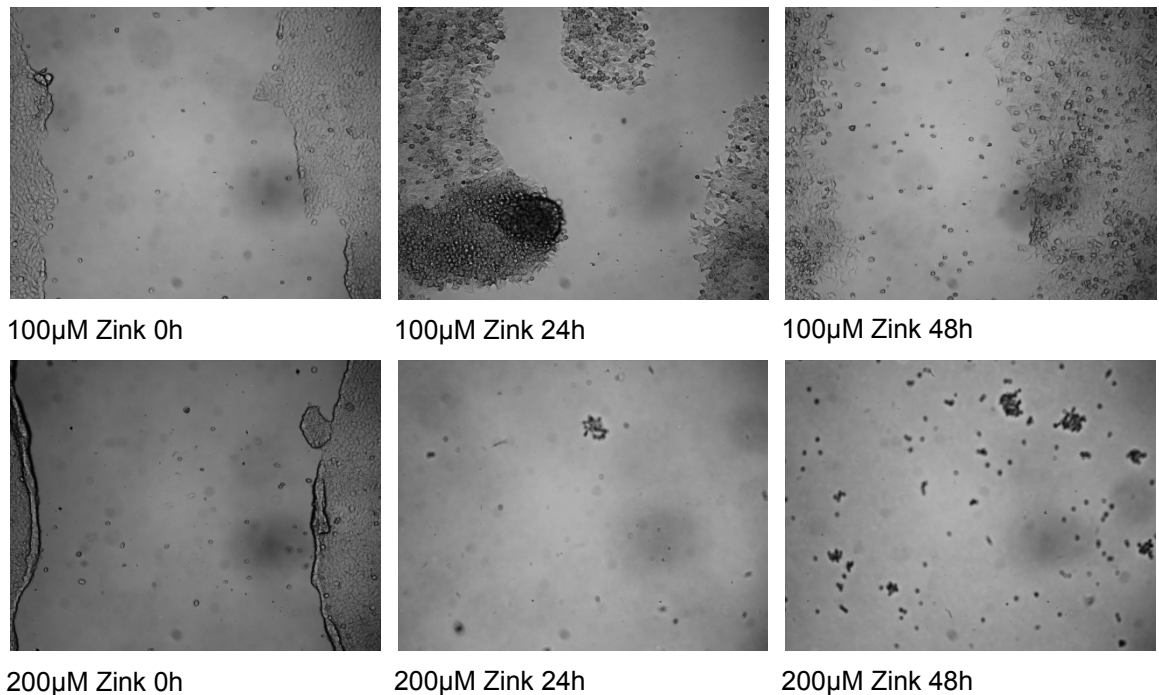
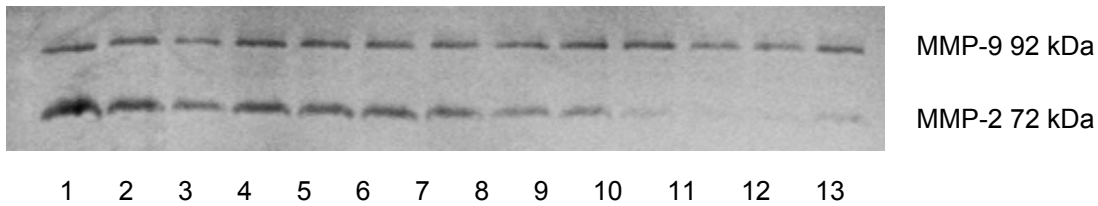


Abbildung 13 Mikroskopische Darstellung von MCF-7 Zellen nach einem Scratch mit einer gelben Pipettenspitze und Inkubation mit verschiedenen Zink-Konzentrationen im Zeitverlauf (0-48h) unter 100-facher Vergrößerung.

Anhand dieser mikroskopischen Darstellung von MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Zink-Konzentrationen (10-200 μ M) inkubiert wurden, lässt sich kein unterschiedliches Migrationsverhalten durch die Zink-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Lediglich bei 200 μ M Zink ist ersichtlich, dass die Zellen absterben, da diese Zink-Konzentration zu hoch und damit toxisch für sie ist. Es sind weitere Versuche notwendig.

4.9 Zymogramm



Legende:

- 1...DMEM mit 10% FCS
- 2...Kontrolle
- 3...U0126
- 4...Zink 100µM
- 5...Zink+U0126
- 6...Kontrolle
- 7...SB202190
- 8...Zink 100µM
- 9...Zink+SB202190
- 10...Zink 20µM
- 11...Zink 50µM
- 12...Zink 100µM
- 13...Zink 150µM

Abbildung 14 Gelatinase-Zymogramm mit dem Zellkulturüberstand von MCF-7 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Zinkkonzentrationen (20-150µM) und den Inhibitoren U0126 (10µM) und SB202190 (2µM). Als Bezugsgröße wurde DMEM mit 10% FCS aufgetragen.

In Abbildung 14 wurde die relative Gelatinase-Aktivität der MCF-7 Zellkulturüberstände aus den Wachstumstests (2 Tage Inkubation) bestimmt. Um die Gelatinase-Aktivität des Mediums mit 10% FCS alleine zu erfassen, wurde dieses als Bezugsgröße ebenfalls aufgetragen. Es gibt keinen messbaren Aktivitätsunterschied zwischen dem Zellkulturüberstand und dem Medium. Es erscheinen schwach erkennbare Banden durch proteolytische Vorgänge der Enzyme, die in 10% FCS enthalten sind. Das et al. beschrieben ebenfalls keine messbare Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in MCF-7 Zellen (Das, Banerji et al. 2008).

5 DISKUSSION

Zink-induzierte Stimulierung der Expression verschiedener MAPK und des Gens PAI-1 in MCF-7 Zellen

Sowohl Zink als auch die MAPKinasen und PAI-1 sind regulatorisch an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt. Das Ziel dieser Arbeit war es mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren aufzuzeigen und näher zu untersuchen. Die Vermittlung der Degradierung der Extrazellulären Matrix (ECM), sowie die Anregung der Zellmigration und die Kontrolle der Zelladhäsion sind wichtig für eine beginnende Invasion und Metastasis (Duffy and Duggan 2004). MAPKinasen sind im Allgemeinen ein wichtiges regulatorisches Signal bei Brustkrebs (Ostrakhovitch and Cherian 2005). Der PAI-1 Level ist einer der informativsten biochemischen Prognosemarker (Durand, Bodker et al. 2004). Das uPA-System stellt der Zelloberfläche lokal proteolytisches Potential bereit (Andreasen, Egelund et al. 2000) und diese proteolytische Aktivität von uPA wird von dem schnellen und spezifischen Inhibitor PAI-1 reguliert (Durand, Bodker et al. 2004). Eine erhöhte Expression von PAI-1 und anderen Komponenten des uPA-Systems sichert Brustkrebszellen einen Überlebensvorteil, indem es die Adhäsion reguliert und die Tumorangiogenese und die Zellmigration steigert (Beaulieu, Whitley et al. 2007).

Die Ergebnisse der Western Blot- und PCR-Analysen zeigen eine deutliche Stimulierung der MAPKinasen pERK 1, pERK 2 sowie p-p38, als auch des Gens PAI-1 durch Zink. Ostrakhovitch und Cherian konnten ebenfalls zeigen, dass sowohl Kupfer als auch Zink ERK 1 und 2 in MCF7 und MCF7-E6 Zellen aktivieren können (Ostrakhovitch and Cherian 2005). Ostrakhovitch und Cherian verwendeten in ihren Versuchen CuSO_4 sowie ZnSO_4 jeweils in Konzentrationen von 10 und $25\mu\text{M}$ (Ostrakhovitch and Cherian 2005). In den Versuchen dieser Arbeit wurde eine ZnCl_2 -Konzentration von $100\mu\text{M}$

verwendet. Der Zusatz von Zink steigerte auch Viabilität der Brustkrebszelllinie MCF-7 (Ostrakhovitch and Cherian 2005). Somit kann Zink offenbar mitogene Pathways beeinflussen, die spezifisch die Zellproliferation steuern (MacDonald 2000), und somit an der Tumorprogression beteiligt sind. Die Zink-induzierte Stimulierung des MAPK-Pathway und somit die Beteiligung von Zink an der Aktivierung von MAPKinasen konnte anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigt werden, allerdings erst bei höheren Konzentrationen. Die Beteiligung von ERK an der Tumorzellproliferation und Progression konnte bereits durch mehrere Studien in verschiedenen Tumorarten bewiesen werden (Sebolt-Leopold and Herrera 2004).

Auch die PAI-1 mRNA-Expression wurde von 100µM Zink signifikant stimuliert. Ein Rückgang der Stimulierung konnte durch die Inhibierung von pERK 1/2 beobachtet werden, wohingegen durch die Inhibierung von p-p38 kein Effekt feststellbar war. Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots und PCR-Analysen deuten also auf einen engen Zusammenhang zwischen der Zink-induzierten Stimulierung von PAI-1 und dem ERK-Pathway hin. Vermutlich wird PAI-1 über pERK von Zink reguliert, wohingegen p-p38 hier keine Rolle spielen dürfte.

Des Weiteren wurde untersucht, ab welcher Konzentration von Zink diese Aktivierung der ausgewählten MAPKinasen sowie von PAI-1 beginnt. Da Zink im Plasma üblicherweise in einer Konzentration von 10-20µM (Holtkamp, Thiery et al. 1990) vorkommt, ist es von entscheidender Bedeutung herauszufinden ab welcher Menge Zink diese Stimulierung und damit der Mechanismus zwischen PAI-1 und dem ERK-Pathway ausgelöst wird. Daher wurden für diese Untersuchungen Konzentrationen zwischen 10 und 200µM gewählt. Eine eindeutige Stimulierung von PAI-1 durch Zink beginnt bei circa 50µM. Allerdings erfolgt schon ab 10µM eine tendenzielle Aktivierung. Diese ist im Vergleich mit dem Kontrollniveau allerdings noch etwas zu gering, um signifikant sagen zu können, dass hier schon eine Stimulierung vorliegt. Die stärkste Stimulierung wird bei 100µM Zink erreicht, wie es auch in den zuvor durchgeführten

Versuchen eingesetzt wurde. Hier steigt die Expression von PAI-1 im Vergleich zur Kontrolle um circa das 3,5fache an.

Auch auf der Signalebene wurden diese Versuche durchgeführt. In Bezug auf pERK 1 und 2 ist die Stimulierung nur bei 100µM und 200µM Zink eindeutig erkennbar. Es kann also im Fall dieser beiden MAPKinasen keine genaue Aussage getroffen werden, ab welcher Konzentration die Aktivierung genau beginnt. Weitere Versuche sind notwendig. Allerdings ist sowohl bei pERK 1 und 2 als auch bei PAI-1 bei 100µM Zink eine eindeutige Stimulierung zu erkennen. Dies könnte vermuten lassen, dass im Bezug auf die Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1 die Regulierung mit dem ERK-Pathway erst ab dieser Konzentration einsetzt. Davor wäre es möglich, dass der ERK-Pathway noch keinen Einfluss ausübt. Dies müsste allerdings noch genauer untersucht werden, da das Ergebnis von pERK 1/2 auf der Signalebene, außer der eindeutigen Stimulierung durch Zink ab einer Konzentration von 100µM, keine genaue Schlüsse zulässt. Eindeutiger ist das Ergebnis im Fall von p-p38. Hier ist deutlich erkennbar, dass die signifikante Stimulierung durch Zink sowohl bei p-p38 als auch bei MAPKAP2 erst bei 100µM Zink einsetzt. Es sollten auf jeden Fall noch genauere Untersuchungen durchgeführt werden, um sich ein abschließendes Bild machen zu können. MacDonald konnte zeigen, dass der Zusatz von physiologischen Konzentrationen von Zink zu 3T3 Fibroblasten die MAPK-Aktivität steigert (MacDonald 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen allerdings vermuten, dass die Stimulierung von PAI-1 und den MAPKinasen pERK1, pERK2 und p-p38 durch Zink erst bei deutlich höheren als den üblichen physiologischen Konzentrationen einsetzen.

Es konnte bereits in Tierversuchen gezeigt werden, dass Zink in N-Methyl-N-Nitrosurea-induzierten Drüsentumoren bei Ratten akkumuliert werden kann (Lee, Woo et al. 2003; Lee, Simpson et al. 2004). Die Zink-Konzentrationen waren in diesen Tumoren 12mal höher als normal (Lee, Woo et al. 2003). Auch einige humane Studien konnten erhöhte Zink-Konzentrationen in Brustkrebsgewebe nachweisen (Mulay, Roy et al. 1971; Margalioth, Schenker et al. 1983; Rizk and Sky-Peck 1984). So könnte es durchaus der Fall sein,

dass im Brustkrebsgewebe derart hohe Zink-Konzentrationen erreicht werden könnten. Es sind auf jeden Fall noch genauere klinische Untersuchungen dafür nötig.

Adhäsions- und Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen nach einer Behandlung mit Zinkchlorid

Mögliche Mechanismen, durch die PAI-1 an der Krebsausbreitung mitwirken kann, inkludieren die Verhinderung der exzessiven Degradierung der ECM, die Änderung der Zelladhäsion (Loskutoff, Curriden et al. 1999), sowie eine Beteiligung an der Angiogenese (Bajou, Noel et al. 1998) und die Stimulierung der Zellproliferation (Webb, Thomas et al. 2001). Deswegen wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von Zink und der MAPKs pERK 1/2 und p-p38 auf Proliferation, Adhäsion und Migration von MCF-7 Zellen untersucht. Für die Versuche wurde eine Zinkkonzentration von 150µM gewählt, da bei dieser Konzentration bereits ein Zell-Detachment beginnt, während 100µM Zink noch keine Auswirkungen auf die Zellablösung hat. Der MTT-Test deutet darauf hin, dass weder pERK1/2 noch p-p38 einen Einfluss auf die Proliferation haben, allerdings erfolgt durch Zink eine signifikante Hemmung der Proliferation. Jeng et al. konnten hingegen zeigen, dass Inhibitoren von MAPK das Wachstum von LTED-MCF7 Zellen blockieren, was eine Rolle des MEK/ERK-Pathway in der Zellproliferation vermuten lässt. Allerdings wurde den verwendeten Zellen für längere Zeit Estradiol entzogen (LTED) (Jeng, Yue et al. 2000). Somit kann kein direkter Vergleich stattfinden. In LTED-Zellen scheint der MAPK-Pathway vermutlich eine Rolle in der Zellproliferation und einer gesteigerten DNA-Synthese zu haben (Jeng, Yue et al. 2000), während in unbehandelten MCF-7 Zellen dieser Zusammenhang nicht zu bestehen scheint.

Die Zellablösung, die mittels Kristallviolett-Test untersucht wurde, zeigte nach 24-stündiger Inkubation mit 150µM Zinkchlorid und den Inhibitoren U0126 und SB202190 kein eindeutiges Ergebnis. Es ist zwar deutlich erkennbar, dass Zink in dieser Konzentration zu einem Zell-Detachment führt, die

Schwankungsbreite ist aber sehr hoch. Die Hemmung von phospho-p38 scheint keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten auszuüben, während es möglich sein könnte, dass eine Inhibierung von pERK1/2 sehr wohl zu einer höheren Überlebensrate führen könnte. Wie schon erwähnt, können allerdings keine genauen Schlüsse aus diesen Ergebnissen gezogen werden, da die Schwankungsbreite einfach zu hoch ist. Hier darf man von künftigen Untersuchungen noch interessante Ergebnisse erwarten.

Die prinzipiellen Mechanismen, die für die Krebsmalignität verantwortlich sind, sind die Migration und die Invasion. Durch diese können sich primäre Krebszellen ausbreiten und an einer entfernten Stelle zu einem sekundären Tumor heranwachsen (Yang, Kuo et al. 2011). Zellmigration ist ein komplexer Prozess, für den mehrere Schritte erforderlich sind, darunter intrazelluläre Signalübertragung, Zelladhäsion, zytoskeletale Reorganisation, Zelldetachment und das Recycling von Zelloberflächenrezeptoren (Stossel 1994; Murphy and Gavrilovic 1999; Webb, Parsons et al. 2002). Dafür bedarf es der Mitwirkung einer Vielzahl von biologischen Prozessen (Bretscher 1984; Murphy and Gavrilovic 1999), wobei das uPA-System eine bedeutende Rolle spielt (Andreasen, Kjoller et al. 1997).

Das Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen in Reaktion auf Zinkkonzentrationen zwischen 10 und 200µM wurde mittels Migrations- bzw. Scratch-Test untersucht. Diese Versuche zeigten keine Auswirkungen auf die Migration von MCF-7 Zellen durch Zink, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Lediglich bei 200µM Zink konnte man eine komplette Zellablösung feststellen, die dadurch erklärbar ist, dass diese Konzentration toxisch auf die Zellen wirkt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden auch keine Versuche mit den Inhibitoren von pERK 1/2 und p-p38 durchgeführt, da unter diesen Bedingungen keine Veränderungen oder Einflüsse zu erwarten waren.

Es wurde bereits gezeigt, dass vor allem die Interaktion von MMPs und dem uPA-System entscheidend ist, damit Krebszellen migrieren und die ECM durchbrechen können, sowie um das Eintreten von diesen Zellen in

Lymphsysteme und Blutgefäße für die Bildung von Metastasen zu ermöglichen (Look, van Putten et al. 2003). Die Messung der Gelatinase-Aktivität, mittels Zymogramm, zeigte, dass die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 keine Aktivität in MCF-7 Zellen zeigen wie das auch schon Das et al. beschrieben haben (Das, Banerji et al. 2008). Erst nachdem 20µg Fibronectin zu den Zellen zugegeben wurde, erschienen die charakteristischen Gelatinase-Banden (Das, Banerji et al. 2008).

Daniele et al. fanden, dass die Gelatinase-Expression in metastasierenden Brustkrebszellen signifikant höher war im Vergleich zu nicht-metastasierenden Brustkrebszellen und der Kontrollgruppe, was sowohl durch die Untersuchung der Lymphknoten als auch des Serums bestätigt wurde (Daniele, Zito et al. 2010). Da MCF-7 Zellen nicht-metastasierende Zellen sind, könnte diese Beobachtung eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in den Versuchen dieser Arbeit keine messbare Gelatinase-Aktivität mittels Zymogramm der MMPs 2 und 9 messbar war. Trotzdem können diese proteolytischen Marker in malignen Tumoren zur Bestimmung von Wachstum, Invasion und Metastasis in Brustkrebs in der Klinik verwendet werden (Daniele, Zito et al. 2010). MAPKs wie ERK, JNK und p38 sind dafür bekannt, in die Regulation der MMP-9 Transkription involviert zu sein (Simon, Simon et al. 2001). In dem Fall der nicht-metastasierenden Brustkrebszelllinie MCF-7 dürften diese MMPs keine so große Rolle spielen, da sie nicht so aktiv sind wie in anderen Zelllinien. Die nicht-metastasierende Zelllinie MCF-7 bestätigt die Notwendigkeit, dass die MMP-Aktivität aufgrund deren niedrigen Aktivität nur interessant ist, wenn es gelänge die Aktivität über die Mechanismen der Signaltransduktion zu steigern und in der Folge eine aktivierte Migrationstendenz messbar wäre.

Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit richtungsweisend sein könnten in Bezug auf die weitere Erforschung der Rolle von PAI-1 in Brustkrebs. Erhöhte PAI-1 Level, wie sie auch in dieser Arbeit

durch eine Stimulierung von Zink festgestellt wurden, sind assoziiert mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebs (Beaulieu, Whitley et al. 2007). Es könnte also für die weitere Aufklärung des „PAI-1 Paradoxon, wichtig sein, dass PAI-1 über Zink von der MAPKinase ERK 1/2 reguliert werden kann. Dieser Zusammenhang könnte helfen, weitere Fortschritte in der Behandlung und Prävention von Brustkrebs und vielleicht auch anderen Krebsarten zu machen. uPA und PAI-1 spielen in vielen Krebsarten eine Schlüsselrolle in Tumorinvasion und Metastasis (Harbeck, Schmitt et al. 2007). Somit können die Versuche auch auf andere Karzinomzelllinien ausgeweitet werden und auch die Beteiligung von uPA muss noch genauer untersucht werden, um festzustellen, ob auch eine Zink-induzierte uPA Stimulierung vorliegt, die über den MAPK-Pathway, im Speziellen dem ERK-Pathway, kontrolliert wird. Das ist besonders deswegen wichtig, weil uPA, uPAR und PAI-1 essentielle Rollen in Prozessen zukommen, die womöglich zu Tumormetastasis führen können (Look, van Putten et al. 2003). Hohe Level von uPA und PAI-1 in Tumorextrakten sind assoziiert mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebspatienten (Andreasen, Kjoller et al. 1997; Schmitt, Harbeck et al. 1997; Look and Foekens 1999). Brustkrebspatienten mit niedrigen Konzentrationen von uPA und PAI-1 haben ein sehr niedriges Risiko eines Wiederauftretens der Erkrankung, vor allem jene mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren (Harris, Fritsche et al. 2007). Genau deswegen ist die Forschung zu diesem Thema von Bedeutung, da es Brustkrebspatienten helfen könnte sich unnötige Therapien zu ersparen und somit zu einem besseren Patientenmanagement beiträgt. Auch andere Krebspatienten könnten davon profitieren, da hohe Tumorgewebe-Level von uPA und/ oder PAI-1 mit einer gesteigerten Tumoraggressivität und einem schlechten Patientenausgang korrelieren, und das nicht nur bei Brustkrebs, sondern auch bei anderen Krebsarten wie Ovarien-, ösophagialen, Magen-, kolorektalem, Lungen- oder Leberkrebs (Harbeck, Kates et al. 2004). Auch bei diesen Krebsarten sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen PAI-1, Zink und den MAPKinasen gibt.

Die noch offene Frage aber ist, inwieweit die Ergebnisse in vivo relevant sind, da die benötigten Zinkmengen weit über physiologischen Konzentrationen liegen. Daher muss unbedingt geklärt werden, ob im Tumorgewebe solche Konzentrationen erreicht werden können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

PAI-1 spielt eine wichtige Rolle in Tumorinvasion und Metastasis, vor allem bei Brustkrebs. Außerdem werden gesteigerte Werte mit Adipositas, dem metabolischem Syndrom und zahlreichen anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht. PAI-1 hat nicht nur die Funktion eines Inhibitors, sondern ist unter anderem auch an der Zellmigration beteiligt.

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Zink auf die PAI-1 Expression in MCF-7 Zellen sowie eine mögliche Verbindung mit dem MAPK-Pathway näher betrachtet. Dieser Zusammenhang ist interessant, da sowohl PAI-1 als auch die MAPKinasen pERK 1/2 und p-p38 von Zink stimuliert werden und alle drei Komponenten für Krebsprogression und Metastasis entscheidend sein können. Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Stimulierung der Aktivität von pERK 1 und 2, p-p38 und der Expression von PAI-1 durch Zink in einer Konzentration von 100µM. Die PAI-1 Stimulierung konnte nur durch die Inhibierung von pERK 1/2 rückgängig gemacht werden. p-p38 zeigte hingegen keine Bedeutung für die Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1. Des Weiteren wurde untersucht, ab welcher Konzentration von Zink die Aktivierung der MAPKinasen und von PAI-1 beginnt, um die physiologische Relevanz genauer zu beleuchten. Es ist so, dass sowohl PAI-1 als auch pERK 1/2 und p-p38 ab einer Konzentration von 100µM Zink eindeutig stimuliert werden. Außerdem wurde das Adhäsions- und Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Zink und den Inhibitoren von pERK 1/2 und p-p38 untersucht. Der MTT-Test zeigte keine Auswirkungen der MAPKinasen auf die Proliferation, es erfolgte jedoch eine signifikante Abnahme durch Zink in einer Konzentration von 150µM. Die Zellablösung, die mittels Kristallviolett-Test ermittelt wurde, lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Verschiedene Zinkkonzentrationen zwischen 10 und 200µM zeigten keinen Einfluss auf die Migration von MCF-7 Zellen. Diese Versuche wurden durchgeführt, da Proliferation, Adhäsion und Migration wichtige Rollen in der Krebsprogression spielen. Abschließend wurde auch die Gelatinase-Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemessen, da auch diese große

Bedeutung in Brustkrebs haben. Es konnte allerdings keine messbare Aktivität der MMPs festgestellt werden, was auch mit der Literatur übereinstimmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1 in MCF-7 Zellen über den ERK-Pathway reguliert wird. Dieses Erkenntnis könnte Ansätze für weitere Untersuchungen liefern, die zum besseren Verstehen der komplexen Zusammenhänge in Brustkrebs beitragen. Ebenso könnten diese Versuche auf weitere Zelllinien ausgeweitet werden, da PAI-1 nicht nur in Brustkrebs eine wichtige Rolle spielt.

7 SUMMARY

PAI-1 plays an important role in tumor progression and metastasis, especially in breast cancer. Increased levels are also associated with adipositas, the metabolic syndrom and many other diseases. PAI-1 does not only function as an inhibitor, but is also involved in the process of cell migration.

In this study, the effect of Zinc on the expression of PAI-1 in MCF-7 cells was investigated, as well as the involvement of the MAPK-Pathway. This link is of interest, because PAI-1 as well as the MAPKs pERK 1/2 and p-p38 could be stimulated by Zinc and all three components could be crucial for cancer progression and metastasis.

Examinations of the activity of pERK 1/2, p-p38 and the expression of PAI-1 show a significant stimulation by Zinc applied in a concentration of 100µM. The PAI-1 stimulation could only be reversed by inhibition of the pERK 1/2 pathway. p-p38 didn't show any relevance for the Zinc-induced stimulation of PAI-1. This study further examined the concentration of Zinc needed to induce the activation of the MAPKs and PAI-1, to explore the physiological relevance. It could be shown that PAI-1, pERK 1/2 and p-p38 are all significantly stimulated at 100µM ZnCl₂. In addition, the adhesion and migration behaviour of MCF-7 cells after incubation with Zinc and the inhibitors of pERK 1/2 and p-p38 were investigated. The MTT-assay showed no effect of the MAPKs on the proliferation rate, but there was a significant decrease in proliferation induced by Zinc in a concentration of 150µM. The cell detachment, which was measured by the crystalviolet-assay, revealed no steady result. Zinc concentrations between 10 and 200µM did not influence the migration behaviour of MCF-7 cells. These experiments were performed, because proliferation, adhesion and migration play important roles in cancer progression. Finally, the activity of the gelatinases MMP-2 and -9 was measured, due to their great importance in breast cancer. There was no measurable activity of these MMPs, in accordance with literature.

In summary the data suggest that the Zinc-induced stimulation of PAI-1 is regulated by the ERK-Pathway in MCF-7 cells. This result provides a new

background for more investigations that could help to understand the complex mechanisms in breast cancer. Moreover these experiments could be extended to other cell lines, as the role of PAI-1 is not restricted to breast cancer.

V LITERATURVERZEICHNIS

- Alessi, M. C., D. Bastelica, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity." Diabetes **49**(8): 1374-1380.
- Alessi, M. C. and I. Juhan-Vague (2006). "PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(10): 2200-2207.
- Andreasen, P. A., R. Egelund, et al. (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." Cell Mol Life Sci **57**(1): 25-40.
- Andreasen, P. A., L. Kjoller, et al. (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." Int J Cancer **72**(1): 1-22.
- Bachmeier, B. E., A. G. Nerlich, et al. (2001). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity." Anticancer Res **21**(6A): 3821-3828.
- Bajou, K., A. Noel, et al. (1998). "Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization." Nat Med **4**(8): 923-928.
- Basbaum, C. B. and Z. Werb (1996). "Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 731-738.
- Bastard, J. P., E. Bruckert, et al. (1995). "Are free fatty acids related to plasma plasminogen activator inhibitor 1 in android obesity?" Int J Obes Relat Metab Disord **19**(11): 836-838.
- Beaulieu, L. M., B. R. Whitley, et al. (2007). "Breast cancer and metabolic syndrome linked through the plasminogen activator inhibitor-1 cycle." Bioessays **29**(10): 1029-1038.
- Binder, B. R., G. Christ, et al. (2002). "Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles." News Physiol Sci **17**: 56-61.
- Binder, B. R. and J. Mihaly (2008). "The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer." Immunol Lett **118**(2): 116-124.
- Bingham, S. A., R. Luben, et al. (2003). "Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer?" Lancet **362**(9379): 212-214.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). "Proteolytic remodeling of extracellular matrix." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 728-735.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer **1**(1): 46-54.
- Bjorklund, M. and E. Koivunen (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.
- Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 932-943.

- Bouchet, C., K. Hacene, et al. (1999). "Dissemination risk index based on plasminogen activator system components in primary breast cancer." J Clin Oncol **17**(10): 3048-3057.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." Cell **65**(4): 663-675.
- Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, et al. (1990). "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." Science **249**(4964): 64-67.
- Bray, T. M. and W. J. Bettger (1990). "The physiological role of zinc as an antioxidant." Free Radic Biol Med **8**(3): 281-291.
- Bremner, I. (1991). "Nutritional and physiologic significance of metallothionein." Methods Enzymol **205**: 25-35.
- Bretscher, M. S. (1984). "Endocytosis: relation to capping and cell locomotion." Science **224**(4650): 681-686.
- Brown, P. D., A. T. Levy, et al. (1990). "Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines." Cancer Res **50**(19): 6184-6191.
- Byon, C. H., R. W. Hardy, et al. (2009). "Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4." Lab Invest **89**(11): 1221-1228.
- Calle, E. E., C. Rodriguez, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." N Engl J Med **348**(17): 1625-1638.
- Carmeliet, P., L. Moons, et al. (1997). "Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation." Nat Genet **17**(4): 439-444.
- Carter, J. E., A. Q. Truong-Tran, et al. (2002). "Involvement of redox events in caspase activation in zinc-depleted airway epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **297**(4): 1062-1070.
- Castello, R., A. Estelles, et al. (2002). "Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer." Clin Chem **48**(8): 1288-1295.
- Chakravarty, P. K., A. Ghosh, et al. (1986). "Zinc in human malignancies." Neoplasma **33**(1): 85-90.
- Chambers, A. F. and L. M. Matrisian (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst **89**(17): 1260-1270.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chazaud, B., R. Ricoux, et al. (2002). "Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations." Am J Pathol **160**(1): 237-246.
- Chesters, J. K., L. Petrie, et al. (1993). "Two zinc-dependent steps during G1 to S phase transition." J Cell Physiol **155**(3): 445-451.

- Clegg, M. S., L. A. Hanna, et al. (2005). "Zinc deficiency-induced cell death." IUBMB Life **57**(10): 661-669.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith (1995). "How MAP kinases are regulated." J Biol Chem **270**(25): 14843-14846.
- Collier, I. E., P. A. Krasnov, et al. (1992). "Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase." J Biol Chem **267**(10): 6776-6781.
- Costello, L. C., P. Feng, et al. (2004). "Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve." Prostate Cancer Prostatic Dis **7**(2): 111-117.
- Coussens, L. M., C. L. Tinkle, et al. (2000). "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis." Cell **103**(3): 481-490.
- Cui, Y., S. Vogt, et al. (2007). "Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(8): 1682-1685.
- Daniele, A., A. F. Zito, et al. (2010). "Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer." Anticancer Res **30**(9): 3521-3527.
- Dano, K., N. Behrendt, et al. (2005). "Plasminogen activation and cancer." Thromb Haemost **93**(4): 676-681.
- Das, S., A. Banerji, et al. (2008). "Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium." Life Sci **82**(9-10): 467-476.
- Declerck, P. J., M. De Mol, et al. (1988). "Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin)." J Biol Chem **263**(30): 15454-15461.
- Degryse, B., C. F. Sier, et al. (2001). "PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase receptor." FEBS Lett **505**(2): 249-254.
- Deng, G., S. A. Curriden, et al. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" J Cell Biol **134**(6): 1563-1571.
- DeWys, W. and W. Pories (1972). "Inhibition of a spectrum of animal tumors by dietary zinc deficiency." J Natl Cancer Inst **48**(2): 375-381.
- DeWys, W., W. J. Pories, et al. (1970). "Inhibition of Walker 256 carcinosarcoma growth of dietary zinc deficiency." Proc Soc Exp Biol Med **135**(1): 17-22.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." Annu Rev Immunol **20**: 55-72.
- Duffy, M. J. (2002). "Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies." Clin Chem **48**(8): 1194-1197.
- Duffy, M. J. (2004). "The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy." Curr Pharm Des **10**(1): 39-49.
- Duffy, M. J. and C. Duggan (2004). "The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer." Clin Biochem **37**(7): 541-548.

- Duggan, C., T. Maguire, et al. (1995). "Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer." Int J Cancer **61**(5): 597-600.
- Duncan, A. M. (2004). "The role of nutrition in the prevention of breast cancer." AACN Clin Issues **15**(1): 119-135.
- Durand, M. K., J. S. Bodker, et al. (2004). "Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis." Thromb Haemost **91**(3): 438-449.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
- Ellis, V., N. Behrendt, et al. (1991). "Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor." J Biol Chem **266**(19): 12752-12758.
- Eppenberger, U., W. Kueng, et al. (1998). "Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients." J Clin Oncol **16**(9): 3129-3136.
- Esparza, J., C. Vilardell, et al. (1999). "Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways." Blood **94**(8): 2754-2766.
- Foekens, J. A., M. Schmitt, et al. (1994). "Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer." J Clin Oncol **12**(8): 1648-1658.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." EMBO J **16**(8): 1921-1933.
- Galaris, D. and A. Evangelou (2002). "The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis." Crit Rev Oncol Hematol **42**(1): 93-103.
- Geest, C. R. and P. J. Coffey (2009). "MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis." J Leukoc Biol **86**(2): 237-250.
- Geraki, K., M. J. Farquharson, et al. (2002). "Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study." Phys Med Biol **47**(13): 2327-2339.
- Geraki, K., M. J. Farquharson, et al. (2004). "X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue." Phys Med Biol **49**(1): 99-110.
- Giannelli, G., R. Erriquez, et al. (2004). "Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients." Int J Cancer **109**(5): 782-785.
- Giannelli, G., E. Fransvea, et al. (2002). "Gelatinase levels in male and female breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **292**(1): 161-166.
- Giehl, K. (2005). "Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis." Biol Chem **386**(3): 193-205.
- Goldsmith, Z. G. and D. N. Dhanasekaran (2007). "G protein regulation of MAPK networks." Oncogene **26**(22): 3122-3142.

- Griffith, K., E. B. Wright, et al. (1973). "Tissue zinc in malignant disease." Nature **241**(5384): 60.
- Griffiths, S. L. and D. J. Grainger (2006). "Proposal of a novel diabetogenic mechanism involving the serpin PAI-1." Bioessays **28**(6): 629-641.
- Guo, P., Q. Fang, et al. (2003). "Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo." Cancer Res **63**(15): 4684-4691.
- Haase, H., J. L. Ober-Blobaum, et al. (2008). "Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes." J Immunol **181**(9): 6491-6502.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-811.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harbeck, N., R. E. Kates, et al. (2004). "Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer." Thromb Haemost **91**(3): 450-456.
- Harbeck, N., A. Kruger, et al. (2001). "Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor." Onkologie **24**(3): 238-244.
- Harbeck, N., M. Schmitt, et al. (2007). "Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI-1: critical appraisal of their clinical relevance in breast cancer and their integration into decision-support algorithms." Crit Rev Clin Lab Sci **44**(2): 179-201.
- Harris, L., H. Fritsche, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." J Clin Oncol **25**(33): 5287-5312.
- Hashemi, M., S. Ghavami, et al. (2007). "Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells." Eur J Pharmacol **557**(1): 9-19.
- Hekman, C. M. and D. J. Loskutoff (1985). "Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants." J Biol Chem **260**(21): 11581-11587.
- Himelstein, B. P., E. J. Lee, et al. (1998). "Tumor cell contact mediated transcriptional activation of the fibroblast matrix metalloproteinase-9 gene: involvement of multiple transcription factors including Ets and an alternating purine-pyrimidine repeat." Clin Exp Metastasis **16**(2): 169-177.
- Ho, E. (2004). "Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk." J Nutr Biochem **15**(10): 572-578.
- Ho, E., C. Courtemanche, et al. (2003). "Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts." J Nutr **133**(8): 2543-2548.
- Holtkamp, W., J. Thiery, et al. (1990). "[Decreased plasma zinc levels in metastatic breast cancer]." Onkologie **13**(3): 207-209.

- Huang, Y. L., J. Y. Sheu, et al. (1999). "Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer." Clin Biochem **32**(2): 131-136.
- Jankun, J., A. M. Aleem, et al. (2007). "PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (B23) and fortilin (TCTP) in LnCAP prostate cancer cells." Int J Mol Med **20**(1): 11-20.
- Jankun, J. and E. Skrzypczak-Jankun (2009). "Yin and yang of the plasminogen activator inhibitor." Pol Arch Med Wewn **119**(6): 410-417.
- Jeffrey, K. L., M. Camps, et al. (2007). "Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses." Nat Rev Drug Discov **6**(5): 391-403.
- Jeng, M. H., W. Yue, et al. (2000). "Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **62**(3): 167-175.
- Jin, R., B. H. Bay, et al. (2001). "Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma." Breast Cancer Res Treat **66**(3): 265-272.
- Jin, R., V. T. Chow, et al. (2002). "Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer." Carcinogenesis **23**(1): 81-86.
- Johansson, N., M. Ahonen, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion." Cell Mol Life Sci **57**(1): 5-15.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-1912.
- Jood, K., P. Ladenvall, et al. (2005). "Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke." Stroke **36**(10): 2077-2081.
- Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Exp Dermatol **6**(5): 199-213.
- Kallakury, B. V., S. Karikehalli, et al. (2001). "Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **7**(10): 3113-3119.
- Kaspar, M., L. Zardi, et al. (2006). "Fibronectin as target for tumor therapy." Int J Cancer **118**(6): 1331-1339.
- Kelleher, S. L., Y. A. Seo, et al. (2009). "Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation." Genes Nutr **4**(2): 83-94.
- King, J., J. Zhao, et al. (2003). "Randomised double blind placebo control study of adjuvant treatment with the metalloproteinase inhibitor, Marimastat in patients with inoperable colorectal hepatic metastases: significant survival advantage in patients with musculoskeletal side-effects." Anticancer Res **23**(1B): 639-645.
- Kiremidjian-Schumacher, L., M. Roy, et al. (1996). "Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells." Biol Trace Elem Res **52**(3): 227-239.
- Kjoller, L. (2002). "The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility." Biol Chem **383**(1): 5-19.

- Krishna, M. and H. Narang (2008). "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple." Cell Mol Life Sci **65**(22): 3525-3544.
- Kuo, H. W., S. F. Chen, et al. (2002). "Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan." Biol Trace Elem Res **89**(1): 1-11.
- Kurata, S. (2000). "Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress." J Biol Chem **275**(31): 23413-23416.
- Kwaan, H. C., J. Wang, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis." Br J Cancer **82**(10): 1702-1708.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-869.
- Law, R. H., Q. Zhang, et al. (2006). "An overview of the serpin superfamily." Genome Biol **7**(5): 216.
- Lee, R., W. Woo, et al. (2003). "Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein." Exp Biol Med (Maywood) **228**(6): 689-696.
- Lee, S., M. Simpson, et al. (2004). "Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats." Carcinogenesis **25**(10): 1879-1885.
- Levenson, A. S. and V. C. Jordan (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line." Cancer Res **57**(15): 3071-3078.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro, et al. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Adv Cancer Res **74**: 49-139.
- Li, M., Y. Zhang, et al. (2007). "Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18636-18641.
- Lim, J. H., B. Stirling, et al. (2007). "Tumor suppressor CYLD regulates acute lung injury in lethal *Streptococcus pneumoniae* infections." Immunity **27**(2): 349-360.
- Liotta, L. A. and W. G. Stetler-Stevenson (1991). "Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation." Cancer Res **51**(18 Suppl): 5054s-5059s.
- Look, M., W. van Putten, et al. (2003). "Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients." Thromb Haemost **90**(3): 538-548.
- Look, M. P. and J. A. Foekens (1999). "Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer." APMIS **107**(1): 150-159.
- Look, M. P., W. L. van Putten, et al. (2002). "Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **94**(2): 116-128.
- Loskutoff, D. J., S. A. Curriden, et al. (1999). "Regulation of cell adhesion by PAI-1." APMIS **107**(1): 54-61.
- Loskutoff, D. J. and F. Samad (1998). "The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(1): 1-6.

- Loskutoff, D. J., J. A. van Mourik, et al. (1983). "Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(10): 2956-2960.
- MacDonald, R. S. (2000). "The role of zinc in growth and cell proliferation." J Nutr **130**(5S Suppl): 1500S-1508S.
- Margalioth, E. J., J. G. Schenker, et al. (1983). "Copper and zinc levels in normal and malignant tissues." Cancer **52**(5): 868-872.
- Mathews-Roth, M. M., J. L. Michel, et al. (1995). "Amelioration of the metabolic defect in erythropoietic protoporphyria by expression of human ferrochelatase in cultured cells." J Invest Dermatol **104**(4): 497-499.
- McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression." Mol Med Today **6**(4): 149-156.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." Oncogene **26**(22): 3113-3121.
- Mertens, I., A. Verrijken, et al. (2006). "Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome." Int J Obes (Lond) **30**(8): 1308-1314.
- Mills, B. J., W. L. Broghamer, et al. (1981). "A specific dietary zinc requirement for the growth of Walker 256/M1 tumor in the rat." Am J Clin Nutr **34**(9): 1661-1669.
- Mills, B. J., W. L. Broghamer, et al. (1984). "Inhibition of tumor growth by zinc depletion of rats." J Nutr **114**(4): 746-752.
- Mimuro, J., M. Sawdey, et al. (1989). "cDNA for bovine type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1)." Nucleic Acids Res **17**(21): 8872.
- Minkel, D. T., P. J. Dolhun, et al. (1979). "Zinc deficiency and growth of Ehrlich ascites tumor." Cancer Res **39**(7 Pt 1): 2451-2456.
- Moffatt, P. and F. Denizeau (1997). "Metallothionein in physiological and physiopathological processes." Drug Metab Rev **29**(1-2): 261-307.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mulay, I. L., R. Roy, et al. (1971). "Trace-metal analysis of cancerous and noncancerous human tissues." J Natl Cancer Inst **47**(1): 1-13.
- Murphy, G. and A. J. Docherty (1992). "The matrix metalloproteinases and their inhibitors." Am J Respir Cell Mol Biol **7**(2): 120-125.
- Murphy, G. and J. Gavrilovic (1999). "Proteolysis and cell migration: creating a path?" Curr Opin Cell Biol **11**(5): 614-621.
- Navarro Silvera, S. A. and T. E. Rohan (2007). "Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence." Cancer Causes Control **18**(1): 7-27.
- Nikkola, J., P. Vihinen, et al. (2005). "High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma." Clin Cancer Res **11**(14): 5158-5166.
- Nykjaer, A., M. Conese, et al. (1997). "Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes." EMBO J **16**(10): 2610-2620.

- O'Connor, J. M. (2001). "Trace elements and DNA damage." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 354-357.
- Olson, K. B., G. E. Heggen, et al. (1958). "Analysis of 5 trace elements in the liver of patients dying of cancer and noncancerous disease." Cancer **11**(3): 554-561.
- Ostrakhovitch, E. A. and M. G. Cherian (2005). "Inhibition of extracellular signal regulated kinase (ERK) leads to apoptosis inducing factor (AIF) mediated apoptosis in epithelial breast cancer cells: the lack of effect of ERK in p53 mediated copper induced apoptosis." J Cell Biochem **95**(6): 1120-1134.
- Paski, S. C. and Z. Xu (2001). "Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth." J Nutr Biochem **12**(11): 655-661.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.
- Powell, S. R. (2000). "The antioxidant properties of zinc." J Nutr **130**(5S Suppl): 1447S-1454S.
- Prasad, A. S. (1998). "Zinc deficiency in humans: a neglected problem." J Am Coll Nutr **17**(6): 542-543.
- Prasad, A. S. (2003). "Zinc deficiency." BMJ **326**(7386): 409-410.
- Prasad, A. S., F. W. Beck, et al. (1996). "Zinc deficiency affects cell cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells." J Lab Clin Med **128**(1): 51-60.
- Prasad, A. S., J. A. Halsted, et al. (1961). "Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia." Am J Med **31**: 532-546.
- Prasad, A. S. and O. Kucuk (2002). "Zinc in cancer prevention." Cancer Metastasis Rev **21**(3-4): 291-295.
- Prasad, A. S., A. Miale, Jr., et al. (1963). "Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism." J Lab Clin Med **61**: 537-549.
- Praus, M., D. Collen, et al. (2002). "Both u-PA inhibition and vitronectin binding by plasminogen activator inhibitor 1 regulate HT1080 fibrosarcoma cell metastasis." Int J Cancer **102**(6): 584-591.
- Preissner, K. T., S. M. Kanse, et al. (2000). "Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 621-628.
- Raman, M., W. Chen, et al. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.
- Reddy, K. B., S. M. Nabha, et al. (2003). "Role of MAP kinase in tumor progression and invasion." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 395-403.
- Renckens, R., J. J. Roelofs, et al. (2007). "Plasminogen activator inhibitor type 1 is protective during severe Gram-negative pneumonia." Blood **109**(4): 1593-1601.
- Reuning, U., V. Magdolen, et al. (1998). "Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review)." Int J Oncol **13**(5): 893-906.
- Richards, M. P. and R. J. Cousins (1976). "Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats." J Nutr **106**(11): 1591-1599.

- Riisbro, R., I. J. Christensen, et al. (2002). "Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer." Clin Cancer Res **8**(5): 1132-1141.
- Rizk, S. L. and H. H. Sky-Peck (1984). "Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue." Cancer Res **44**(11): 5390-5394.
- Rossomando, A. J., D. M. Payne, et al. (1989). "Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6940-6943.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-1037.
- Sandstead, H. H., A. S. Prasad, et al. (1967). "Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment." Am J Clin Nutr **20**(5): 422-442.
- Sang, Q. X. (1998). "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis." Cell Res **8**(3): 171-177.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." Nature **370**(6484): 61-65.
- Sattar, N., H. R. Scott, et al. (1997). "Acute-phase reactants and plasma trace element concentrations in non-small cell lung cancer patients and controls." Nutr Cancer **28**(3): 308-312.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-2444.
- Schmid, K. W., I. O. Ellis, et al. (1993). "Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **422**(2): 153-159.
- Schmitt, M., N. Harbeck, et al. (1997). "Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy." Thromb Haemost **78**(1): 285-296.
- Schrauzer, G. N. (2000). "Anticarcinogenic effects of selenium." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1864-1873.
- Sebolt-Leopold, J. S. and R. Herrera (2004). "Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer." Nat Rev Cancer **4**(12): 937-947.
- Sens, M. A., S. Somji, et al. (2001). "Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis." Am J Pathol **159**(1): 21-26.
- Silverman, G. A., P. I. Bird, et al. (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." J Biol Chem **276**(36): 33293-33296.
- Simon, C., M. Simon, et al. (2001). "The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation." Exp Cell Res **271**(2): 344-355.

- Smigal, C., A. Jemal, et al. (2006). "Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006." CA Cancer J Clin **56**(3): 168-183.
- Sola, E., A. Vaya, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism." Thromb Res **122**(3): 320-327.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-1416.
- Stefansson, S. and D. A. Lawrence (2003). "Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration." Sci STKE **2003**(189): pe24.
- Stefansson, S., D. A. Lawrence, et al. (1996). "Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote the cellular clearance of thrombin by low density lipoprotein receptor-related proteins 1 and 2." J Biol Chem **271**(14): 8215-8220.
- Stefansson, S., G. A. McMahon, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling." Curr Pharm Des **9**(19): 1545-1564.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1990). "Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **9**(4): 289-303.
- Stetler-Stevenson, W. G., L. A. Liotta, et al. (1993). "Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis." FASEB J **7**(15): 1434-1441.
- Stossel, T. P. (1994). "The machinery of cell crawling." Sci Am **271**(3): 54-55, 58-63.
- Takeda, A., K. Goto, et al. (1997). "Zinc depletion suppresses tumor growth in mice." Biol Trace Elem Res **59**(1-3): 23-29.
- Talvensaari-Mattila, A., P. Paakko, et al. (1998). "Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma." Cancer **83**(6): 1153-1162.
- Taylor, C. G., W. J. Bettger, et al. (1988). "Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats." J Nutr **118**(5): 613-621.
- Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). "Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers." Biochimie **87**(3-4): 287-297.
- Vallee, B. L. and K. H. Falchuk (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." Physiol Rev **73**(1): 79-118.
- Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." Oncogene **23**(16): 2838-2849.
- Wang, X., J. L. Martindale, et al. (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." Biochem J **333** (Pt 2): 291-300.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." EMBO J **16**(8): 1909-1920.

- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." Nat Cell Biol **4**(4): E97-100.
- Webb, D. J., K. S. Thomas, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth." J Cell Biol **152**(4): 741-752.
- Westermarck, J. and V. M. Kahari (1999). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." FASEB J **13**(8): 781-792.
- Whitfield, J. F., A. L. Boynton, et al. (1979). "The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP." Mol Cell Biochem **27**(3): 155-179.
- Whitley, B. R., D. Palmieri, et al. (2004). "Expression of active plasminogen activator inhibitor-1 reduces cell migration and invasion in breast and gynecological cancer cells." Exp Cell Res **296**(2): 151-162.
- Wood, R. J. (2000). "Assessment of marginal zinc status in humans." J Nutr **130**(5S Suppl): 1350S-1354S.
- Wright, E. B. and T. L. Dormandy (1972). "Liver zinc in carcinoma." Nature **237**(5351): 166.
- Wu, F. Y. and C. W. Wu (1987). "Zinc in DNA replication and transcription." Annu Rev Nutr **7**: 251-272.
- Yang, H. L., Y. H. Kuo, et al. (2011). "Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway." Food Chem Toxicol **49**(1): 290-298.
- Zeng, Z. S. and J. G. Guillem (1996). "Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells." Br J Cancer **74**(8): 1161-1167.
- Zhang, R., H. Zhang, et al. (2000). "Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis." J Environ Pathol Toxicol Oncol **19**(1-2): 95-97.
- Zucker, S., R. M. Lysik, et al. (1993). "M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer." Cancer Res **53**(1): 140-146.

LEBENS LAUF

Andrea HUNDSAMER

Adresse Floridusgasse 25/14, 1210 Wien

Telefon +43 6991 7106973

E-Mail andrea.hundsamer@gmx.at



Geburtsdatum und Geburtsort 27.10.1986 in Wien

Staatsangehörigkeit Österreich

SCHUL- UND BERUFSBILDUNG

2005 – 2011

Studium der Ernährungswissenschaften

Schwerpunkt: Psychologie der Ernährung/

Ernährungsberatung

Universität Wien

Seit 2006

Studium der Politikwissenschaften

1. Abschnitt abgeschlossen

Universität Wien

1997 – 2005

Gymnasium GRG 21 Franklinstraße 26, 1210 Wien

Schwerpunkt: Fremdsprachen

1993 – 1997

Volkschule Prießnitzgasse, 1210 Wien

BERUFSERFAHRUNG UND PRAKTIKA

Oktober 2009 – Mai 2011

Institut für Medizinische Chemie

Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie

Medizinische Universität Wien

Diplomandin

„Zink-induzierte Stimulierung von PAI-1 in MCF-7

Zellen – Regulierung über den MAPK-Pathway“

Januar 2011

Tutorium „BLOCK 9 – Medizinisch-chemische

Laboratoriumsdiagnostik 1(ELISA für Dengue Virus)

Juni 2010 und November 2010

Tutorium „Biochemische Übungen für

Ernährungswissenschaftler“

August 2009

Staud's Wien

Praktikantin

Februar – März 2009

AKE-Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung

Praktikantin

Juli – August 2008

AKH-Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien

Klinische Abteilung für Endokrinologie und

Stoffwechsel

Klinik für Innere Medizin III

Praktikantin

Juli 2008

Univ. Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde

Abteilung für Ernährungsmedizin und Prävention

Praktikantin

September 2002 – Juni 2003

Sozialprojekt des GRG 21, Franklinstraße 26

Besucherdienst im Geriatriezentrum Floridsdorf

SPRACHKENNTNISSE

Englisch

Französisch (Grundkenntnisse)

Finnisch (Grundkenntnisse)

EDV-KOMPETENZEN

MS Office; Photoshop; Prism; SPSS

AUSLANDSAUFENTHALTE

September 2003

Kalifornien, USA

September 2004

Cannes, Frankreich

INTERESSEN

Bücher, Kino, Museen, Reisen

Mitglied im Verein der Ernährungswissenschaftler

Österreich