



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Physiologische Relevanz der Laktoferrin-induzierten
Signaltransduktion in THP-1 Zellen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Karin Pröpper
Matrikel-Nummer:	0204824
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger

Wien, am 23. September 2008

DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei allen Personen, die mich unterstützt haben diese Arbeit fertig zu stellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger einerseits für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Themas & andererseits für die immerwährende Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die humorvollen Aufmunterungen und die vielen netten Gespräche.

Weiters danke ich Dr. Nina Kaori Brandl, die mich während meiner gesamten Arbeitsphase im Labor immer tatkräftig mit ihrem fachlichen Wissen und ihrer Ruhe, Geduld sowie ihrem Humor unterstützte, sei es bei der Vorbereitung und Durchführung von Experimenten oder bei der Einführung in sämtliche notwendige Geräte und Programme. Auch konnte ich von ihren kreativen und organisatorischen Fähigkeiten in lustigen Pausengesprächen einiges lernen – Danke es hat immer viel Spaß gemacht!

Außerdem danke ich allen lieben Laborkollegen/Innen, die ich in dem vergangenen letzten Jahr kennengelernt habe, ganz besonders aber der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hilde Laggner, die mir während der gesamten Diplomarbeit ihre Zellen für meine Versuche zur Verfügung gestellt hat – Danke liebe Sabine, danke liebe Natascha!

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen wundervollen Eltern, ohne die ich meine Studentenzeit nicht so unbeschwert hätte genießen können und die mich immer in Allem unterstützen und hinter mir stehen, genau wie meine liebe Schwester Astrid. Ohne Euch wäre das alles nie möglich gewesen –Danke!

Auch seien all meine lieben Freunde erwähnt, die immer für mich da sind und die ich unglaublich schätze. Besonderen Dank spreche ich Hannah und Nina aus, die mir immer und vor allem auf den letzten Metern treu und zuverlässig zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich meinem lieben Freund Basti, der mich mit seinem Humor und seiner lebenswerten Art immer bei Laune hält, mir in allen Situationen mit Rat und Tat zur Seite steht und auf den ich mich immer verlassen kann – Du bist einmalig und es tut gut Dich an meiner Seite zu wissen!

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS	I
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III TABELLENVERZEICHNIS	VII
IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERBLICK	3
2.1 Transforming Growth Factor – beta1 (TGF- β 1)	3
2.1.1 Struktur	3
2.1.2 Aktivierung	4
2.1.3 TGF- β Pathway	5
2.1.3.1 Smad-Proteine	5
2.1.3.2 TGF- β Rezeptoren	5
2.1.3.2.1 Der Co-Rezeptor Endoglin	6
2.1.3.3 Signaltransduktion	8
2.1.3.4 TGF-beta Zielgene PAI-1 und Fibronektin	9
2.1.3.4.1 PAI-1	9
2.1.3.4.2 Fibronektin	12
2.1.4 Biologische Funktionen vom Transforming Growth Factor-beta1	13
2.1.4.1 TGF-beta im Zusammenhang mit Zellzyklus, –proliferation und -differenzierung sowie Apoptose	14
2.1.4.1.1 Zellzyklus	14
2.1.4.1.2 Apoptose	14
2.1.4.1.3 Das Proto-Onkogen c-Myc	15
2.1.4.1.4 Wachstumskontrolle durch TGF-beta 1	16
2.1.4.1.5 TGF-beta induzierte Apoptose	18
2.1.4.2 Immunsystem und TGF-beta 1	19
2.1.4.3 Regulatorische Effekte von TGF-beta auf den Auf- und Umbau der Extrazellulärmatrix	20

2.1.4.4	TGF-beta im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorerkrankungen	20
2.2	Laktoferrin	22
2.2.1	Struktur	22
2.2.2	Eigenschaften und Funktionen	23
2.2.2.1	Laktoferrin im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen	25
2.2.2.2	Signaltransduktion	26
2.2.2.3	Low-density lipoprotein receptor-related protein – 1 (LRP-1)	27
2.2.2.3.1	Matrix Metalloproteinase 9	28
3	MATERIAL & METHODEN	29
3.1	Zellkultur	29
3.1.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	29
3.1.2	Verwendete Zellkulturbedingungen	30
3.1.3	Zelllinie : THP-1 Zellen	30
3.1.3.1	Differenzierung der monozytären THP-1 Zellen zu Makrophagen	31
3.1.4	Züchten der Zellen	31
3.1.4.1	Füttern der Zellen	32
3.1.4.2	Zellkulturmedium RPMI 1640	32
3.1.4.3	Aussetzen der Zellen	32
3.1.4.4	Inkubation	33
3.1.5	Lysieren der Zellen	33
3.1.5.1	Lysieren der undifferenzierten THP-1 Zellen	33
3.1.5.2	Lysieren der differenzierten Zellen	34
3.2	Probenaufbereitung – RNA Extraktion und Umschreibung in cDNA	35
3.2.1	Verwendete Geräte/Reagenzien/Materialien	35
3.2.2	Herstellen von DEPC – Spitzen / Eppis /Wasser	35
3.2.3	Extraktion	36
3.2.4	Umschreibung in cDNA (complementaryDNA)	37
3.3	RT-PCR	38
3.3.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	38
3.3.2	Versuchsdurchführung	39
3.4	TGF-β – ELISA	42
3.4.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	42
3.4.2	Versuchsdurchführung	43

3.5	Adhärenztest mittels Kristallviolettffärbung	45
3.5.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	45
3.5.2	Versuchsvorbereitung	45
3.5.3	Versuchsdurchführung	46
3.6	Immunfluoreszenz	47
3.6.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	47
3.6.2	Versuchsdurchführung	48
3.7	Apoptose Assay	50
3.7.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	50
3.7.2	Versuchsdurchführung	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Einfluss von Laktoferrin auf die Expression der klassischen TGF – β1 Zielgene PAI-1 und FN-1	54
4.1.1	PAI-1 – Expressionsanalyse	54
4.1.2	Fibronektin – Expressionsanalyse	57
4.1.3	Einfluss von Laktoferrin auf die Expression von den TGF- β 1 Zielgenen PAI-1 und FN-1 nach Dosiserhöhung	59
4.2	Auswirkungen von TGF-β1 und bLF auf die Morphologie der THP-1 Zellen	62
4.3	Beeinflussung der Morphologie und des Adhärenzverhaltens von undifferenzierten THP-1 Zellen durch Laktoferrin und TGF-β1	63
4.4	Einfluss von Laktoferrin und TGF-β1 auf die Expression der Differenzierungsmarker MMP-9, Endoglin, LRP-1 und CD36	65
4.5	Einfluss von bLF und TGF-β1 auf die Expression von c-Myc	67
4.6	Auswirkungen von bLF und TGF-β1 auf das Apoptoseverhalten von THP-1 Zellen	69
4.7	Effekte von bLF und TGF-β1 auf die Zellzahl der THP-1 Zellen	70
4.8	Direkte Aktivierung von TGF-β1 durch Laktoferrin	72
4.9	Effekte von Laktoferrin und TGF-β1 auf den Smad-Pathway in differenzierten THP-1 Zellen	74

5	DISKUSSION	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	83
7	SUMMARY	85
8	LITERATURVERZEICHNIS	87

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Proteinstruktur eines Propeptids der TGF- β Moleküle	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Smad-Pathway	8
Abbildung 3: Bildliche Darstellung des Aufbaus des Fibronektin-Moleküls	12
Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Zusammenhänge zwischen TGF- β und der Zellzyklusregulation	17
Abbildung 5: Kristalline 3-D Struktur eines Laktoferrin-Moleküls	22
Abbildung 6: Molekulare Interaktionen zwischen LF und Proteoglykanen, Nucleolin und LRP	24
Abbildung 7: Struktureller Aufbau eines LRP-1 Moleküls	27
Abbildung 8: Mikroskopische Bilder der THP-1 Monozyten und - Makrophagen	31
Abbildung 9: Bildliche Darstellung der Herstellung der Standardreihe für die ELISA-Experimente	44
Abbildung 10: Graph und RT-PCR-Bilder der PAI-1 Expression	54/55
Abbildung 11: RT-PCR Bilder der Fibronektin-Expression	57
Abbildung 12: Graph und RT-PCR Bilder der PAI-1 Expression nach Dosissteigerung des eingesetzten LF	59
Abbildung 13: RT-PCR Bilder der Fibronektin-Expression nach Dosissteigerung des eingesetzten LF	60
Abbildung 14: Mikroskopische Bilder undifferenzierter THP-1 Zellen nach fünftägiger Behandlung mit vLF und TGF- β 1	62
Abbildung 15: Bilder des Adhärenztests mit Kristallviolett vor und nach der Färbung	63
Abbildung 16: RT-PCR Ergebnisse der Expression der Differenzierungsmarker LRP-1, MMP-9, Endoglin und CD36	65
Abbildung 17: RT-PCR Ergebnisse der c-Myc Expression	67
Abbildung 18: Bild des Agarosegels nach Durchführung des Apoptose Assays	69
Abbildung 19: Bilder der Immunfluoreszenz	74

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung des MasterMix für die Umschreibung in cDNA	37
Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung des MasterMix für die RT-PCR-Experimente	39
Tabelle 3: Verwendete Primer, Produktlänge des amplifizierten cDNA-Fragments, primerspezifische Annealingtemperatur, Anzahl der verwendeten Cycles und Sequenzen der verwendeten Primer	40
Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe für die ELISA Experimente	43
Tabelle 5: Auswirkungen von TGF- β 1 und bLF auf die Zellzahl, Viabilität und Größe undifferenzierter THP-1 Zellen	70
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der ELISA-Versuche zur Analyse der direkten Aktivierung von TGF- β 1 durch LF	72

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALK	Activine Receptor-Like Kinases
AMHs	Anti Mullerian Hormons
bHLHZ	Basic Helix-Loop-Helix-Leucine-Zipper
bLF	Bovines Laktoferrin
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BSA	Bovines Serum Albumin
CDKs	Cycline Dependent Kinases
cDNA	Complementary DNA
CKIs	Cycline Kinase Inhibitors
Co-Smad	common-partner Smad
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal Calf Serum
FN-1	Fibronektin-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDFs	Growth and Differentiation Factors
ICD	Intracellular Domain
I-Samd	Inhibitory Smad
IL-2	Interleukin-2
kDa	kiloDalton
KV	Kristallviolett
LAP	Latency Associated Protein
LBP	LPS-Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccahrde
LRP-1	Low-Density Receptor-Related Protein-1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MH	Mad Homology
MMPs	Matrix Metalloproteinasen

PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol12-Myristate-13-Acetate
R-Smad	Receptor Regulated Smad
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
Serpine	Serin Protease Inhibitoren
Smad	SMA = Smad Body Size MAD = Mothers Against Decapentaplegic
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
T β R	TGF- β Receptor
t-PA	tissue-type Plasminogen Activator
u-PA	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

1 Einleitung

Laktoferrin und der Transforming Growth Factor-beta1 – zwei Substanzen mit verschiedensten regulatorischen Wirkungen – stehen auf zellulärer Ebene seit Jahrzehnten im wissenschaftlichen Blickpunkt der Forschung. Beide sind maßgeblich in die Regulation vielzähliger zellulärer, physiologischer und immunologischer Prozesse involviert; um jeden einzelnen Mechanismus genau zu verstehen, bedarf es weiterhin zahlreicher Studien.

Laktoferrin ist ein vor ca. 60 Jahren als rotes Protein beschriebenes multifunktionelles Glykoprotein, das sich insbesondere durch seine antimikrobielle Aktivität auszeichnet und einen wesentlichen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellt. Bei dem Transforming Growth Factor – beta1 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, das vor allem regulatorische Wirkung auf Wachstum und Differenzierung unterschiedlicher Zellen im Organismus ausübt. Von besonderem Interesse ist es, eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen beiden, für den Organismus wichtigen Proteinen, herauszufinden. Mittlerweile lassen vorläufige Forschungsergebnisse die Behauptung zu, dass Laktoferrin über bislang ungeklärte Mechanismen zur Aktivierung des TGF-beta – Smad – Pathways führt. Dieser Effekt konnte in vorangegangenen Arbeiten mit unterschiedlichen Zelllinien, wie zum Beispiel Chondrozyten oder HeLa – Zellen, nachgewiesen werden und nun gilt es, dies in weiteren Zelllinien zu überprüfen und den Mechanismus dieser Aktivierung herauszufinden. Dabei gibt es unterschiedliche Theorien, die diesen Effekt begründen könnten, zum Beispiel, dass Laktoferrin selber in der Lage ist über den TGF-beta – Pathway Signale zu vermitteln oder aber, dass es durch Laktoferrin zur Aktivierung von TGF- β kommt. Diese Arbeit soll dazu beitragen, herauszufinden, ob und wie Laktoferrin zur Aktivierung des TGF- β -Signaltransduktionsweges in THP-1 Zellen führt. Dafür wurde diese humane, monozytäre leukämische Zelllinie sowohl mit Laktoferrin als auch mit TGF- β 1 behandelt und die Effekte wurden vergleichend gegenübergestellt.

2 Literaturüberblick

2.1 Transforming Growth Factor – beta1 (TGF- β 1)

Der Transforming Growth Factor - beta 1 ist Mitglied der TGF- β Familie, die wiederum der großen TGF- β Superfamilie angehört, welche aus einer Reihe strukturell ähnlicher, multifunktioneller Zytokine besteht [CLARK und COKER, 1998]. Die wichtigsten Mitglieder der TGF- β Superfamilie stellen die Prototypen TGF-beta selbst, die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Activine, die Growth and Differentiation Factors (GDFs) und die Anti-Müllerian Hormons (AMHs) dar [MASSAGUE und CHEN, 2000]. Bisher sind drei für Säugetiere wichtige Typen der TGF- β Familie identifiziert worden: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. TGF- β 1 ist die als erste isolierte und am meisten erforschte Isoform [KINGSLEY, 1994].

Beim Menschen liegt im Plasma überwiegend die Isoform TGF- β 1 vor, während die anderen beiden Formen, TGF- β 2 und TGF- β 3, einen deutlich geringeren Anteil des gesamten TGF- β Spiegels ausmachen [WAKEFIELD et al., 1995]. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen konnten Veränderungen des TGF- β Plasma Spiegels beobachtet werden [GRAINGER et al., 2000].

2.1.1 Struktur

Die verschiedenen Mitglieder der TGF- β Familie werden als Propeptide, bestehend aus 390-412 Aminosäuren, von den Zellen synthetisiert [CLARK und COKER, 1998, BALAZOVICH et al., 1996]. Solch ein Precursor besteht aus der N-terminalen Signaldomäne, einer variablen Pro-Domäne und dem C-terminalen Fragment [KINGSLEY, 1994]. Durch die Endopeptidase Furin wird das C-terminale Ende, das aus 110-140 Aminosäuren besteht, im Golgi Apparat proteolytisch geteilt und es folgt die Dimerisierung zu einem 25 kDa großen Protein [DUBOIS et al., 1995]. Das Homodimer bleibt an dem restlichen, ebenfalls dimerisierten Komplex, dem Latency Associated Protein (LAP), nicht

kovalent gebunden und liegt somit in inaktiver Form vor [MASSAGUE et al., 1990, GRAINGER et al., 2000].



Abbildung 1: Graphische Darstellung der Proteinstruktur eines Propeptids der TGF-β Moleküle. Quelle: KINGSLEY, 1994

2.1.2 Aktivierung

Liegt das reife TGF-β1 an LAP gebunden vor, ist es inaktiv [GRAINGER et al., 2000]. In diesem Zustand ist das Zytokin nicht in der Lage mit seinen Oberflächenrezeptoren zu interagieren [MASSAGUE et al., 1990].

Um seine biologische Aktivität zu entfalten, muss das latente TGF-β zuerst aktiviert werden. In vitro wird das reife Peptid durch Senkung des pH-Wertes, Hitzeeinwirkung oder proteolytisch aktive Enzyme vom inaktiven Komplex abgespalten [BALAZOVICH et al., 1996, KINGSLEY, 1994]. In vivo wurden zum Beispiel die proteolytische Spaltung durch Transglutaminasen, Thrombin oder Plasmin oder die Konformationsänderung von LAP durch physikalische Reaktionen mit Thrombospondin als Aktivierungsmechanismen beschrieben, wobei die Proteolyse am häufigsten beobachtet wurde [FORTUNEL et al., 2000].

Das aktive Zytokin ist nun bereit, an die TGF-β Rezeptoren zu binden und die Signaltransduktion einzuleiten.

2.1.3 TGF- β Pathway

TGF- β signalisiert über seinen eigenen Pathway, den TGF- β Pathway. An diesem sind hauptsächlich folgende drei Komponenten beteiligt: die Liganden selbst, die TGF- β Rezeptoren, die die Signalisierung in das Zellinnere leiten, sowie die Smad-Proteine, die in der Zelle den Signaltransport zwischen Zytoplasma und Zellkern organisieren.

2.1.3.1 Smad-Proteine

Die Smad Proteine werden in die drei Unterklassen R-Smads (receptor regulated Smads), Co-Smads (common-partner Smads) und I-Smads (Inhibitory Smads) eingeteilt [MIYAZAWA et al., 2002]. Im TGF- β Pathway sind Smad2 und Smad3 als R-Smads, Smad4 als Co-Smad und Smad7 als I-Smad aktiv [MOUSTAKAS, 2002]

Smads bestehen aus zwei globulären Domänen, der N-terminalen MH1- und der C-terminalen MH2-Domäne (Mad homology 1/2), die über eine weitere, divergente Region miteinander verknüpft sind. Jede Domäne übernimmt unterschiedliche Aufgaben; so weist die MH1-Domäne intrinsische DNA-bindende Aktivitäten auf, die für die Identifikation der DNA-Bindungsstelle unerlässlich sind, wohingegen die MH2-Domäne für die homo- und heterodimere Komplexbildung essenziell und für die Aktivierung und Hemmung der Transkriptionen verantwortlich ist [MASSAGUE und CHEN, 2000, MIYAZAWA et al., 2002].

2.1.3.2 TGF- β Rezeptoren

Die Liganden der TGF- β Superfamilie signalisieren über die Familie der TGF- β Rezeptoren, eine Reihe transmembraner Glykoproteine mit zytoplasmatischen Serin/Threonin Kinase Domänen. Auf Grund ihrer strukturellen und

funktionellen Eigenschaften werden die Rezeptoren in die zwei Hauptklassen Typ-I und Typ-II unterteilt [MASSAGUE, 1998].

Bei Säugern werden 5 Typ-II – und 7 Typ-I – Rezeptoren unterschieden, wobei der Typ-I Rezeptor ALK-5 (activine receptor-like kinases) der, im Zusammenhang mit dieser Arbeit, relevanteste ist, da sein physiologischer Ligand TGF- β ist. Der Typ-I Rezeptor ALK-1 bindet ebenfalls TGF- β , jedoch mit wesentlich niedrigerer Affinität [MIYAZAWA et al., 2002, MASSAGUE, 1998]. ALK-1 dient der Phosphorylierung von Smad1, wohingegen ALK-5 für die Phosphorylierung von Smad2 und 3 zuständig ist [CHEN und MASSAGUE, 1999, OH et al., 2000].

Neben diesen beiden hauptbeteiligten Rezeptoren Typ-I und Typ-II werden zusätzlich zwei weitere nennenswerte unterschieden: Betaglykan und Endoglin. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrem zellulären Vorkommen als auch in ihrer Bindungsspezifität zu den TGF- β Isoformen [LETAMENDIA et al., 1998]. Während Betaglykan heteromere Komplexe mit den TGF- Rezeptoren Typ-I und II bildet und die Bindung aller TGF- β Isoformen an ihren Rezeptor fördert, ist Endoglin lediglich in der Lage die Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 3 mit hoher Affinität zu binden [MASSAGUE, 1998, LASTRES et al., 1996].

2.1.3.2.1 Der Co-Rezeptor Endoglin

Endoglin, auch bekannt als CD105, ist ein homodimeres 180 kDa schweres Glykoprotein, das sich in großen Mengen vor allem in Epithelzellen, aber auch zum Beispiel in Fibroblasten wiederfindet [LASTRES et al., 1994, CHEIFETZ et al., 1992]. O'Connell et al. stellten 1992 den Zusammenhang der Genexpression von Endoglin und der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen fest. In den Blutmonozyten konnte kaum oder sogar keine Endoglinexpression beobachtet werden, wohingegen diese mit der Differenzierung zu Makrophagen deutlich zunahm. Seit dieser Erkenntnis dient Endoglin als ein Differenzierungsmarker für Makrophagen [O'CONNELL et al., 1992].

CD105 stellt eine integrale Komponente des TGF-Rezeptor Systems dar, indem es mit den Typ-I- und Typ-II - Rezeptoren unabhängig von exogenen Liganden sowohl über seine extrazelluläre als auch seine zytoplasmatische Domäne interagiert. Diese Interaktion wird auch durch die Anwesenheit solcher Liganden nicht verändert [BARBARA et al., 1999, GUERRERO-ESTEO et al., 2002].

Endoglin ist nicht befähigt, selbständig Liganden zu binden, sondern ist auf die Anwesenheit der signalisierenden Rezeptoren angewiesen [BARBARA et al., 1999, LETAMENDIA et al., 1998]. Die Assoziation dieses akzessorischen Rezeptors mit T β R-I und -II hat regulatorischen Einfluss auf die Signalisierung durch TGF- β 1 [GUERRERO-ESTEO et al., 2002]. Es beeinflusst die ALK-1/Smad1 Signalisierung positiv, wirkt sich hingegen auf die ALK-5/Smad2/3-Signalisierung hemmend aus [BLANCO et al., 2005].

2.1.3.3 Signaltransduktion

Bioaktive Liganden der TGF- β Superfamilie benutzen einen relativ einfachen Mechanismus, um Signale in den Zellkern zu leiten [MASSAGUE und CHEN, 2000]. Ligandenbindung initiiert die Bildung eines heterotetrameren, aktiven Rezeptorkomplexes, bestehend aus zwei Typ-II und zwei Typ-I Rezeptoren [SCHMIERER und HILL, 2007].

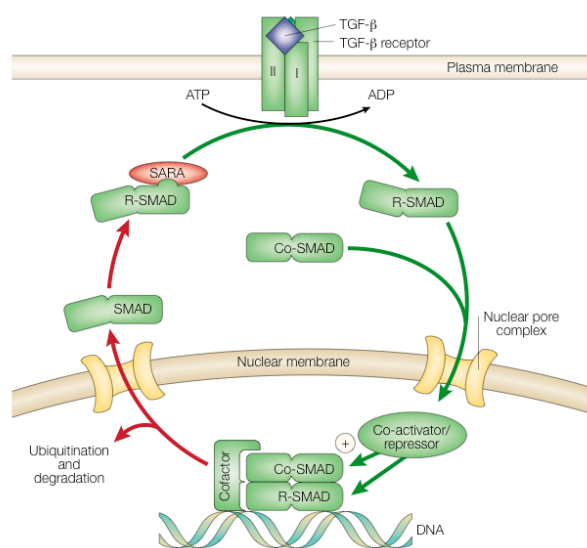


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Smad-Pathway; Quelle [MASSAGUE, 2000]

Innerhalb dieses Komplexes kommt es durch Phosphorylierung durch den T β R-II zur Aktivierung der Typ-I Rezeptor-Kinase, was wiederum die Phosphorylierung der intrazellulären Substrate Smad2 und 3 zur Folge hat [MIYAZAWA et al., 2002]. Diese Smad-Proteine sind in weiterer Folge für die Signalweiterleitung in den Zellkern verantwortlich [MASSAGUE, 1998].

Um den unkontrollierten Import von nicht phosphoryliertem Smad2 in den Zellkern zu verhindern, liegen die R-Smads im Zytoplasma an das Membran assoziierte SARA-Protein (Smad anchor for receptor activation) gebunden vor [XU et al., 2000]. Diese Bindung ist zusätzlich unerlässlich für die Zugänglichkeit der Smad-Proteine für die Membranrezeptoren [TSUKAZAKI et al., 1998].

Die Bindungsaffinität von Smad2 zu SARA wird durch die Phosphorylierung der R-Smads durch den Typ-I Rezeptor vermindert, wodurch der Signaltransport in das Zellkerninnere ermöglicht wird [XU et al., 2000]. Es kommt zur Ausbildung homomerer - und in weiterer Folge heteromerer Komplexe mit dem co-Smad Smad4, welche in den Zellkern translozieren, dort akkumulieren und die

Transkription von Zielgenen sowohl positiv als auch negativ regulieren [MIYAZAWA et al., 2002, ROSS und HILL, 2008]. Dabei interagieren sowohl R- als auch co-Smads mit weiteren DNA-bindenden Proteinen, welche wiederum an die Promotor-Regionen der Zielgene binden. [MIYAZAWA et al., 2002]. Typische TGF- β Zielgene sind zum Beispiel Plasminogen Activator Inhibitor 1 und Fibronektin (siehe Kapitel 2.1.3.4.1 und Kapitel 2.1.3.4.2)

Nach abgeschlossener Transkription wird die Signaltransduktion über den TGF- β Pathway durch Ubiquitinierung und anschließende Degradierung der nukleären Smads beendet [MOUSTAKAS et al., 2001].

Inhibitory Smad7 spielt eine wesentliche Rolle in der negativen Regulation der TGF- β Signalisierung. Es verhindert die Aktivierung der R-Smads durch Interaktion mit den aktiven T β R I und wird dabei von den Ubiquitin Ligasen Smurf1 und Smurf2 unterstützt [KAVSAK et al., 2000].

2.1.3.4 TGF-beta Zielgene PAI-1 und Fibronektin

2.1.3.4.1 PAI-1

Der Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) wurde 1984 zum ersten Mal als ein von Endothelzellen sezerniertes Protein und als wesentlicher Bestandteil der Fibrinolyse identifiziert [VAN MOURIK et al., 1984]. Es handelt sich dabei um ein 47 kDa großes Glykoprotein, das aus 379 Aminosäuren aufgebaut ist und der Familie der Serpine (= Serin Protease Inhibitoren) angehört [KRUIHOF, 1988]. Die Aminosäure Methionin ist in großen Mengen in dem Molekül vorhanden, wohingegen Cystein nicht in das Protein eingebaut ist. Das Fehlen dieser schwefelhaltigen Aminosäure wird für die biologische Instabilität der aktiven Form von PAI-1 verantwortlich gemacht [HUBER et al., 2001]. PAI-1 wird von den Zellen im latenten, inaktiven Zustand sezerniert und erst anschließend aktiviert [HEKMAN und LOSKUTOFF, 1985]. Aktives PAI-1 zirkuliert im Plasma mit hoher Affinität gebunden an das Glykoprotein Vitronektin [WIEMAN et al., 1988]. Vitronektin ist ein 70 kDa großes extrazelluläres Matrixprotein, das durch die Komplexbildung mit PAI-1 dessen

Aktivität stabilisiert [DECLERCK et al., 1988, WIMAN et al., 1988]. In Thrombozyten liegt PAI-1 zu 80 % in der inaktiven Form vor [HUBER et al., 2001].

PAI-1 ist ein wesentlicher Bestandteil des Plasminogenaktivator-Systems (PA-System), das sich außerdem aus den proteolytischen Aktivatoren t-PA (tissue-type PA) und u-PA (urokinase-type PA), Plasminogen und dessen Abbauprodukt Plasmin, sowie dem weiteren Inhibitor PAI-2 zusammensetzt [NICHOLL et al., 2006]. Die Regulation der beiden Plasminogen Aktivatoren spielt eine wesentliche Rolle in der Kontrolle pathologischer Prozesse wie der Fibrinolyse, Gewebsneubildung, Metastasierung oder dem Tumorwachstum [BOSMA et al., 1988]. PAI-1 ist ein sehr schnell wirkender spezifischer Inhibitor sowohl von t-PA, als auch von u-PA [MOTTONEN et al., 1992, BOSMA et al., 1988] und somit ein wichtiger Bestandteil in der Regulation der extrazellulären Proteolyse und Matrixdegradation.

Die proteolytische Aktivität von Zellen wird während deren Wachstum und Differenzierung durch das Zytokin TGF- β 1 reguliert [LAIHO et al., 1986b]. TGF- β 1 wurde schon früh mit einer erhöhten PAI-1 Synthese in zum Beispiel adulten Hautfibroblasten oder embryonalen Lungenfibroblasten, in Mink-, Maus- oder humanen Zelllinien in Verbindung gebracht [LAIHO et al., 1986a, LAIHO et al., 1986b, THALACKER und NILSEN-HAMILTON, 1987]. Die PAI-1 Expression wird seither als Maß für die Antwortfähigkeit von Zellen auf TGF- β 1 hergenommen und gilt als klassisches TGF- β 1 Zielgen [CHEN, 2007].

Der im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessanteste Aufgabenbereich von PAI-1 stellt die Beteiligung an der Zelladhäsion, -ablösung und -migration dar.

Der Prozess der Zellmigration ist sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel der Wundheilung oder Tumorerkrankungen, ein wesentlicher Bestandteil.

Die Zellen sezernieren die Serin Protease u-PA, welche in Folge einen Komplex mit ihrem an der Oberfläche befindlichen Rezeptor bildet. Über diesen Komplex sowie ebenfalls an der Zelloberfläche sitzende Integrine können die Zellen an

Matrixproteine, wie zum Beispiel Vitronektin, binden. PAI-1 ist in der Lage, über verschiedene Mechanismen, abhängig vom Zelltyp und den beteiligten extrazellulären Matrixproteinen, die Ablösung der Zellen zu fördern oder das Anheften zu verhindern [DENG et al., 2001].

PAI-1 kann sich an den bestehenden u-PA – u-PA Rezeptor – Integrin – Komplex anlagern, diesen somit inaktivieren und die Zelladhäsion unterbinden [CUBELLIS et al., 1990, CZEKAY et al., 2003]. Diese Inaktivierung des Komplexes endet in dessen, durch LRP-1 vermittelten, Endozytose in die frühen Endosomen. Während u-PA und PAI-1 in den späten Endosomen abgebaut werden, kommt es zu einem Recyclingprozess des LRP:uPAR:Integrin Komplexes, indem sich die drei Komponenten voneinander trennen und über recycling Vesikels zurück an die Zelloberfläche transportiert werden [CZEKAY et al., 2001].

Speziell die Migration aktivierter Makrophagen als Antwort auf akute Entzündungsprozesse ist von wesentlicher immunologischer Bedeutung. Cao et al. fanden heraus, dass ein Zusammenspiel von t-PA, PAI-1 und LRP unter Beteiligung des Integrins Mac-1 die Migration stimulierter Makrophagen bestimmt, wobei t-PA unterstützt von Mac-1 für die Zelladhäsion sorgt, diese durch PAI-1 gehemmt wird und die Zellablösung, wieder LRP-vermittelt, in der Endozytose des Komplexes endet [CAO et al., 2006].

2.1.3.4.2 Fibronectin

Fibronectin gilt ebenso wie PAI-1 als ein klassisches Zielgen von TGF- β 1. Eine erhöhte Expression des extrazellulären Matrixproteins wurde erstmal 1986 von Ignotz und Massagué mit TGF- β 1 in Verbindung gebracht [IGNOTZ und MASSAGUE, 1986].

Man unterscheidet die lösliche Form im Plasma und anderen Flüssigkeiten im Organismus, sowie die unlösliche Form im Bindegewebe [SALONEN et al., 1984]. Im Plasma kommt es in einer Konzentration von ca. 300 μ g/ml vor [HYNES und YAMADA, 1982].

Fibronectin ist ein ca. 440 kDa großes multifunktionelles Glykoprotein, welches als Dimer vorliegt [ALEXANDER et al., 1978, VUENTO et al., 1983]. Die beiden Untereinheiten des Glykoproteins werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden, ohne die das Molekül keine Funktionen ausüben könnte [WAGNER und HYNES, 1979, HYNES und YAMADA, 1982]. Die Hauptproduzenten von Fibronectin sind Fibroblasten und Endothelzellen, in geringeren Mengen ist es aber ebenso in vielen anderen Zellen zu finden [HYNES und YAMADA, 1982].

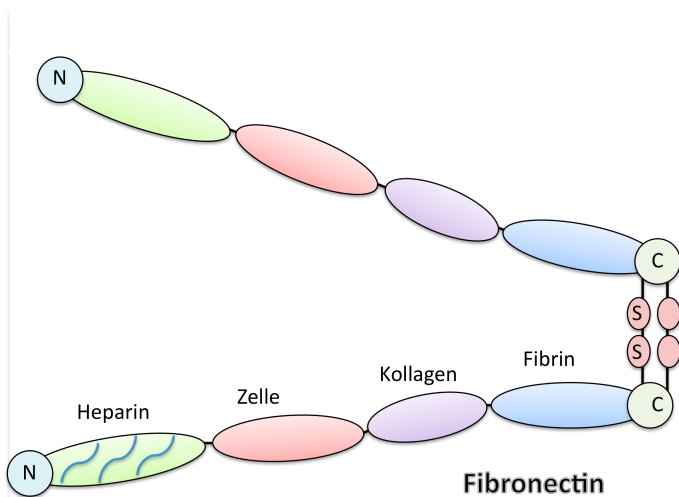


Abbildung 3: Bildliche Darstellung des Aufbaus eines Fibronectin-Moleküls; angelehnt an HYNES; 1982

Fibronectin besitzt mehrere spezifische Bindungsdomänen und ist somit in der Lage, viele makromolekulare Liganden, wie zum Beispiel Kollagen, Fibrin oder Glykosamine zu binden [VUENTO et al., 1983, HYNES und YAMADA, 1982].

Die komplexe Molekularstruktur besteht aus einer Kollagen-bindenden Domäne, die 30-40 kDa groß ist, einer Zell-bindenden

Domäne, die das Anheften der Zellen veranlassen kann, einer Fibrin-bindenden

Domäne, die zusätzlich andere Moleküle oder zum Beispiel Bakterien, bindet und einer aus drei hochmolekularen Fragmenten bestehenden Glykosaminoglykan-bindenden Domäne, die vor allem an Interaktionen mit Heparin beteiligt ist [HYNES und YAMADA, 1982, VUENTO et al., 1983].

Auf Grund dieses komplexen Aufbaus wirkt Fibronectin an vielen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, Zytoskelettorganisation, Migration und Differenzierung sowie Phagozytose und Hämostase mit [HYNES und YAMADA, 1982].

2.1.4 Biologische Funktionen vom Transforming Growth Factor-beta1

Die unterschiedlichen TGF- β Isoformen weisen verschiedene biologische Effekte auf [RENNER et al., 2002]. Sie regulieren eine Vielzahl zellulärer und physiologischer Prozesse, zu denen unter anderem die Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion oder -migration sowie die Apoptose zählen [MASSAGUE, 1998].

TGF-beta spielt somit eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Embryonalentwicklung, der Formation der Extrazellulärmatrix, der Wundheilung sowie der Angiogenese und ist in der Immunregulation und Tumorgenese involviert.

Veränderungen des TGF-beta Signalweges wurden im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen, u.a. Fibrosen, Autoimmunerkrankungen, [BLOBE et al., 2000], Chondrodysplasien und pulmonalen Hypertensionen oder Tumorerkrankungen, beobachtet.

2.1.4.1 TGF-beta im Zusammenhang mit Zellzyklus, –proliferation und -differenzierung sowie Apoptose

2.1.4.1.1 Zellzyklus

Die Zellteilung ist ein fundamentaler Prozess im Leben aller Eukarioten und dient der Verdopplung und Weitergabe genetischer Informationen. Die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl, die wiederum notwendig ist, um genügend Zellen für den fortlaufenden Gewebsauf- und –umbau bereitzustellen und gleichzeitig unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern [DONJERKOVIC und SCOTT, 2000, GILLETT und BARNES, 1998, EVAN und VOUSDEN, 2001].

Der aktive Zellzyklus wird in vier aufeinanderfolgende Phasen eingeteilt: Die Mitose (M), die G1 (gap1) – Phase, die DNA-Synthese (S) und die G2 (gap2) – Phase. Es wird zusätzlich eine fünfte Phase unterschieden, die G0 – Phase, von der aus inaktive, still liegende, jedoch lebens- und wachstumsfähige Zellen direkt in den aktiven Zellzyklus übergehen können. Jeder einzelne Schritt wird streng reguliert, sodass die nächste Phase erst eingeleitet wird, wenn die vorherige erfolgreich abgeschlossen ist. Ob eine Zelle den Zyklus durchläuft oder nicht wird über 2 Checkpoints über eine Vielzahl von Proteinen reguliert [DONJERKOVIC und SCOTT, 2000]. Beschädigte Zellen werden dem Zellzyklus entzogen.

Die drei beteiligten Hauptkomponenten des Zellzyklus stellen die aktivierenden Enzyme, auch CDKs (cell division cycle kinases) genannt, deren sie aktivierenden Cycline sowie deren Inhibitoren, die CKIs, dar [DOREE und GALAS, 1994].

2.1.4.1.2 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der im Gegensatz zur Nekrose physiologischer Natur ist. Er ist lebenswichtig für den Organismus,

um einen regelmäßigen Zellersatz zu ermöglichen. Durch festgelegte, intrazelluläre Signalwege werden überflüssige, kranke oder beschädigte Zellen eliminiert. Es erscheint paradox, aber auch für die Differenzierung ist die Apoptose von Bedeutung, so werden zum Beispiel nach Aufbau und Stützung bestimmter Gewebe nicht mehr benötigte Zellen wieder abgebaut [VAUX und KORSMEYER, 1999] THEWS et al., 1999, HUG, 2000.

Die Apoptose wird experimentell durch unterschiedliche Stimuli wie UV-Licht, H₂O₂ oder IL-2 ausgelöst, wobei die Zellen unterschiedlich auf diese Faktoren reagieren. Entscheidend für die Einleitung der Apoptose sind unter anderem der Differenzierungszustand oder die derzeitige Position der betroffenen Zelle im Zellzyklus [HUG, 2000].

2.1.4.1.3 Das Proto-Onkogen c-Myc

c-Myc ist eines der ersten Proto-Onkogene, welches identifiziert wurde. Es ist Mitglied der Myc-Familie, die wiederum der bHLHZ (basic helix-loop-helix-leucine-zipper) – Familie der Transkriptionsfaktoren angehört. Sie sind sehr kurzlebige Phosphoproteine, die vor allem im Zellkern lokalisiert sind.

Durch Heterodimerisierung mit ihrem Partner-Protein Max können die Myc-Proteine ihre Wirkung entfalten, indem die entstandenen Myc-Max-Komplexe die Transkription ihrer Zielgene aktivieren [GRANDORI und EISENMAN, 1997].

Forschungsergebnisse, dass die Gene der myc-Familie vor allem während der Embryogenese exprimiert werden [MOENS et al., 1992], eine verminderte c-Myc Expression mit der Hinderung der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten, einhergeht [ROUSSEL et al., 1991] oder, dass proliferationshemmende Liganden wie TGF-beta die c-Myc Expression hemmen [PIETENPOL et al., 1990, MUNGER et al., 1992, WARNER et al., 1999], ließen früh darauf zurückschließen, dass die Expression des Proteins stark mit dem Wachstum und der Proliferation von Zellen korreliert. Die Expression des Gens p15 wird durch Myc, in An- und Abwesenheit von TGF-β1, unterdrückt, was maßgeblich an der Hemmung der Zellproliferation beteiligt ist [WARNER et al., 1999]; die Transkription der Gene, deren Proteine sich stimulierend auf den

Zellzyklus auswirken, wie zum Beispiel CDK4 oder diverse Cycline, wird durch c-Myc positiv beeinflusst.

In ruhenden Zellen konnte in vitro die Myc-Expression kaum gemessen werden, wohingegen sich replizierende Zellen eine hohe c-Myc Konzentration aufweisen [PELENGARIS et al., 2002]. Die Kontrolle in gesunden Zellen wird vor allem von Wachstumsfaktoren übernommen [BOUCHARD et al., 1998].

Eine unkontrollierte Expression des Gens, in Unabhängigkeit von den regulierenden Wachstumsfaktoren, konnte sehr häufig bei Tumorerkrankungen festgestellt werden [MATSUURA et al., 2004]. Die uneingeschränkte Proliferation kann dann nur mehr durch die Einleitung der Apoptose durch c-Myc selbst unterbunden werden, als Selbstschutz, um den Organismus vor dem Wuchern der Tumorzellen zu bewahren [BOUCHARD et al., 1998]. Dass Myc unter bestimmten Umständen den programmierten Zelltod hervorrufen kann, wurde in zahlreichen Studien bestätigt [EVAN und LITTLEWOOD, 1998].

Diese beiden kontroversen Prozesse, die durch den Einfluss ein und desselben Proteins ausgelöst werden, laufen jedoch nicht zwangsweise abhängig voneinander ab. So stellten Rudolph et al. fest, dass eine Hemmung der Myc-induzierten Proliferation durch überhöhte CKI-Konzentrationen nicht gleichzeitig die Unterdrückung Myc-bedingter Apoptose mit sich bringt [RUDOLPH et al., 1996].

2.1.4.1.4 Wachstumskontrolle durch TGF-beta 1

TGF- beta1 wirkt sich auf Endothel-, Myeloid- sowie die meisten Epithelzellen, inklusive vieler Karzinomzellen, und auf Lymphozyten wachstumshemmend aus, wobei der Mechanismus vom Zelltyp abhängig ist [LEE und BAE, 2002]. Hingegen konnte zum Beispiel in Mesenchymzellen eine wachstumssteigernde Wirkung von TGF- β festgestellt werden [BATTEGAY et al., 1990].

TGF-beta vermittelter Wachstumsstopp resultiert aus der Blockade der G1-Phase des Zellzyklus, die in den meisten Fällen reversibel ist, manchmal jedoch auch zur Zelldifferenzierung oder zum programmierten Zelltod führt [LEE und BAE, 2002].

Die Zellzyklusregulatoren c-Myc, p15 und p21 zählen zu den TGF-beta Zielgenen, sodass deren Transkription unter anderem durch die Smads reguliert wird. Smads, insbesondere Smad3, können durch CDK4 und CDK2 phosphoryliert werden, was laut Matsuura et al. unter physiologischen Bedingungen zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Smad3 führt und somit zur erhöhten c-Myc und erniedrigten p15- und p21 Expression [MATSUURA et al., 2004].

Die beiden antiproliferativen Wirkungsmechanismen von TGF-beta1 stützen sich somit auf die Induktion der CKIs und auf die Inhibition von c-Myc [LEE und BAE, 2002].

Die direkte Hemmwirkung auf c-Myc führt in Lungenepithelzellen bzw. Keratinozyten automatisch zur Aktivierung der die G1 Phase des Zellzyklus still legenden p15- bzw. p21-Pathways [WARNER et al., 1999, CLAASSEN und HANN, 2000].

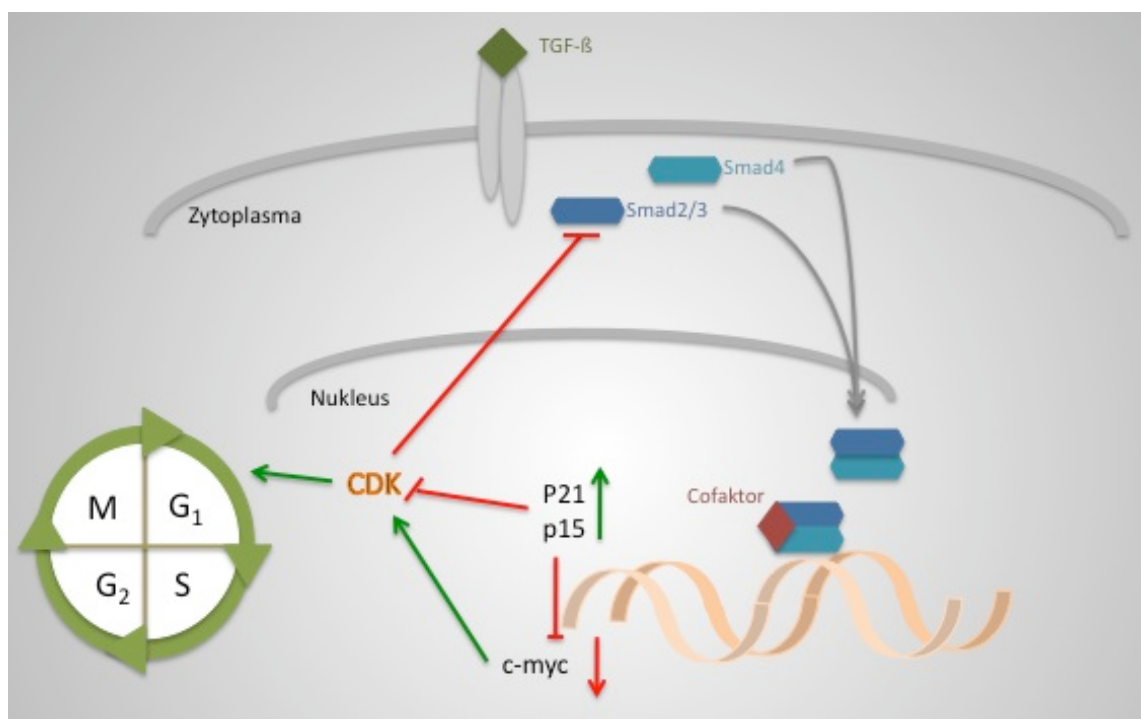


Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Zusammenhänge zwischen TGF-β1 und der Zellzyklusregulation

2.1.4.1.5 TGF-beta induzierte Apoptose

In vielen Fällen konnten proapoptotische Effekte des TGF-beta Signalweges nachgewiesen werden.

TGF- β 1 mediierte Apoptose spielt zum Beispiel eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der B- und T-Zellhomöostase [SCHUSTER und KRIEGLSTEIN, 2002]. Die Fähigkeit in Lymphozyten die Apoptose einzuleiten, ist eventuell ein wichtiger Aspekt in der immunsuppressiven Wirkung von TGF-beta [ELLIOTT und BLOBE, 2005].

In zahlreichen Studien konnten zudem Zusammenhänge zwischen TGF- β induzierter Apoptose und der Gewebsformation und -neubildung zum Beispiel während der Kapillarmorphogenese oder der Differenzierung und Erhaltung von Leberzellen festgestellt werden [CHOI und BALLERMANN, 1995, TERAMOTO et al., 1998, YU et al., 2008].

Landström et al. konnten erhöhte TGF-beta1- sowie TGF β -Rezeptorenspiegel mit der Apoptose in Prostatakarzinomzellen in Verbindung bringen [LANDSTROM et al., 1996].

Der Mechanismus, über den TGF- β die Apoptose einleitet, ist zelltypabhängig, wird aber in den meisten Fällen durch den Smad abhängigen Pathway mediiert.

Einige Tumorzellarten entwickeln eine gewisse Resistenz gegenüber der TGF- β 1 induzierten Apoptose, was wahrscheinlich eine bedeutsame Komponente der Tumorgenese darstellt, insbesondere für solche Arten von Tumoren, die aus Geweben entstehen, in denen TGF- β 1 eine wichtige Apoptose regulierende Rolle einnimmt, wie zum Beispiel Leber- oder Prostatakarzinome [ELLIOTT und BLOBE, 2005, YAMAMURA et al., 2000].

2.1.4.2 Immunsystem und TGF-beta 1

Einen wesentlichen Bestandteil des angeborenen oder unspezifischen Immunsystems stellen die aus Blutmonozyten gebildeten Makrophagen dar, die in der Lage sind, Bakterien zu phagozytieren. Die ursprünglichen Monozyten sind mit einem Durchmesser von 12-20 µm die größten Blutzellen, die im Knochenmark heranreifen, wo sie ihre Funktionsfähigkeit erlangen. Nach Eintritt in den Blutstrom können sie ins umliegende Gewebe wandern, wo sie zu Makrophagen differenzieren [THEWS ET AL., 1999; LÖFFLER, 2003]. Während eines Entzündungsprozesses reagieren Blutmonozyten auf chemotaktische Faktoren und wandern umgehend ins umliegende entzündete Gewebe [LIN et al., 1995]. TGF-beta1 besitzt chemotaktische Wirkung auf promonozytäre leukämische Zellen, die zu Makrophagen differenzieren können. Durch das Zytokin wird das Wachstum der Monozyten gehemmt, es kommt zu morphologischen Veränderungen und die Adhärenz der Zellen wird gefördert. TGF-beta1 ist somit in der Lage, die Reifung von Monozyten zu Makrophagen zu fördern [BOMBARA und IGNOTZ, 1992].

Der Monozyteneintritt in entzündetes Gewebe und die Migration in die extrazelluläre Matrix sind mehrschrittige Prozesse, zu denen das Anheften an extrazelluläre Matrixproteine, darauffolgende Ablösung und der Durchtritt durch die EZM gehören [BAUVOIS et al., 1996]. Entzündetes Gewebe ist reich an EZM-Proteinen, insbesondere an Fibronectin. [WANG und FU, 2001].

Durch TGF-β1 kann, wie bereits beschrieben, die Adhäsion von Zellen gefördert werden, indem es die Synthese extrazellulärer Matrixproteine, wie Fibronectin oder Vitronectin, steigert, den Abbau der EZM durch erhöhte Expression der Inhibitoren (PAI-1 z.B.) der proteolytischen Enzyme verhindert, und zuletzt das Repertoire der für die Adhäsion unerlässlichen Oberflächenrezeptoren aufstockt [MASSAGUE et al., 1990].

Es wurden sowohl immunsuppressive als auch immunpromovierende Eigenschaften von TGF-beta1 nachgewiesen, wobei sich die suppressiven

Eigenschaften auf den Einfluss auf Zellwachstum oder den programmierten Zelltod stützen, wohingegen sich die promovierenden Eigenschaften durch die Effekte auf die Zellmigration, -invasion oder aber die Angiogenese begründen [ELLIOTT und BLOBE, 2005].

2.1.4.3 Regulatorische Effekte von TGF-beta auf den Auf- und Umbau der Extrazellulärmatrix

TGF-beta1 ist an der Bildung der EZM beteiligt, indem es zum Beispiel Fibroblasten und andere Zellen stimuliert, EZM-Proteine und Zelladhäsionsmoleküle, wie Fibronectin (s. Kapitel 2.1.3.4.2) oder Integrine, zu produzieren.

Außerdem vermindert TGF- β 1 die Produktion der EZM-abbauenden Proteine, wie zum Beispiel die Kollagenasen, und erhöht die Produktion der Proteine, die die EZM-abbauenden Enzyme hemmen, unter anderem PAI-1 (s. Kapitel 2.1.3.4.1) und Gewebisinhibitoren der Metalloproteinasen [MASSAGUE et al., 1990, WANG et al., 1998].

2.1.4.4 TGF-beta im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorerkrankungen

TGF-beta übernimmt zwei kontroverse Aufgaben während der Karzinogenese: anfänglich wirkt es suppressiv auf die Tumorentwicklung, jedoch stimuliert es in fortgeschrittenen Stadien die Invasion und Metastasierung maligner Zellen.

Diese weisen, verglichen mit gesunden Zellen, einige Besonderheiten auf, die unter anderem die Resistenz gegen wachstumshemmende Faktoren, die Proliferation unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren und die Metastasierung oder die Umgehung apoptotischer Signale umfassen. Die Tumorgenese ist ein Prozess, der auf der Störung von Signalwegen basiert, die normalerweise für die Kontrolle der Zellhomöostase zuständig sind. Einer dieser

Signalwege ist der zuvor ausführlich beschriebene TGF-beta Pathway [ELLIOTT und BLOBE, 2005].

In mehr als 85 % aller menschlichen Karzinome konnte eine gewisse Resistenz gegenüber der TGF-beta-vermittelten Wachstumshemmung nachgewiesen werden. Grady et al. untersuchten dieses Phänomen während colorektaler Karzinogenese und bestätigten es in 55 % der Fälle [GRADY et al., 1999]. Störungen in der Expression am Pathway beteiligter Komponenten werden als Ursachen für diesen Wirkungsverlust beschrieben [PASCHE, 2001]. Kim et al. wiesen z.B. die verminderte Expression von TßR-II in Lungenkarzinomzellen nach und Kleef et al. die erhöhte Hemmung des Signalweges durch Inhibitory-Smad7 in Pankreaskarzinomzellen [KIM et al., 1999, KLEEFF et al., 1999].

Unter normalen physiologischen Bedingungen fördert TGF-beta 1 die Zelladhäsion durch den Aufbau der Extrazellulärmatrix (s. Kapitel 2.1.4.3). Während der Tumorgenese stimuliert TGF-beta jedoch die proteolytische Aktivität von Tumorzellen, indem es die Expression von Matrix abbauenden Enzymen erhöht [DESRUISSEAU et al., 1996, MAEHARA et al., 1999]. Der Abbau der Basalmembran und der Extrazellulärmatrix ist ein wesentlicher Schritt in der Streuung maligner Zellen [WOODHOUSE et al., 1997].

Eine Vielzahl von Tumorzellen weisen eine wesentlich höhere TGF-beta-Sekretion auf als „normale“ Zellen, was eine Schwächung des Immunsystems und die Erleichterung der Metastasierung mit sich bringt [PASCHE, 2001].

Neben diesen Effekten ist TGF-beta in eine Vielzahl biologischer Effekte involviert und die Wichtigkeit, diese bis ins kleinste Detail zu erforschen und in einen großen Zusammenhang zu bringen, bleibt weiterhin bestehen.

2.2 Laktoferrin

Laktotferrin ist ein 80 kDa großes, monomeres Glykoprotein, welches auf Grund seiner Aminosäuren Sequenz und seiner kristallinen Struktur der Transferrin Familie angehört [METZ-BOUTIGUE et al., 1984]. Es wurde 1939 erstmals als „rotes Protein“ in boviner Milch beschrieben [GROVES, 1960] und 1960 aus humaner und boviner Milch isoliert [JOHANSON, 1960]. Laktoferrin ist ein eisenbindendes Protein, welches in hohen Konzentrationen überwiegend in Milch, in geringeren jedoch auch in anderen biologischen Flüssigkeiten wie Speichel, Tränen, Pankreas- oder Genitalsekreten, vorkommt [MASSON et al., 1966]. In der Milch liegt es vor allem in nicht gebundener Form vor. Die eisenfreie Form wird apo-Form genannt, das wesentlich stabilere, mit Eisen besetzte Laktoferrin, stellt die holo-Form dar [BAKER und BAKER, 2005].

2.2.1 Struktur

Laktotferrin ist in einen C- und einen N-terminalen Lappen geteilt, die wiederum aus 2 Domänen aufgebaut sind, den C₁ – und C₂-,

sowie N₁- und N₂- Domänen.

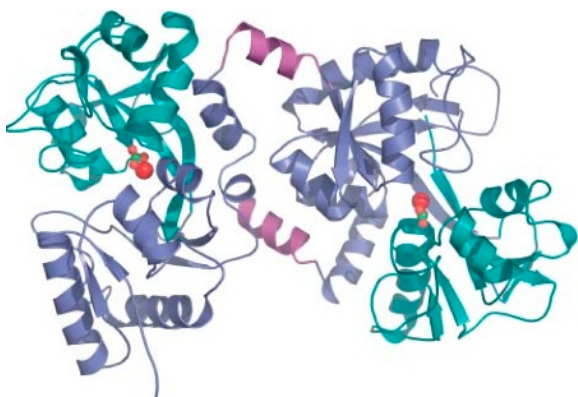


Abbildung 5: Bildliche Darstellung der kristallinen 3-D Struktur eines Laktoferrin-Moleküls; Quelle: Baker 2005

Die beiden homologen Lappen sind über eine α -Helix-Struktur miteinander verbunden. Die beiden Domänen eines jeden Lappens umschließen jeweils ein Fe^{3+} -Ion [BAKER et al., 1987], sodass ein Laktoferrin Molekül in der Lage ist, 2 Eisenatome mit hoher Affinität zu binden [METZ-BOUTIGUE et al., 1984]. Neben Eisen können durch

Laktotferrin auch noch einige andere Metallionen, wie zum Beispiel Zink, Kupfer

oder Mangan, gebunden werden, jedoch mit geringerer Affinität [BAKER et al., 1994].

2.2.2 Eigenschaften und Funktionen

Die tatsächliche Funktion von Laktoferrin blieb lange Zeit ungeklärt und war zentraler Forschungspunkt der letzten Jahre. Mittlerweile sind viele Eigenschaften des multifunktionellen Proteins beschrieben; dazu gehören unter anderem die antibakterielle, antivirale, antikanzerogene und antiinflammatorische Wirkung, sowie die Modulation der Immunantwort oder die Regulation von Zellwachstum- und differenzierung [BAKER und BAKER, 2005]. 2003 wurde Laktoferrin eine Serin-Protease-Funktion nachgewiesen [HENDRIXSON et al., 2003], 2004 wurde es mit der Regulation des Knochenwachstums in Verbindung gebracht [CORNISH et al., 2004] und 2008 konnte eine Verbesserung der chemotherapeutischen Wirkung durch Laktoferrin nachgewiesen werden [KANWAR et al., 2008].

Viele der biologischen Funktionen von Laktoferrin, wie die Eisenhomöostase, antioxidative Eigenschaften, die antibakterielle-, antivirale sowie antikanzerogene Wirkung oder Immunmodulation können auf dessen eisenbindende Fähigkeit zurückgeführt werden. Einige andere Aufgaben, die Laktoferrin übernimmt, wie zum Beispiel die proteolytischen Aktivitäten oder die Bindung vieler biologischer Moleküle und Zellen, sind jedoch unabhängig dieser Fähigkeit zu betrachten [BAKER und BAKER, 2008].

Einige pathogene Erreger haben Mechanismen gegen die bakterizide Wirkung von LF entwickelt. Bestimmte Gram negative Bakterien der Neisserien Familie haben zum Beispiel spezielle Rezeptoren entwickelt, an das Eisen von LF zu gelangen [LING und SCHRYVERS, 2006, YU und SCHRYVERS, 2002], wohingegen Stämme des Gram positiven *Staphylococcus pneumoniae* über das OF-Protein PspA an LF binden und somit Pneumokokken vor der bakteriziden Wirkung von LF schützen [SENKOVICH et al., 2007].

Laktoferrin hat seinen Isoelektrischen Punkt bei pH 9. Auf Grund seiner kationischen Beschaffenheit bindet es folglich anionische Moleküle, was eine hohe Bindungsaffinität zu Immun- sowie allen anderen Zellen im Organismus mit sich bringt [BAKER und BAKER, 2005].

Das Binden von Laktoferrin an die Zellen kann zur Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der Immunzellen führen [LEGRAND et al., 2006, BAKER_2005, BAVEYE, 2000, MIYAZAWA 1991]. Die spezifische Bindung setzt die Anwesenheit von geeigneten Rezeptoren voraus, die bereits in zum Beispiel Lymphozyten, Hepatozyten oder Enterozyten nachgewiesen wurden. [SUZUKI und LÖNNERDAL, 2005]. Hauptsächlich verantwortlich für die Signalisierung, Endozytose und Weiterleitung von Laktoferrin in den Zellkern sind Proteoglykane, Nucleolin und low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs) [LEGRAND et al., 2006].

Proteoglykane, die an der Zelloberfläche sitzen, binden häufig an biologisch aktive Moleküle und vermitteln diese anschließend an spezifischere Rezeptoren [LEGRAND et al., 1997].

Die Bindungsaffinität zwischen Proteoglykanen an Immunzellen und Laktoferrin ist sehr niedrig, jedoch ist erwiesen, dass die hohe Bindungsdichte von Laktoferrin an Zelloberflächen durch Proteoglykane vermittelt wird. Somit wird vermutet, dass nach Bindung an die Proteoglykane die Abgabe von Laktoferrin an die weitaus

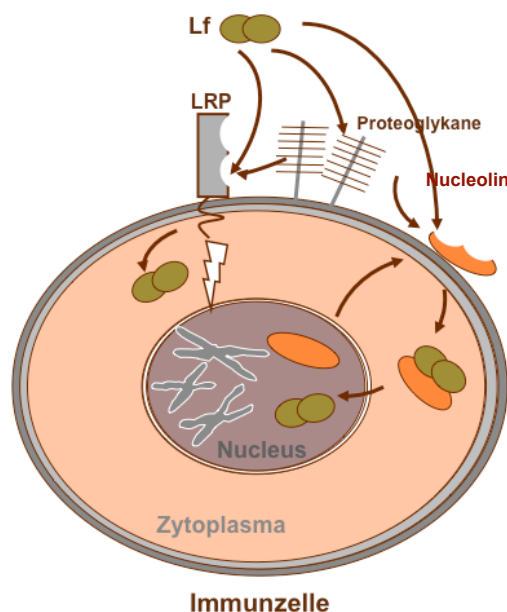


Abbildung 6: Graphische Darstellung der molekularen Interaktionen zwischen Laktoferrin und Proteoglykanen, Nucleolin und LRP; angelehnt an die Graphik aus Legrand 2006

spezifischeren Rezeptoren Nucleolin und LRP erfolgt. Die Bindung mit Nucleolin resultiert in der Endozytose von Laktoferrin und Weiterleitung beider Moleküle in den Zellkern, wohingegen der Interaktion des Glykoproteins mit LRP dessen Endozytose folgt und/oder die Aktivierung der Signalvermittlung [LEGRAND et al., 2006].

2.2.2.1 Laktoferrin im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen

Neben den oben genannten biologischen Flüssigkeiten, stellt Laktoferrin auch einen wesentlichen Bestandteil der neutrophilen, sekundären Granulozyten dar [MASSON 1969; BAGGIOLINI et. al, 1970], die eine bedeutende Rolle in der unspezifischen Immunabwehr einnehmen. Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose sind sie in der Lage, Fremdmaterialien sowie Krankheitserreger aufzunehmen und abzubauen [THEWS et al, 1999].

Im gesunden Organismus ist das Glykoprotein nicht grundsätzlich auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten nachweisbar, es wird jedoch während Entzündungen vermehrt von diesen Zellen freigesetzt und ist in stärkerem Ausmaß auf deren Oberfläche zu finden. Aus diesem Grund dient Laktoferrin als Marker für die Aktivierung sekundärer neutrophiler Granulozyten [AFELTRA et al., 1997]. Als Folge der steigenden Anzahl und vermehrten Freisetzung der Granulozyten steigt der Laktoferrinspiegel in biologischen Flüssigkeiten, vor allem Blut, während akuter Entzündungsprozesse stark an [BENNETT und KOKOCINSKI, 1978, BIRGENS et al., 1985].

Die antiinflammatorische Aktivität von Laktoferrin basiert auf Interaktionen mit exogenen entzündungsfördernden Molekülen. Den hauptsächlichen Anteil derer machen die Lipopolysaccharide aus. Durch die Bindung von LPS können diese in Folge nicht mehr mit ihren Rezeptoren interagieren, wodurch die vermehrte Produktion von Entzündungszytokinen unterbunden wird [BAVEYE et al., 1999]. In THP-1 Monozyten reguliert Laktoferrin die Zytokinexpression auf transkriptioneller Ebene, indem es zur Verminderung der LPS-induzierten

Zytokinproduktion führt. Diese Hemmwirkung ist entweder auf die Bindung von Laktoferrin an LPS zurückzuführen, oder aber auf die Unterbindung der Interaktionen zwischen LPS und LBP (LPS-binding protein), indem es mit LBP um die Bindung zu LPS konkurriert [HAVERSEN et al., 2002]. Laktoferrin bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene Rezeptoren an monozytären Zellen, wird in die Zelle aufgenommen und in den Zellkern transportiert. In der Zelle schützt Laktoferrin diese vor Autoperoxidation [BRITIGAN et al., 1991].

2.2.2.2 Signaltransduktion

Die molekularen Mechanismen, über die Laktoferrin auf zellulärer Ebene agiert und seine zahlreichen biologischen Aktivitäten ausübt, sind weitgehend unerforscht. Jedoch konnte in unterschiedlichen Studien bisher ein Zusammenhang zwischen Laktoferrin-induzierten Effekten und deren Weiterleitung durch LRP-1 festgestellt werden. In verschiedenen Zellen erwies sich LRP-1 als wesentlicher Modulator derer migratorischen und kontraktiven Aktivitäten, indem es den ERK/MAPK Signaltransduktionsweg reguliert [TAKAYAMA et al., 2003]. 2003 wurde dieses Erkenntnis in einer Studie mit Fibroblasten bestätigt und auch in Osteoblasten stellte sich LRP-1 für die Weiterleitung der Laktoferrin-induzierten mitogenen Effekte als verantwortlich heraus [TAKAYAMA et al., 2003, GREY et al., 2004]. Laktoferrin stimuliert die Osteoblastenmitogenese, LRP-1 vermittelt, über den p42/44 MAPK Pathway [GREY et al., 2004]. In Makrophagen erzielt LF seine immunologischen Effekte durch Interaktionen mit TLR4-abhängigen – sowie TLR4-unabhängigen – Pathways [CURRAN et al., 2006]. Wie diese Erkenntnisse zeigen, signalisiert Laktoferrin über viele unterschiedliche Pathways, was es in Zukunft weiterhin zu untersuchen gilt.

2.2.2.3 Low-density lipoprotein receptor-related protein – 1 (LRP-1)

LRP-1 ist ein multifunktionelles, endozytotisches Glykoprotein, das der Familie der LDL-Rezeptoren angehört [NEELS et al., 1999, HERZ et al., 1990]. LRP-1 wird im Endoplasmatischen Retikulum als 600 kDa große Vorstufe synthetisiert und im Golgi Apparat durch die Endoproteinase Furin in eine 515 kDa und eine 85 kDa große Untereinheit geteilt [HERZ et al., 1990, WILLNOW et al., 1996]. Bei LRP handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor, der eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Liganden erkennt, mit hoher Affinität bindet und deren Internalisierung einleitet [HERZ et al., 1988, NEELS et al., 1999, HERZ und STRICKLAND, 2001]. Zu diesen Liganden gehören unter anderem t-PA und u-PA, MMP-9, PAI-1 und Laktoferrin [HERZ und BEFFERT, 2000].

LRP-1 ist aus einer großen extrazellulären, einer kleinen transmembranen sowie einer zytoplasmatischen Domäne aufgebaut [HERZ et al., 1988]. Die extrazelluläre Domäne stellt den Teil des Moleküls dar, der hauptsächlich für die Erkennung und anschließende Bindung der Liganden zuständig ist. Er besitzt vier geclusterte

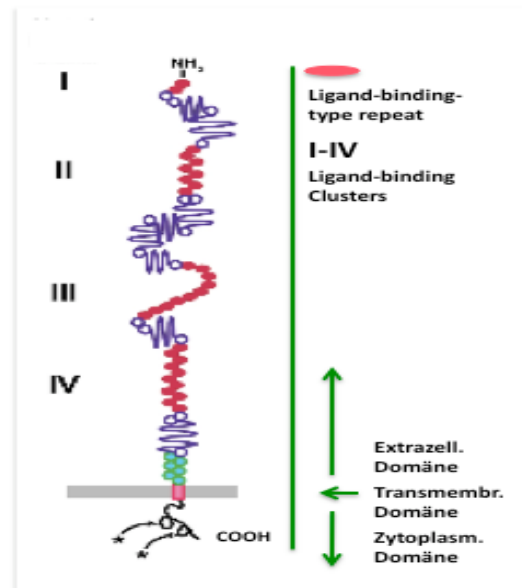


Abbildung 7: Struktureller Aufbau eines LRP-1 Moleküls; Ausschnitt der Graphik aus HERZ und STRICKLAND;2001

Liganden-Bindungs-Einheiten, die als Cluster I – IV bezeichnet werden [NEELS et al., 1999]. Bisher konnten Liganden Interaktionen mit dem LRP-1 Molekül nur über die Cluster II, III und IV nachgewiesen werden [HERZ und STRICKLAND, 2001]. Auf Grund dieser vielseitigen Bindungskapazität für unterschiedlichste Liganden ist LRP-1 in diverse biologische Prozesse involviert. Es übernimmt unter anderem Funktionen im Lipidstoffwechsel und der Homöostase von Proteasen sowie deren Inhibitoren, ist beteiligt am zellulären Eintritt

verschiedener Toxine und Viren. Nicht nur die extrazellulären Domänen, sondern auch die Adapterproteinbindungsstellen auf der intrazellulären Domäne (ICD) sind in der Lage, viele zytoplasmatische Proteine zu binden, wodurch LRP-1 in zelluläre Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel dem MAP-Kinase-Signalweg, mit eingebunden ist [HERZ und STRICKLAND, 2001].

Im Zusammenhang mit der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurde die Expression von LRP-1 während dieses Vorganges induziert, weshalb LRP-1 ebenso wie Endoglin und MMP-9 als Differenzierungsmarker für Makrophagen gilt [WATANABE et al., 1994]. LRP-1 weist eine hohe Bindungsaffinität zu MMPs, insbesondere zu MMP-9, auf, welches so einen der zahlreichen Liganden von LRP-1 darstellt [BERNHARD et al, 1995].

2.2.2.3.1 Matrix Metalloproteinase 9

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, Bestandteile der EZM abzubauen. Viele Untersuchungen eröffneten die Erkenntnis, dass die MMPs in viele physiologische und pathologische Prozesse, wie Wundheilung, Entzündungen oder Tumorerkrankungen involviert sind [MASSOVA et al., 1998]. Schon früh zeigten in vitro Studien, dass sich die Inhibitoren der MMPs, die TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), hemmend auf die Fähigkeit von Tumorzellen zur Metastasenbildung auswirken, wodurch MMPs in direkten Zusammenhang mit der Aktivität metastasierender Zellen gebracht werden konnten. [SCHULTZ et al., 1988].

Speziell das 92 kDa große Enzym MMP-9 wird in hohem Ausmaß in vielen Tumorzellarten exprimiert [BERNHARD et al., 1994].

3 Material & Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien/Reagenzien	Bezugsfirma
Laminar Flow Hood	Biosafe 2 Ehret
Brutschrank	Queue
Mikroskop	Zeiss Axiovert
Casy®	Schärfe
Pipetus®- Aku	Hirschmann
Trockenschrank	Binder
Zellkulturflaschen	Greiner
6-Well, 96-Well, 24-Well-Platten	Greiner
Wasserbad	Thermo-Boy MGW Lauda
RPMI 1640	Biochrom AG
L-Glutamin	PAA
FCS	Gibco
Ethanol 70 %	MERCK
TGF-β1, human rekombinant	Calbiochem
bLF	Morinaga Milk Industry
HCl 4mM	MERCK
BSA 0,1 %	Amresco
1 x PBS (sterilfiltriert)	
PMA	Sigma
Penicillin-Streptomycin	PAA

3.1.2 Verwendete Zellkulturbedingungen

In der Zellkultur wird ausschließlich in einer sterilen Werkbank unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um mikrobielle Kontaminationen der Zellen zu vermeiden. Daher werden für Arbeiten in der Zellkultur entweder sterile Einwegprodukte oder bei 160 °C sterilisierte Glasmaterialien verwendet. Plastikpipettenspitzen werden vor Gebrauch autoklaviert. Zusätzlich werden Ständer und Pipetten vor Verwendung in der Zellkultur, sowie die Hände mit 70%igem Ethanol gereinigt. Zur Desinfektion wird über Nacht UV-Licht in der Werkbank eingeschaltet.

Das Arbeiten erfolgt unter einem permanenten Luftstrom, wodurch die Luft nahezu keimfrei gehalten werden kann.

3.1.3 Zelllinie : THP-1 Zellen

Bei den, für alle Untersuchungen verwendeten, THP-1 Zellen handelt es sich um eine humane monozytäre leukämische Zelllinie. Die Monozyten wurden 1980 erstmalig vom Blut eines einjährigen Jungen isoliert, der an akuter monozytärer Leukämie erkrankt war [TSUCHIYA et al., 1980].

Schon bald wurde die Fähigkeit der Zellen entdeckt, unter bestimmten Bedingungen zu Makrophagen heranzureifen, was diese Zelllinie zu einem gängigen Modell machte, die Reifung und Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, sowie den Mechanismus der Phagozytose zu untersuchen [TSUCHIYA et al., 1982].

3.1.3.1 Differenzierung der monozytären THP-1 Zellen zu Makrophagen

Die monozytären THP-1 Zellen differenzieren durch PMA (phorbol12-myristat13-acetate) - Stimulierung zu Makrophagen [AUWERX et al., 1988], die sich morphologisch stark von den THP-1 Monozyten unterscheiden. Durch Differenzierung mit Phorbolestern werden die THP-1-Zellen adhärent, die Anzahl der Mikrovilli und Vesikel nimmt ab, wohingegen das raue Endoplasmatische Retikulum weiter entwickelt ist und die Anzahl der freien Ribosomen zunimmt [TSUCHIYA et al., 1982].

Nach Zugabe des Phorbolesters PMA in einer Konzentration von 160 nM dauert die vollständige Ausdifferenzierung bei Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre ca. 72 Stunden.

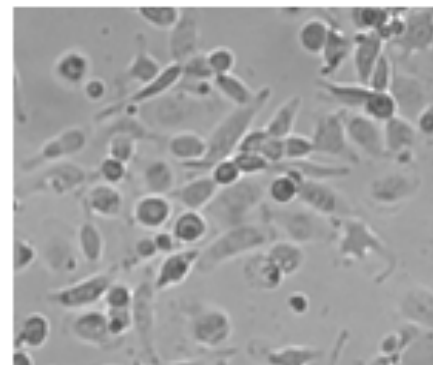
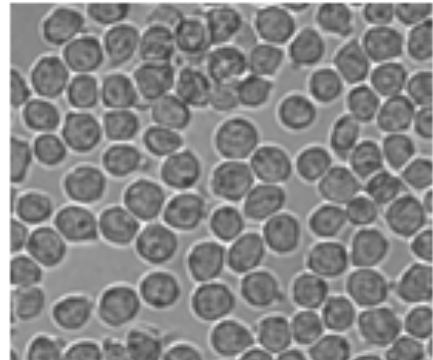


Abbildung 8: Mikroskopische Darstellung der THP-1 Monozyten(oben) und der durch PMA-Stimulierung zu Makrophagen differenzierten THP- 1 Zellen.

3.1.4 Züchten der Zellen

THP-1 Zellen werden als Suspensionszellen in sterilen Zellkulturflaschen bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert, wobei sich 20-30 ml Zellsuspension in einer Flasche befinden.

3.1.4.1 Füttern der Zellen

Vor dem Füttern wird die Zellkulturflasche kurz geschwenkt, ohne dass Zellsuspension in den Flaschenhals gelangt. Anschließend wird die Flasche unter der Laminar vorsichtig geöffnet und die Suspension mit dem Pipetus Akku und einer Glaspipette durchmischt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Die Zellzahl wird mit Hilfe des Casy bestimmt.

Die Zellen werden dreimal pro Woche mit frischem Medium gefüttert und auf 0,5 Mio Zellen/ml eingestellt.

3.1.4.2 Zellkulturmedium RPMI 1640

Bei dem Medium handelt es sich um RPMI 1640; es wurde nach dem Roswell Park Memorial Institute benannt, wo es Mitte der 60er Jahre von Moore et al. entwickelt wurde.

Es wird zu 10 % mit FCS, mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin unter sterilen Bedingungen versetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C, vor Verwendung wird das Medium im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt.

3.1.4.3 Aussetzen der Zellen

Für das Aussetzen von Zellen in einer bestimmten Dichte wird nach dem Auszählen mit dem Casy die Menge an Suspension in einen 50 ml Falcon überführt, die die gewünschte Anzahl an Zellen enthält. Diese werden bei 1750 x g fünf Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die als Pellet vorliegenden Zellen werden in der für die gewünschte Dichte erforderlichen Menge frischen Mediums aufgenommen. Durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette wird resuspendiert und die Zellsuspension abschließend in einer Wellplatte ausgesetzt.

3.1.4.4 Inkubation

Vor der Inkubation der differenzierten Zellen wird der Zellkulturüberstand entfernt und das Medium wird zwei Stunden vor der Inkubation gewechselt. Die Inkubation erfolgt unter sterilen Bedingungen in der Werkbank, gleichermaßen bei undifferenzierten wie differenzierten Zellen, indem die Inkubationslösungen direkt in die Zellsuspension bzw. in das, auf den Zellen befindliche, Zellkulturmedium pipettiert werden.

Für die Versuche werden die Zellen mit bovinem Laktoferrin bzw. humanem rekombinantem TGF- β 1 in den Konzentrationen 50 μ g/ml und 500 μ g/ml bzw. 1 ng/ml und 10 ng/ml für Zeitspannen zwischen einer und 72 Stunden inkubiert. Das bovine Laktoferrin ist in 1 x PBS und das TGF- β 1 in 4 mM HCl, die zu 0,1 % mit BSA versetzt ist, gelöst.

Die Kontrollzellen werden mit den Trägersubstanzen der Inkubationslösungen versetzt.

3.1.5 Lysieren der Zellen

3.1.5.1 Lysieren der undifferenzierten THP-1 Zellen

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen sofort aus dem Brutschrank auf Eis gestellt und aus den Wells in frische Eppis überführt. Die Suspensionszellen werden bei 820 x g 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, in neue Eppis überführt und für Folgeversuche bei -80 °C eingefroren.

Das Zellpellet, das aus 4 Millionen Zellen besteht, wird nun unter dem Abzug in einem halben Milliliter TriFast gelöst. In diesem Zustand können die Zellen bis zu einem Jahr im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.1.5.2 Lysieren der differenzierten Zellen

Der Überstand wird, wie bei den undifferenzierten Zellen, in Eppis überführt. Da die differenzierten THP-1 Zellen adhärent sind, befinden sich diese immer noch auf dem Boden der Wells. Sie werden einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend wird 1 ml TriFast direkt auf die Zellen in die Wells pipettiert. Nach 10 Minuten Einwirkzeit sollten die Zellen vollständig vom Boden gelöst sein. Das Zell-TriFast-Gemisch wird in Eppis transferiert und bis zur Probenaufbereitung bei -20 °C eingefroren.

3.2 Probenaufbereitung – RNA Extraktion und Umschreibung in cDNA

3.2.1 Verwendete Geräte/Reagenzien/Materialien

Reagenzien/Lösungen/Geräte	Bezugsfirma
Zentrifuge	Eppendorf 5417R
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
TriFast™ für die Extraktion von RNA, DNA & Proben 200ml	PeqLab
DEPC = Diethylpyrocarbonat	Sigma
Chloroform	MERCK
Isopropanol	Neuber
Ethanol	MERCK
Random Hexamer Primer 0,2 µg/µl	Fermentas
RT Buffer (5x)	Fermentas
DnTPs 100 mM, 25 µmol	Fermentas
RNA Inhibitor 40 U/µl	Fermentas
Reverse Transkriptase 200 U/µl	Fermentas

3.2.2 Herstellen von DEPC – Spitzen / Eppis /Wasser

Unter dem Abzug werden pro Liter destillierten Wassers 100 µl DEPC zugegeben und mindestens 2 Stunden unter laufendem Abzug gerührt, Spitzen und Eppis werden darin getränkt und gut abgedeckt über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird alles für 2 Stunden autoklaviert und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

3.2.3 Extraktion

Für die RNA-Extraktion werden die im TriFast gelösten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut. In der Zwischenzeit wird die Eppendorf-Zentrifuge mit dem Fast Cool Programm auf 4 °C vorgekühlt. Alle folgenden Zentrifugationsvorgänge werden bei 4 °C und 12000 x g durchgeführt.

Als Reinigungsschritt wird 10 Minuten lang zentrifugiert, wodurch unlösliches Material, wie zum Beispiel Polysaccharide, entfernt wird.

Der Überstand, der die RNA enthält, wird in ein frisches Eppi transferiert und pro verwendetem Milliliter TriFast werden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Das Gemisch wird für ca. 30 Sekunden kräftig und gleichmäßig händisch geschüttelt, was ausschlaggebend für den RNA-Ertrag ist. Die Proben werden nun 3-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während ein weiteres Mal für 5 Minuten unter den üblichen Bedingungen zentrifugiert wird, werden pro eingesetztem Milliliter TriFast 0,5 ml kaltes Isopropanol in sterile Eppis vorgelegt und auf Eis gestellt.

Durch letztere Zentrifugation trennt sich das Homogenisat in drei Phasen auf: in eine organische, rötliche Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase, sowie eine obere farblose Phase, in der sich die RNA befindet. Diese wird in 100µl-Schritten vorsichtig vom Rand des Eppis abgenommen und dem Isopropanol zugegeben.

Die Proben werden leicht geschwenkt und für 1-2 Stunden ins Gefrierfach gestellt. Durch anschließende 10-minütige Zentrifugation entsteht das RNA-Pellet. Das Isopropanol wird gleichmäßig, bis auf den letzten Tropfen, entfernt und anschließend zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Dafür wird je 1 ml Ethanol pro 1 ml verwendetem TriFast zugegeben und je 10 Minuten unter den üblichen Bedingungen zentrifugiert.

Nachdem das Ethanol so gut wie möglich aus dem Eppi entfernt ist, lässt man das Pellet im geöffneten Eppi unter der Laminar an der Luft trocknen. Wichtig ist, dass das Pellet nicht zu trocken ist, da es sich sonst nicht mehr richtig löst und, dass kein Ethanol mehr vorhanden ist, da dieses später die PCR hemmen würde.

3.2.4 Umschreibung in cDNA (complementaryDNA)

Das getrocknete Pellet wird in 12,5 µl DEPC Wasser gelöst und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Das Gemisch wird sofort für 10 Minuten in das auf 55 °C vorgeheizte Wasserbad gestellt.

Je 12 µl des RNA-Wasser-Gemisches werden in einem PCR-Tube jeweils mit 1 µl Random Hexamer Primer vermengt und beim RT 1 Programm 17 Minuten lang inkubiert:

RT-1 Programm

Zeit	Temperatur
10 Minuten	70 °C

Zu den Proben werden abschließend je 7 µl Mastermix zugegeben. Herstellung des Mastermix pro Probe:

Substanz	Volumen	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
RT Buffer	4 µl	5 x	1 x
dNTPs	2 µl	100 mM	10 mM
RNase Inhibitor	0,5 µl	40 U/µl	1 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl	200 U/µl	5 U/µl

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die Umschreibung in cDNA.

Die Proben werden nun beim RT 2 Programm eine Stunde und 17 Minuten inkubiert:

Zeit	Temperatur
60 Minuten	37 °C
10 Minuten	70 °C

Die cDNA dient nun als Template für die nachfolgenden RT-PCR-Experimente und kann im Tiefkühler bei – 20 °C aufbewahrt werden.

3.3 RT-PCR

3.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien/Reagenzien	Bezugsfirma
Elektrophoresekammer	Bio Rad
Elektrophoresestation	Bio Rad
Mikrowelle	Moulinex
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Buffer Taq buffer + KCl 10 x	Fermentas
MgCl ₂ 25 mM	Fermentas
dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP & dTTP), 100 mM 25 µmol	Fermentas
Taq DNA Polymerase LC 1 U/µl	Fermentas
Gen-spezifische Primer	ermittelt mit PRIMER3 Software
Agarose-Pulver	MERCK
Ladder GeneRuler (100bp, 1kb)	Fermentas
5 x TBE:	
• Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	MERCK
• Borsäure H ₃ BO ₃	MERCK
• Titriplex zur Analyse Ethylendinitrilotetra- Essigsäure (EDTA) 20 ml 0,5 M	MERCK

3.3.2 Versuchsdurchführung

Herstellung des MasterMix, Mengen pro Ansatz:

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	31 µl	
Puffer	5 µl	75 mM
MgCl ₂	5 µl	2,5 mM
dNTPs	4 µl	0,8 mM
Primer (sense/antisense)	Je 1,5 µl	je 0,3 µM
Taq-Polymerase	1 µl	0,02 U/µl

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die RT-PCR

Zuletzt wird pro Probe 1 µl der cDNA zugegeben, sodass ein Endvolumen von 50 µl erreicht wird. Wird mehr cDNA verwendet, wird diese auf Kosten von Wasser zugegeben. Die Proben werden gut gemischt und im Thermocycler primerspezifisch gecycelt. Je nach Anzahl der Cycles dauert die DNA-Vervielfältigung 1¹/₂ – 2 Stunden.

Die PCR läuft in folgenden Schritten ab:

1. Denaturierung: Der DNA-Doppelstrang wird durch Erhitzen auf 94 °C in seine beiden Einzelstränge aufgeschmolzen (3 min)
2. 94 °C für 40 sec
3. Annealing: Nachdem die Temperatur auf die für die Primer spezifische Temperatur abgekühlt ist, lagern sich diese an den DNA-Strang an (60 sec)
4. Elongation: Die Taq-Polymerase verlängert mittels dNTPs bei 72 °C von den Primern ausgehend die Sequenz (60 sec)
5. 72 °C für 5 min
6. Store bei 4 °C

2.-4. werden
als Zyklen
wiederholt

Primer	bp	Schmelz- Temp.	Cyc.	Sequenz
GAPDH	185	62 °C	28	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3'
				5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'
Pai-1	399	61 °C	32	5'-TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT -3'
				5'-CGG TCA TTC CCA GGT TCT CTA -3'
FN	439	70 °C	32	5'-AGC CGC CAC GTG CCA GGA TTA C-3'
				5'-CTT ATG GGG GTG GCC GTT GTG G-3'
c-Myc	456	63 °C	32	5'-CCT CGG TGG TCT TCC CCT AC-3'
				5'-TGC ATT TTC GGT TGT TGC TG -3'
Endoglin	368	61 °C	32	5'-AGC TCC CAG ACA CAC CTC AA-3'
				5'-GCC ACA GCT GGA GTA AGC AC-3'
MMP-9	339	60 °C	32	5'-GAC ATC GTC ATC CAG TTT GG-3'
				5'-GTA GAG TCT CTC GCT GGG GC-3'
LRP 1	515	70 °C	32	5'-CAA CAA CAG CAC CTG CAC TGT CAA CCA G-3'
				5'-GGA CTC GCC GCT TAT ACC AGA ATA CCA C-3'
CD 36	428	60 °C	32	5'-ATG TAA CCC AGG ACG CTG AG-3'
				5'-GTC GCA GTG ACT TTC CCA AT-3'

Tabelle 3: Verwendete Primer, Produktlänge des amplifizierten cDNA-Fragments, primerspezifische Annealingtemperatur, Anzahl der verwendeten Cycles und Sequenzen der verwendeten Primer.

Im Anschluss werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese die amplifizierten Fragmente sichtbar gemacht. Dafür wird ein 1,5%iges Agarosegel verwendet, zu dem 0,05 µl Ethidiumbromid/ml zur Markierung der Banden zugegeben werden. Zum Abschätzen der tatsächlichen Größe der Genprodukte wird eine Ladder (100 bp oder 1 kb) als Referenzmarker verwendet. Das Gel soll während der Elektrophorese vollständig mit dem Elektrophoresepuffer bedeckt sein. Nach 20-minütiger Auftrennung bei 100 V und 50-60 mA wird das Gel unter UV Beleuchtung fotografiert.

Abschließend werden die Signale mit dem Programm ChemImager ausgewertet, die Graphen mit Microsoft Excel erstellt und die Statistik mit GraphPad Prism durchgeführt.

3.4 TGF- β – ELISA

3.4.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien /Reagenzien	Bezugsfirma
96-Well Platte	Greiner
8 Kanalpipette	Eppendorf 300 Research
Parafilm	Menasha
<u>Coating Buffer pH = 9,5 1L:</u>	
• Natriumhydrogencarbonat Na_2HCO_3	MERCK
• Natriumcarbonat Na_2CO_3	MERCK
<u>10 x PBS 0,5L, pH = 7:</u>	
• Natriumchlorid NaCl	Roth
• Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	MERCK
• Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	MERCK
• Kaliumchlorid KCl	MERCK
<u>Assay Diluent:</u>	
• 1 x PBS 45 ml	
• FCS (10 %) 5 ml	Gibco
<u>Washing Buffer:</u>	
• Tween*20 0,25 ml (0,05 %) in	MERCK
• 500 ml 1 x PBS	
Schwefelsäure H_2SO_4 1 M = Stop Solution	MERCK
Substrate Solution. Substrate Chromogen DAKO TMB+ 1000 ml	
Antikörper: BD OptEIA™ Human TGF- β 1 ELISA Set BD Biosciences:	
• BD OptEIA™ Capture Antibody Purified Anti-Human TGF- β 1 1:250 verdünnt in AD	
• BD OptEIA™ Detection Antibody Biotin anti-human TGF- β 1	
• BD OptEIA™ Enzyme Concentrate Streptavidin-HRP	

3.4.2 Versuchsdurchführung

Die 96-Well Platte wird mit dem Capture Antibody gecoatet. Dieser wird 1:250 in Coating Buffer verdünnt, wovon je 100 µl/Well mit der 8-Kanal-Pipette aufgetragen werden. Die Platte wird gut mit Folie und Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Wells aus dem Handgelenk kraftvoll ausgeleert und dreimal mit je 300 µl Washing Buffer/Well gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wird die Platte immer auf Filterpapier abgetupft, um restliche Tropfen zu entfernen. Anschließend wird die Platte mit mindestens 200 µl Assay Diluent/Well eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, sodass während des weiteren Versuchsablaufs nichts unspezifisch an der Platte haften bleiben kann. Während des Blockens werden die Proben vorbereitet.

Proben: Zur Aktivierung des TGF-β1 wird die Hälfte der Proben mit 13,2 µl 1 N HCl versetzt und nach einer Stunde mit der gleichen Menge 1 N NaOH wieder neutralisiert.

Standardreihe:

	S₁	S₂	S₃	S₄	S₅	S₆	S₇	S₈
C= pg/ml	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	0
Assay								
Diluent µl	672	350	350	350	350	350	350	350
+ µl	28 S	350 _{S1}	350 _{S2}	350 _{S3}	350 _{S4}	350 _{S5}	350 _{S6}	-----

Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe; S steht für die TGF-β1 Standardlösung (Stock-C = 0,1 µg/ml)

Der Assay Diluent wird in allen 8 Eppis vorgelegt, die Zugabe des TGF-beta und somit die Fertigstellung der Verdünnung erfolgt erst kurz vor dem

Auftragen.

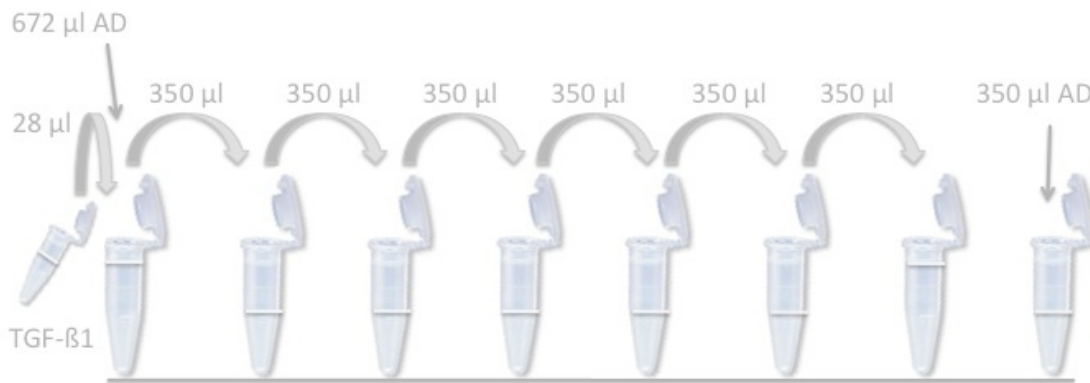


Abbildung 9: Bildliche Darstellung der Herstellung der Standardreihe

Nach dem einstündigen Blocken wird die Platte dreimal gewaschen und von den vorbereiteten Proben werden jeweils 100 µl im Triplikat in die Wells pipettiert. Die Spitzen sollten nach jedem Pipettierschritt gewechselt werden.

Die Platte wird nun für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert und anschließend fünfmal mit je 300 µl/Well gewaschen.

Dem letzten Waschgang folgt die Zugabe von 100 µl Working Detektor/Well sowie die Einwirkzeit von einer Stunde, nach der die Platte siebenmal 30-60 Sekunden lang gewaschen wird.

Im Anschluss werden je 100 µl TMB/Well zugegeben. Für die Einwirkzeit von ca. 30 Minuten wird die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Es kommt zu einer blauen Farbentwicklung, deren Intensität von der vorhandenen TGF-β1-Menge abhängt.

Die Reaktion wird nach einer halben Stunde mit je 50 µl 1 M H₂SO₄/Well gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag ins Gelbe kommt. Abschließend wird die Absorption bei 450 nm im Plattenreader gemessen und mit Hilfe des Statistikprogrammes Prism ausgewertet.

3.5 Adhärenztest mittels Kristallviolett-färbung

Dieser Adhärenztest stützt sich auf das Paper „A new simple multi-well plate-based assay for monocyte differentiation using human monocytic leukemia THP-1 cells“ von Uchide N. & Toyoda H.

3.5.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien /Reagenzien	Bezugsfirma
Mikrotiterplatte	Greiner
8 Kanalpipette	Eppendorf 300 Research
Glutaraldehyd (auf 25 % mit PBS verdünnt)	MERCK
Kristallviolett-Lösung:	
• 0,02 g KV in	
• Ethanol (20 %) lösen und mit	MERCK
• 1 x PBS auf 0,2 % verdünnen	
SDS (0,1 %)	
PBS-Puffer:	
• Natriumchlorid NaCl	Roth
• Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	MERCK
• Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	MERCK
• Kaliumchlorid KCl	MERCK

3.5.2 Versuchsvorbereitung

In einer 96-Well Platte werden in die Wells jeweils 100 µl Zellsuspension gegeben, als Positivkontrolle werden die Zellen in einigen Wells durch PMA (160 nM) – Stimulierung differenziert. Die in den übrigen Wells befindlichen

undifferenzierten THP-1 Zellen werden mit unterschiedlichen TGF- β 1 und bLF Konzentrationen für fünf Tage inkubiert.

3.5.3 Versuchsdurchführung

Die Überstände werden ausgeleert und die Wells zweimal mit je 100 μ l PBS gespült. Es folgt die Zugabe von je 100 μ l 0,25%iger Glutaraldehydlösung und eine 10-minütige Inkubation bei 4 °C. Die Überstände werden wieder verworfen und die Platte wird schräg in einen mit Leitungswasser befüllten Behälter geführt, bis sich die Wells mit Wasser gefüllt haben. Die Platte wird unter Wasser gewendet, sodass die Öffnungen nach unten zeigen, und danach dreimal langsam hinauf- und hinunterbewegt. Der Waschvorgang wird wiederholt und nach Entfernen des Wassers wird die Platte vorsichtig auf Papier abgetupft, um letzte Wasserreste zu beseitigen.

Anschließend werden 50 μ l 0,2%ige Kristallviolett-Lösung pro Well für 10 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Das Färbemittel wird wieder ausgeleert und die Platte abgetupft. Der oben beschriebene Waschvorgang mit Leitungswasser wird dreimal durchgeführt.

Abschließend werden pro Well 100 μ l 0,1%iges SDS zugesetzt und die Platte wird drei Minuten bei Raumtemperatur stark geschüttelt, was zum Lösen der Zellen führt. Bei unserem Versuch lösten sich die Zellen nicht, weshalb zusätzlich 50 μ l 100%iges Ethanol zugegeben wurden. Zuletzt wird die Absorption bei 550 nm gemessen.

3.6 Immunfluoreszenz

3.6.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien/Reagenzien	Bezugsfirma
12-Well Platte	Greiner
sterilisierte Deckgläser Ø 15 mm	
Objektträger	SuperFast Superior
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 135
Parafilm	Menasha
<u>10 x TBS++ (1L) pH = 7,4</u>	
• Tris 24,2 g/l	Roth
• NaCl 84,8 g/l	Roth
• CaCl ₂ 2 mM	MERCK
<u>4%ige Paraformaldehyd-Lösung pH = 7,4</u>	
• Paraformaldehyd (0,4 g)	MERCK
• NaOH 1 N (250 µl)	MERCK
• 10 x TBS++ (1 ml)	
• in 9 ml aqua dest bei 60 °C lösen	
<u>0,2%ige TritonX-100 Lösung:</u>	
• Triton X-100 (0,1 ml)	MERCK
• In 50 ml 1 x TBS++ lösen	
Glycerin (0,5 g in 50 ml 1 x TBS++ gelöst) ca. 87 %	MERCK
1 % BSA gelöst in 1 x TBS++	
SMAD-2 Primary AK 1:100 verdünnt mit 1 % BSA (mouse)	
Second AK 1:150 verdünnt mit 1 % BSA	
DAPI 1:100 verdünnt in 1x TBS++	Sigma

3.6.2 Versuchsdurchführung

Durch PMA-Stimulierung werden in einer 12-Wellplatte auf in den Wells befindlichen Deckgläsern THP-1 Zellen differenziert. Nach 72 Stunden werden die Wells einmal mit unkomplementiertem Medium gewaschen und anschließend je 0,5 ml Medium, das zu 1 % mit BSA versetzt ist, zugegeben. Nach 30 Minuten Einwirkzeit bei 37 °C folgt eine einstündige Inkubation mit TGF- β 1 und bLF.

Nach der Inkubationszeit werden die Wells dreimal für jeweils 4 Minuten mit 1 x TBS++ gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wird nach dem letzten Waschgang pro Well 1 ml 4%iges Paraformaldehyd am Rand hinzupipettiert, welches für 20 Minuten einwirkt. Es wird anschließend wieder dreimal vier Minuten lang gewaschen, bevor die Zellen durch eine einminütige Inkubation mit TritonX-100 Lösung permeabilisiert werden, um die Diffusion von den Lösungen zu gewährleisten.

Nach neuerlichem Waschen werden die freien Aldehydgruppen mit je 1 ml 1%iger Glycinlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Wiederum nach 3 Waschgängen werden je 100 μ l der 1. AK-Mischung direkt auf die Zellen pipettiert und für eine Stunde, zugedeckt und mit feuchten Tüchern umwickelt, inkubiert, um das Verdunsten zu verhindern. Nachdem der 1. AK gewegewaschen ist, lässt man im Dunkeln je 100 μ l des 2. AK für 45 Minuten auf die Zellen einwirken. Der 2. AK wird durch 4-maliges Waschen entfernt, wonach das Einfärben der Zellkerne mit DAPI erfolgt, damit diese später unter dem Mikroskop sichtbar sind. Dafür werden die Zellen mit jeweils 400 μ l Dapi-Lösung/Well für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Nachdem diese durch drei Waschgänge entfernt wurde, können im letzten Schritt die Präparate fertig gestellt werden.

Dafür werden die Deckgläser vorsichtig mit einer Pinzette aus den Wells entnommen und zum Trocknen im Dunkeln, mit den Zellen nach oben, auf Parafilm gelegt. Nachdem die Glasplättchen vollständig getrocknet sind, werden diese auf gut mit Ethanol gereinigten und beschrifteten Objektträgern platziert.

Dabei liegt die Seite, auf der die Zellen sitzen, direkt auf einem Tropfen Glycerol auf dem Objektträger auf und sollte sich gänzlich an diesen ansaugen. Zusätzlich wird das Präparat mit Klarlack versiegelt.

Bis zum Mikroskopieren der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop werden diese im Dunkeln gelagert, um das Verblässen des Farbstoffes zu verhindern.

3.7 Apoptose Assay

3.7.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Geräte/Materialien/Reagenzien	Bezugsfirma
6-Well Platte	Greiner
Casy-Zähler	Schärfe
Zentrifuge	Eppendorf
Elektrophoresekammer	Bio Rad
Elektrophoresestation	Bio Rad
Imager-Transilluminator	DocITLS
Ethanol 70 %	MERCK
Nonidet NP-40, Ethylphenylpolyethylene glycol	USB
Proteinase K (1 mg/ml)	GERBU
RNase (1 mg/ml)	GERBU
<u>Phosphat-Citrat-Buffer:</u>	
• Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 0,2 M	MERCK
• Zitronensäure kristallwasserfrei 0,1 M	MERCK
<u>Hanks' Buffer:</u>	
• NaCl (8000 mg/l)	Roth
• NaHCO_3 (350 mg/l)	MERCK
• KH_2PO_4 (60 mg/l)	MERCK
• KCl (400 mg/l)	MERCK
• MgSO_4 (100 mg/l)	MERCK
• MgCl_2 (100 mg/l)	MERCK
• CaCl_2 (185 mg/l)	MERCK
• Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 0,2 M	MERCK

3.7.2 Versuchsdurchführung

Nach 72-stündiger Inkubation der THP-1 Zellen mit bLF und TGF- β 1 werden die Zellen mit Hilfe des Casys ausgezählt und die Zellsuspensionen mit je 2 Mio Zellen in beschriftete 2 ml Eppis transferiert. Es folgt eine fünfminütige Zentrifugation bei 200 x g. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wird das Zellpellet in einem Milliliter Hanks'Buffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das neu entstandene Pellet wird anschließend in 10 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gelöst und für mindestens 24 Stunden bei – 20 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt werden die Proben bei 800 x g erneut für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in Folge gründlich entfernt. Nachdem restliches Ethanol durch Lufttrocknung entfernt wurde, werden die Zellen in 40 μ l PCB resuspendiert und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben werden anschließend bei 1000 x g nochmals 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand, mit dem ab diesem Zeitpunkt weitergearbeitet wird, in neue 200 μ l Tubes transferiert. Diesem werden in weiterer Folge je 3 μ l Nonidet NP-40 sowie 3 μ l RNase hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt werden noch je 3 μ l Proteinase K zugesetzt und unter selben Bedingungen erneut eine halbe Stunde inkubiert.

Die fertigen Proben werden abschließend mit Loading Buffer versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft bei 40 Volt konstant für ungefähr eine Stunde.

Das Abfotografieren wird wie bei der RT-PCR mit Hilfe des Imagers durchgeführt.

4 Ergebnisse

Durch die nachfolgenden Diagramme und Abbildungen wird der Einfluss von einerseits Laktoferrin und andererseits TGF- β 1 auf humane monozytäre leukämische Zellen (THP-1) vergleichend gegenübergestellt. Dafür wurden vorerst die Expressionen der TGF- β Zielgene, PAI-1 und Fibronektin, nach unterschiedlich langer Behandlung (1h, 4h und 24h) mit verschiedenen Konzentrationen beider Substanzen (Laktoferrin: 50 μ g/ml bzw. 500 μ g/ml und TGF- β 1: 1 ng/ml) mittels RT-PCR analysiert.

In weiterer Folge wurde, ebenfalls mittels RT-PCR, der Einfluss auf die Zelldifferenzierung durch Expressionsanalyse verschiedener Differenzierungsmarker, wie zum Beispiel MMP-9 oder Endoglin, untersucht und parallel dazu, durch einen Adhärenztest, die Zellveränderung, bezogen auf das Adhärenzverhalten, überprüft.

Durch einen Apoptose Assay als Folgeexperiment auf die Analyse des Proto-Onkogens c-Myc durch RT-PCR wurden die Auswirkungen von Laktoferrin und TGF- β 1 auf den programmierten Zelltod beobachtet.

Um die direkte Aktivierung von TGF- β 1 durch Laktoferrin zu analysieren, wurden ELISA-Analysen auf aktiviertes TGF- β 1 nach unterschiedlich langen Inkubationen mit bLF und inaktiven TGF- β 1 durchgeführt.

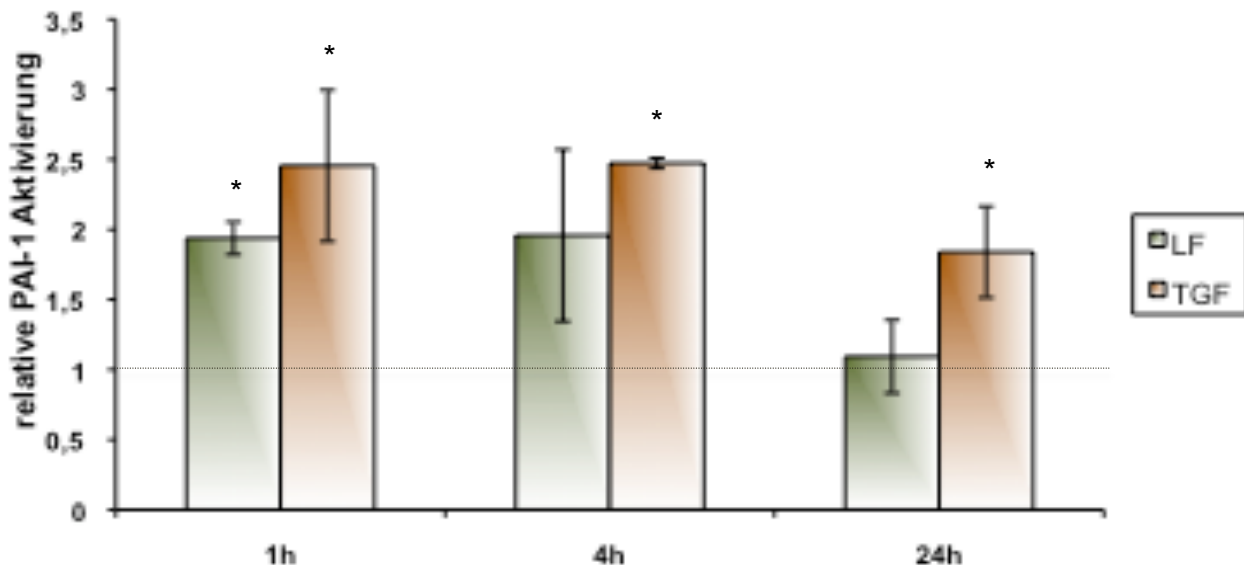
Abschließend wurde durch eine Immunfluoreszenz die Smad2-Translokation in den Zellkern differenzierter THP-1 Zellen nach einstündiger Inkubation mit den Testsubstanzen untersucht.

4.1 Einfluss von Laktoferrin auf die Expression der klassischen TGF – β 1 Zielgene PAI-1 und FN-1

4.1.1 PAI-1 – Expressionsanalyse

PAI-1 ist ein klassisches TGF- β Zielgen, das maßgeblich in die Prozesse der Zelladhäsion, -ablösung sowie -migration involviert ist. TGF- β 1 stimuliert direkt die Expression der PAI-1 – mRNA. Um den Einfluss von Laktoferrin im Vergleich zu TGF- β 1 auf die PAI-1-Expression zu untersuchen, wurden die THP-1 Zellen über unterschiedliche Zeitspannen mit beiden Substanzen inkubiert und anschließend wurde die Expression mittels RT-PCR analysiert.

A Relative PAI-1 Aktivierung nach Behandlung mit LF und TGF- β 1



B PAI-1 Expression nach Inkubation mit LF und TGF- β 1

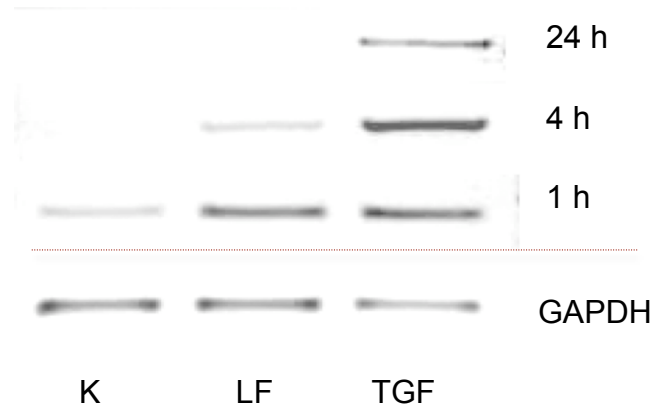


Abbildung 10: Pai-1 Expression in THP-1 Zellen nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation mit Laktoterrin und TGF- β 1. Laktoterrin wurde in der Konzentration 50 μ g/ml und TGF- β 1 in der Konzentration 1 ng/ml eingesetzt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels RT - PCR, als housekeeping gene wurde GAPDH verwendet.

A: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von vier unabhängigen Versuche, die jeweils im Duplikat durchgeführt und mittels one-sample t-Tests statistisch ausgewertet wurden ($*=p < 0,05$). Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Ergebniswerte auf GAPDH normiert.

B: Signale der RT-PCR der Effekte von LF und TGF- β 1 auf die PAI-1 Expression sowie der Ladekontrolle GAPDH.

Die Abbildung 10 zeigt, dass die PAI-1 Expression nach einer Stunde durch Laktoterrin signifikant ($p < 0,05$) auf das Zweifache und somit vergleichbar stark hinaufreguliert worden ist wie durch TGF- β selbst, das zu einer 2,5-fachen Stimulierung führte. Die RT-PCR-Ergebnisse zeigen im Vergleich zu der einstündigen Inkubation eine deutliche, jedoch nicht gleichmäßige Abnahme der Stimulierung nach der Inkubation mit Laktoterrin für 4 Stunden. Die Abnahme des Signals ist visuell an der Bandenintensität der PCR zu erkennen, im Diagramm hingegen ist sie nicht signifikant, was an den Schwankungen der Ergebnisse liegt und durch die Standardabweichung deutlich wird. Nach 24

Stunden Laktoterrininkubation ist keine Stimulierung mehr zu erkennen, die PAI-1-Expression ist auf Kontrollniveau zurückgesunken. Verglichen mit diesen Ergebnissen ist die PAI-1-Expression durch Behandlung mit TGF- β 1 nach 4 Stunden immer noch signifikant ($p < 0,05$) und auf gleichem Niveau wie nach der einstündigen Inkubation mit TGF- β 1. Nach 24 Stunden scheint die Expression etwas weniger stark durch TGF- β 1 stimuliert zu werden als nach einer und vier Stunden, ist jedoch immer noch signifikant. In der Abbildung 10.B ist nicht immer ein PAI-1 Signal bei den Kontrollproben zu erkennen, was auf die schwache endogene Expression zurückzuführen ist.

4.1.2 Fibronektin – Expressionsanalyse

Um die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf andere TGF- β 1 Zielgene zu überprüfen, wurden in Folge die Effekte von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Expression des TGF- β 1 Zielgens Fibronektin in undifferenzierten THP-1 Zellen mittels RT-PCR untersucht und in nachfolgenden Bildern veranschaulicht.

A Fibronektin-Expression im Zeitverlauf nach Inkubation mit bLF und TGF- β 1

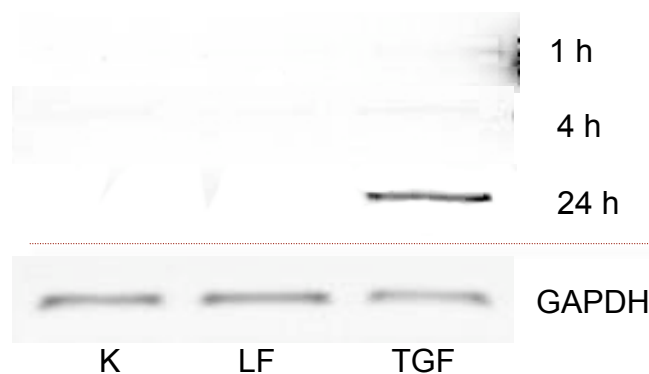


Abbildung 11: Repräsentative Abbildung der Fibronektin-Expression nach 1-, 4- und 24-stündiger Behandlung mit bLF und TGF- β 1 in den Konzentrationen 50 μ g/ml LF und 1 ng/ml TGF- β 1. Es wurden für jeden Inkubationszeitraum zwei unabhängige RT-PCR-Experimente, jeweils im Duplikat, durchgeführt. GAPDH wurde als Normierungsgröße verwendet.

Wie die Bilder deutlich zeigen, ist weder nach einer noch nach vier Stunden Inkubation ein Effekt durch Laktoferrin oder TGF- β 1 zu beobachten. Interessanterweise wird die Expression von Fibronektin nach 24 Stunden deutlich durch TGF- β 1 stimuliert, wohingegen jedoch durch die Laktoferrinbehandlung keine Stimulierung zu erkennen ist.

Demnach kam es nach der einstündigen Behandlung mit LF zu einer deutlichen Stimulierung der PAI-1 Expression, aber in etwas schwächerem Ausmaß als durch TGF- β 1. Außerdem war die Stimulierung von kürzerer Dauer als durch die Behandlung mit TGF- β 1 in einer Konzentration von 1 ng/ml, wo auch nach 24 Stunden noch eine gleichermaßen signifikante ($p < 0,05$) Stimulierung zu erkennen war, wie nach einer und vier Stunden. Die Stimulierung durch Laktoferrin jedoch war nach 24 Stunden nicht mehr zu erkennen. Die Analysen der Fibronectinexpression zeigten nach einer und vier Stunden Behandlung weder durch Laktoferrin noch durch TGF- β 1 eine erkennbare Stimulierung, wohingegen nach 24 Stunden bei TGF- β 1, jedoch nicht bei LF, eine Stimulierung deutlich wurde.

Die Versuchsreihe zeigt, dass sich Laktoferrin, in der Konzentration von 50 μ g/ml, nicht wie TGF- β 1 auf dessen Zielgene auswirkt. Da die Expression des TGF- β 1 Zielgens PAI-1 durch LF schwächer war als durch TGF- β 1 und die Expression des Zielgens Fibronectin auch durch TGF- β 1 erst nach 24 Stunden einen Effekt hervorrief, stellten wir uns die Frage, ob sich Laktoferrin eventuell dosisabhängig auf die Stimulierung der Expression dieser beiden Zielgene auswirkt, woraufhin in der nächsten Versuchsreihe die eingesetzte Laktoferrindosis auf 500 μ g/ml verzehnfacht wurde.

4.1.3 Einfluss von Laktoferrin auf die Expression von den TGF- β 1 Zielgenen PAI-1 und FN-1 nach Dosiserhöhung

Um der Frage nachzugehen, ob Laktoferrin dosisabhängig die Expression der TGF- β 1 Zielgene Plasminogen Activator Inhibitor-1 und Fibronektin-1 beeinflusst, wurden die Inkubationskonzentrationen von Laktoferrin um das Zehnfache erhöht und die Effekte, vergleichend mit den durch die unveränderten TGF- β 1 Konzentration hervorgerufenen Signale, mittels RT-PCR analysiert.

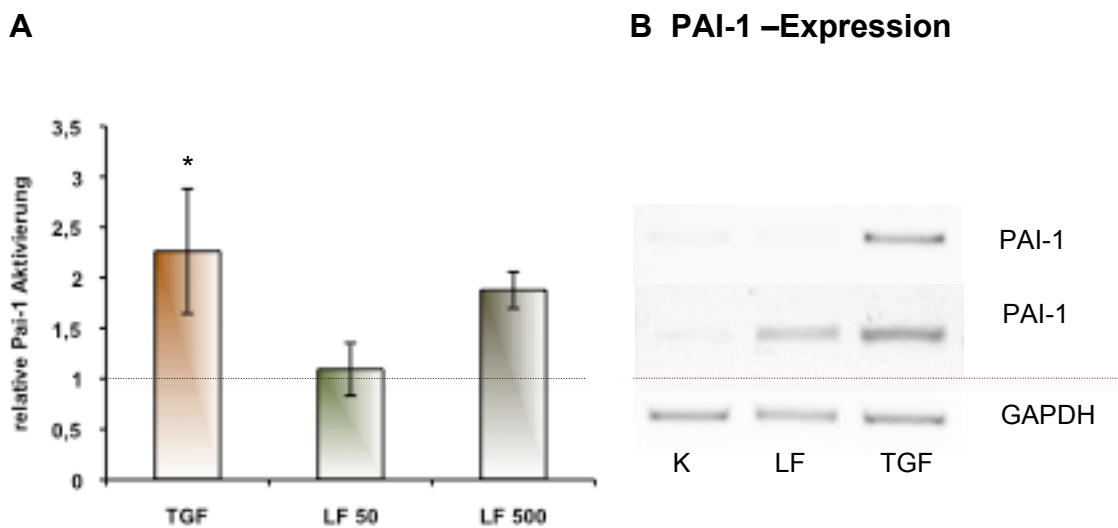


Abbildung 12: Darstellungen der Aktivierung der PAI-1 Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen durch Laktoferrin, eingesetzt in den Konzentrationen 50 μ g/ml sowie 500 μ g/ml (untere Reihe), und TGF- β 1, eingesetzt in der Konzentration 1 ng/ml, nach 24-stündiger Inkubation. GAPDH diene als Ladekontrolle.

A: Graphische Darstellung des Mittelwerts ($\pm$ SD) zweier (LF₅₀ & LF₅₀₀) bzw. vierer (TGF- β 1) unabhängiger Versuche, jeweils im Duplikat bestimmt. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und für die statistische Auswertung der one-sample t-test herangezogen. (* = $p < 0,05$)

B: Bildliche Darstellung der Signalstärken der RT-PCR. Analysiert wurde die PAI-1-Expression.

Die 24-stündige Inkubation von TGF- β 1 bewirkte, wie in den Versuchen zuvor, eine signifikante Steigerung der PAI-1 Aktivierung.

In den Abbildungen ist deutlich ein erhöhter Effekt auf die PAI-1-Expression nach Dosissteigerung von Laktoferrin auf das Zehnfache zu erkennen. Der Effekt ist vergleichbar stark wie der durch TGF- β 1, jedoch statistisch nicht signifikant, was eventuell auf den geringeren Stichprobenumfang zurückzuführen ist.

RT-PCR Bilder der Fibronektin-Expression

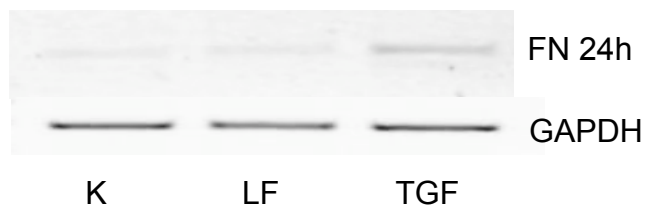


Abbildung 13: Fotos der RT-PCR: repräsentative Abbildung der Fibronektin-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Laktoferrin (C = 50 & 500 μ g/ml) und TGF- β 1 (C = 1 ng/ml) nach 2 unabhängigen, je im Duplikat durchgeführten Versuchen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Aus den Bildern wird erkenntlich, dass eine Erhöhung der eingesetzten Dosis von Laktoferrin auf 500 μ g/ml ebenso keine Effekte auf die Expression von Fibronektin mit sich bringt.

Somit kann gefolgert werden, dass die Aktivierung von PAI-1 durch LF dosisabhängig ist, eine erhöhte Dosis jedoch nicht immer gleichzeitig dafür spricht, dass es zu gleichen oder ähnlichen Effekten kommt wie durch TGF. Die

Ergebnisse der Fibronektinanalyse zeigen, dass sich Laktoferrin unterschiedlich auf die verschiedenen TGF- β 1 Zielgene auswirkt und nicht zwangsläufig einen Effekt hervorruft.

4.2 Auswirkungen von TGF- β 1 und bLF auf die Morphologie der THP-1 Zellen

Als Vorversuch zu den Experimenten, die der Untersuchung der Effekte von TGF- β 1 und bLF auf die Differenzierung und das Adhärenzverhalten monozytärer THP-1 Zellen dienen, wurden undifferenzierte Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen mit bLF und TGF- β 1 inkubiert und im Anschluss unter dem Mikroskop analysiert.

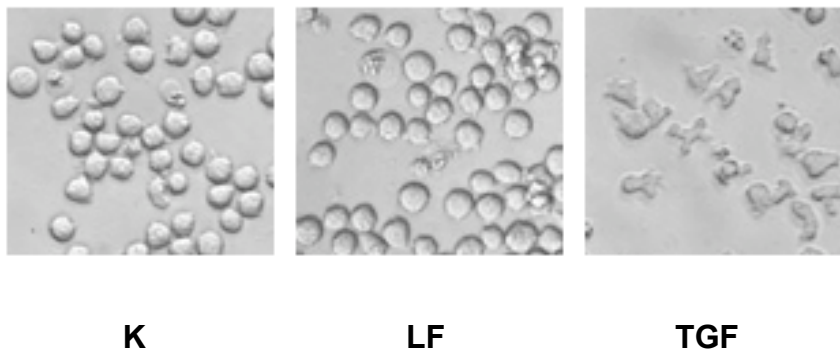


Abbildung 14: Mikroskopische Bilder von undifferenzierten THP-1 Zellen, nach 5-tägiger Inkubation mit bLF (C = 50 μ g/ml) und TGF- β 1 (C = 1 ng/ml) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Bilder wurden mit Hilfe des Zeiss Axiovert 135 Mikroskops mit dem 20er Objektiv aufgenommen.

Auf den oben dargestellten Bildern der undifferenzierten THP-1 Zellen sind deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie und dem Wachstum durch die verschiedenen Behandlungen zu erkennen. Die Zellen nahmen nach der Behandlung mit TGF- β 1 länglichere Formen an, mit leichten Ansätzen von „Ärmchen“ und legten die kugelig runde Form der THP-1 Monozyten beinahe gänzlich ab, während die Zellen in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Laktoferrin hingegen bewirkte keinerlei morphologische Veränderungen und auch das Zellwachstum wurde nicht beeinflusst.

4.3 Beeinflussung der Morphologie und des Adhärenzverhaltens von undifferenzierten THP-1 Zellen durch Laktoferrin und TGF- β 1

Differenzierte und undifferenzierte THP-1 Zellen weisen enorme Unterschiede sowohl in Morphologie als auch im Adhärenzverhalten auf. Während die undifferenzierten monozytären Zellen mit runden Zellkörpern in Suspension vorliegen, bilden die Makrophagen „Arme“ aus, setzen sich auf der Platte fest und werden somit adhären.

Um die Auswirkungen von bLF und TGF- β 1 auf diese Eigenschaften nach dem Vorversuch vertiefend zu untersuchen, wurden undifferenzierte THP-1 Zellen 5 Tage lang mit den beiden Testsubstanzen inkubiert und durch Mikroskopie und anschließender Färbung analysiert.

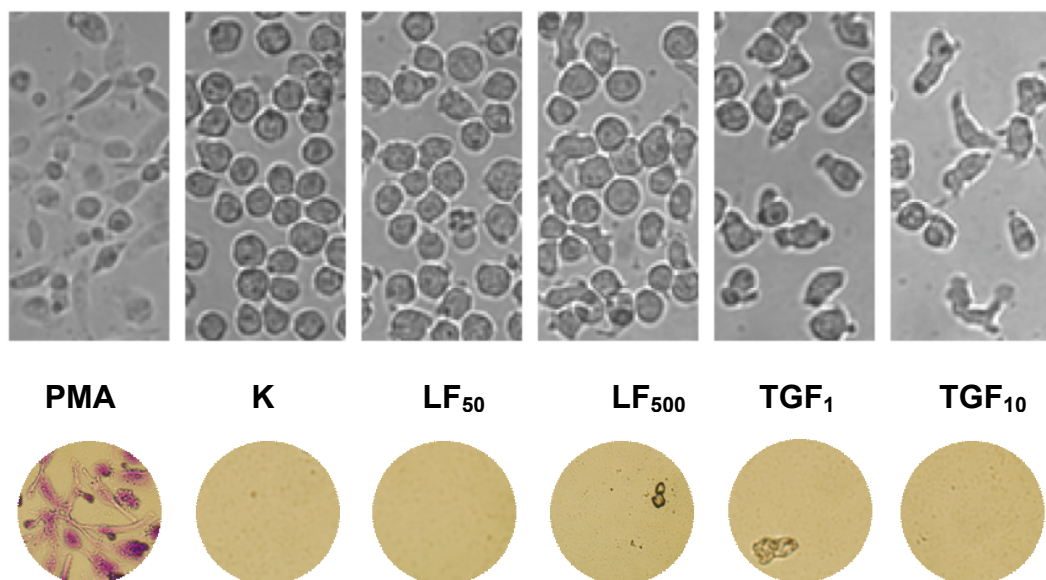


Abbildung 15: Mikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit bLF in den Konzentrationen 50 und 500 $\mu\text{g/ml}$ (LF₅₀ & LF₅₀₀) und TGF in den Konzentrationen 1 und 10 ng/ml (TGF₁ & TGF₁₀), sowie nach Differenzierung durch PMA-Stimulierung ($C = 160 \text{ nM}$) als Positivkontrolle (oben); die untere Bilderreihe zeigt die Wells nach Färbung der adhären Zellen mit 0,2%iger Kristallviolett-Lösung. Die Bilder wurden mit Hilfe des Zeiss Axiovert 135 – Mikroskops mit dem 20er Objektiv aufgenommen.

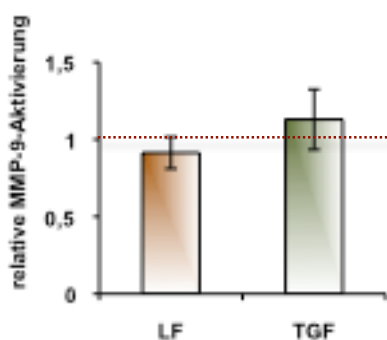
Auf den oben dargestellten Fotos sind eindeutig die unterschiedlichen Einflüsse vom bovinem LF und TGF- β 1 im Vergleich zu dem Einfluss von PMA zu erkennen. Die mit Laktoferrin inkubierten Zellen waren nach den 5 Tagen eindeutig mit den Kontrollzellen zu vergleichen, woraus geschlossen werden kann, dass bLF weder in der niedrigeren noch in der höheren Konzentration das Wachstum der Zellen beeinflusst und ebenso wenig zu eindeutigen morphologischen Veränderungen dieser führt. Hingegen wurden die Zellen durch TGF- β 1 in beiden Konzentrationen in ihrem Wachstum gehemmt und wiesen deutlich erkennbare Unterschiede zu den Kontrollzellen auf. Die kegelig runden Zellkörper nahmen nach der Behandlung eine eher längliche Form an und es waren kleinere Auswüchse sichtbar. Vergleichend zu den durch PMA-Stimulierung zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen kann schlussfolgernd gesagt werden, dass TGF- β 1 zu ansatzweise ähnlichen Veränderungen führt wie der Phorbol ester, wohingegen Laktoferrin diesbezüglich keinerlei Einfluss auf die Zellen ausübt.

Durch die anschließende Färbung der gewaschenen Platte mit Kristallviolett wurde untersucht, ob einige Zellen durch die Inkubationen sogar adhärent wurden. Wie die oben dargestellten Bilder zeigen, sind durch die Stimulierung mit PMA die THP-1 Zellen adhärent geworden, wohingegen sich nach der Färbung und Waschung in den übrigen Wells keine Zellen mehr befanden. Die Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass weder TGF- β 1, noch bLF zur Adhärenz der Zellen führen.

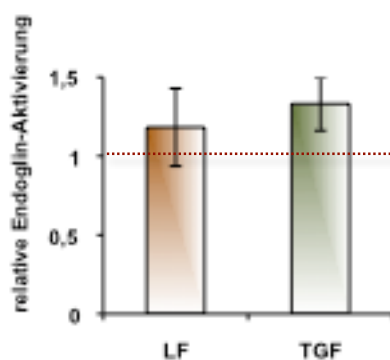
4.4 Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Expression der Differenzierungsmarker MMP-9, Endoglin, LRP-1 und CD36

MMP-9, Endoglin, CD36 und LRP-1 gelten als Differenzierungsmarker für Makrophagen. Um den Einfluss von LF und TGF- β 1 zusätzlich zum vorhergegangenen Adhärenztest auf das Differenzierungsverhalten von THP-1 Monozyten zu veranschaulichen, wurden mittels RT-PCR die Expressionen dieser vier Gene nach einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden analysiert.

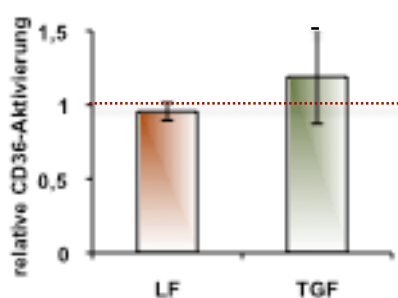
A.1



A.2



A.3



B Expression der Differenzierungsmarker CD36, Endoglin & MMP-9

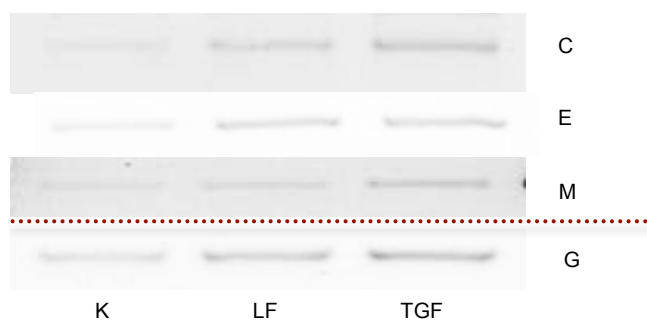


Abbildung 16: RT-PCR-Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation mit den üblichen Laktoferrin- und TGF- β 1 – Konzentrationen von 50 μ g/ml bzw. 1 ng/ml. Analysiert wurden die Expressionen der Differenzierungsmarker MMP-9 (M), Endoglin (E) und CD36 (C), die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Ergebnisse auf die Ladekontrolle GAPDH (G) normalisiert.

A: Graphische Darstellungen der relativen MMP-9 (**A.1**) - , Endoglin (**A.2**) – und CD36 (**C.3**) – Aktivierung. Zu sehen sind die Mittelwerte zweier unabhängig, jeweils im Duplikat durchgeführter Versuche +/- der Standardabweichung

B: Bilder der RT-PCR-Analyse der MMP-9 - , Endoglin – sowie CD36-Expression

In zwei unabhängigen, je im Duplikat durchgeführten Experimenten kam es weder durch 24-stündige Laktoferrin-, noch TGF- β 1-Inkubation zu detektierbaren Ergebnissen bezüglich der LRP-1 Expression, weshalb es dazu weder statistische Auswertungen, noch Fotos der RT-PCR gibt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer vorangegangenen Arbeit überein, in der beschrieben wird, dass LRP-1 erst mit der Differenzierung der THP-1 Zellen exprimiert wird [SCHELCH, 2008].

Keiner der anderen drei getesteten Differenzierungsmarker wurde nach 24-stündiger Behandlung mit TGF- β 1 stimuliert. Ebenso wenig zeigte Laktoferrin einen Einfluss auf die Expression genannter Gene.

4.5 Einfluss von bLF und TGF- β 1 auf die Expression von c-Myc

Die Expression des Protoonkogens c-Myc wird laut Literatur durch den Einfluss von TGF- β 1 gehemmt, wodurch es zum Stillstand des Zellzyklus kommt. In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob TGF- β 1 auch in undifferenzierten THP-1 Zellen zur negativen Regulation der Genexpression führt. Wie in den Versuchen zuvor, werden die Auswirkungen im direkten Vergleich zu denen durch bLF präsentiert.

Effekt von bLF und TGF- β 1 auf die Expression von c-Myc

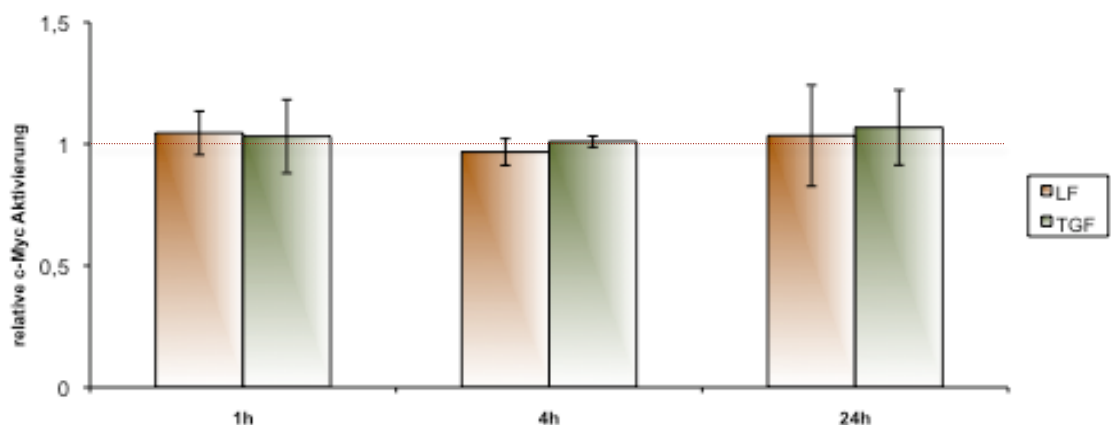


Abbildung 17: c-Myc-Expression nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation mit bovinem Laktoferrin (C = 50 μ g/ml) und TGF- β 1 (C = 1 ng/ml). GAPDH wurde als housekeeping gene verwendet.

Graphische Darstellung der relativen c-Myc-Expression im Zeitverlauf. Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt und die Ergebnisse mit der Ladekontrolle normalisiert.

Entgegengesetzt den Erwartungen, dass TGF- β 1 die Genexpression von c-Myc hemmt, kam es weder nach ein-, noch nach vier- beziehungsweise 24-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 zu Expressionsveränderungen. Auch die Inkubationen

mit Laktoferrin führten zu keinem untersuchten Zeitpunkt zu Effekten auf die c-Myc Expression.

4.6 Auswirkungen von bLF und TGF- β 1 auf das Apoptoseverhalten von THP-1 Zellen

Da durch das vorhergehende Experiment keinerlei Einflüsse auf die Expression von c-Myc nachgewiesen werden konnten, zogen wir in Erwägung, dass es durch die Behandlung mit TGF- β 1 eventuell zur Einleitung der Apoptose kommt. Auf Grund dieser Vermutung führten wir als Folgeexperiment einen Apoptose-Assay durch. Dafür wurden undifferenzierte THP-1 Zellen drei Tage lang mit den zu testenden Substanzen inkubiert, als Positivkontrolle dienten Zellen, die 15 Stunden lang mit UV-Licht bestrahlt wurden.

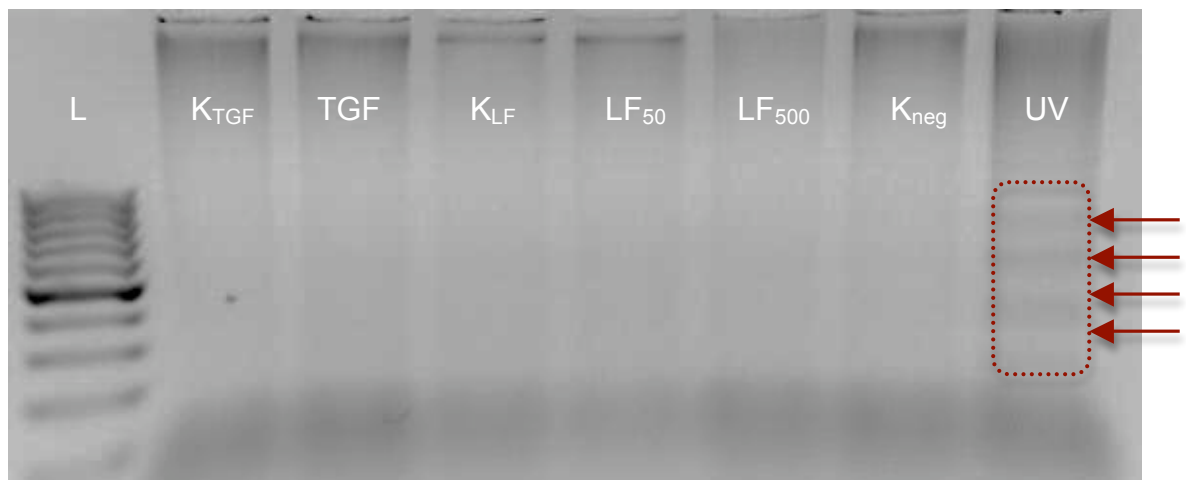


Abbildung 18: Agarosegel – abgebildet sind die Banden der einzelnen Proben nach Durchführung des Apoptose Assays im Duplikat. Jeweils 2 Millionen undifferenzierte THP-1 Zellen wurden für 72 Stunden mit TGF- β 1 in der Konzentration 1 ng/ml (TGF) und mit Laktoferrin in den Konzentrationen 50 und 500 μ g/ml (LF₅₀ & LF₅₀₀) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für ca. 15 Stunden mit UV-Licht bestrahlt (UV).

Nach 72-stündiger Behandlung undifferenzierter THP-1 Zellen mit den Testsubstanzen TGF- β 1 und LF konnten keine Hinweise auf die Einleitung des programmierten Zelltodes erkannt werden. Wie in der Bande der Positivkontrolle (die Zellen wurden hierfür für 15 Stunden mit UV-Licht bestrahlt)

ersichtlich ist, werden durch die Apoptose entstandene DNA-Bruchstücke sichtbar, sodass man davon ausgehen kann, dass der Versuch funktioniert hat.

4.7 Effekte von bLF und TGF- β 1 auf die Zellzahl der THP-1 Zellen

Nachdem es durch TGF- β 1 weder zu einer negativen Regulation der c-Myc-Expression gekommen ist, noch der programmierte Zelltod eingeleitet wurde, lag die Vermutung nahe, dass die Zellen nicht mehr wie gewohnt auf die Behandlung mit TGF- β 1 reagieren. Um den in unserer Arbeitsgruppe zuvor festgestellten, wachstumshemmenden Effekt des Zytokins auf die leukämische Zelllinie zu bestätigen, wurden die Zellen nach 72-stündiger Inkubation der zu untersuchenden Substanzen, wie im vorhergegangenen Apoptose-Assay, mit Hilfe des Casys ausgezählt.

Substanz	Messung	Total cells	Lebend	Viabilität %	Ø μ M
K _{TGF}	1.	$2,4 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	97,5	14,7
	2.	$2,9 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	98,0	14,7
TGF	1.	$2,5 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	97,3	14,3
	2.	$3,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	98,1	14,4
K _{LF}	1.	$2,1 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	96,5	15,0
	2.	$2,8 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	98,3	14,6
LF ₅₀	1.	$2,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	96,5	14,8
	2.	$2,7 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	98,1	14,6
LF ₅₀₀	1.	$1,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	95,1	14,1
	2.	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	98,0	14,1

Tabelle 5: Auswirkungen von TGF- β 1 und bLF auf die Zellzahl, Viabilität und Größe undifferenzierter THP-1 Zellen nach 72-stündiger Behandlung in den üblichen

Konzentrationen. Es wurden 2 unabhängige Messungen mit dem Casy durchgeführt, die Werte beziehen sich auf einen Milliliter Zellsuspension.

Beide durchgeführten Messungen der THP-1 Zellen ergaben, dass TGF- β 1 keinen Einfluss auf Wachstumsfähigkeit sowie Viabilität und Größe ausübt. Dies widerspricht jedoch den zuvor in unserer Arbeitsgruppe erarbeiteten Erkenntnissen, dass THP-1 Zellen durch TGF- β 1 in ihrem Wachstum gehemmt werden. Daraus schlussfolgerten wir, dass die THP-1 Zellen nicht mehr wie gewohnt auf TGF- β 1 reagieren, was zu den Ergebnissen der c-Myc-Analyse und des Apoptose Assays passen würde.

4.8 Direkte Aktivierung von TGF- β 1 durch Laktoferrin

Der Mechanismus, wie es durch Laktoferrin zur Aktivierung des Smad - Pathways kommt, ist noch ungeklärt. Eine Theorie ist, dass es eventuell zur direkten Aktivierung von TGF- β 1 durch LF kommt. Diese Annahme stützt sich auf die Erkenntnis, dass Laktoferrin eine Protease-Funktion einnehmen kann und die im Organismus am häufigsten beobachtete TGF- β 1-Aktivierung die Proteolyse darstellt.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden eine Reihe von ELISA-Versuchen durchgeführt, in denen die Aktivierung von latentem TGF- β 1 durch Laktoferrin überprüft wurde.

	Versuch	1h	4h	24h
K	1.	n.d.	n.d.	n.d.
	2.	n.d.	n.d.	n.d.
LF	1.	159,71 pg/ml	n.d.	n.d.
	2.	99,26 pg/ml	n.d.	n.d.
TGF	1.	960,74 pg/ml	908,89 pg/ml	831,29 pg/ml
	2.	1635,82 pg/ml	1631,38 pg/ml	1003,87 pg/ml

Tabelle 6: Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der ELISA-Versuche. Die Experimente nach 1-, 4- und 24-stündiger Behandlung mit LF (C = 50 μ g/ml) und TGF- β 1 (C = 1 ng/ml) wurden jeweils zweimal, unabhängig voneinander und im Triplikat, durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad/Prism. n.d. steht für „not detectable“

Wie man aus der Tabelle herauslesen kann, liegt die endogene Produktion der THP-1 Zellen von aktivem TGF- β 1 unterhalb der Nachweisgrenze von 62,5 pg/ml (n.d. in K).

Bei allen drei Zeitpunkten lag die TGF- β 1 – Wiederfindung bei etwa 1000 pg/ml, was der Inkubationskonzentration von 1 ng/ml entspricht.

Durch die Zugabe von Laktoferrin wurde bei den 1-Stunden-Proben eine kleine Menge TGF- β 1 aktiviert, nach vier und 24 Stunden lagen die TGF- β 1-Werte ebenso wie bei den Kontrollzellen im nicht detektierbaren Bereich.

Zusätzlich zu den Proben wurde reines Medium getestet, um zu überprüfen, ob eventuell von vornherein aktives TGF- β 1 darin enthalten ist, und außerdem wurde Zellkulturüberstand unbehandelter Zellen mit Laktoferrin inkubiert und analysiert, um sicherzustellen, dass gemessene Effekte tatsächlich auf die Aktivierung durch Laktoferrin zurückzuführen sind.

4.9 Effekte von Laktoferrin und TGF- β 1 auf den Smad-Pathway in differenzierten THP-1 Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde nach Durchführung einer Zellfraktionierung und anschließender Analyse der Kernfraktion mittels Western Blot, festgestellt, dass differenzierte THP-1 Zellen nicht mehr mit einer Smad-Translokation in den Zellkern auf TGF- β 1 reagieren. Diesen Effekt überprüften wir erneut mit Hilfe einer Immunfluoreszenz.

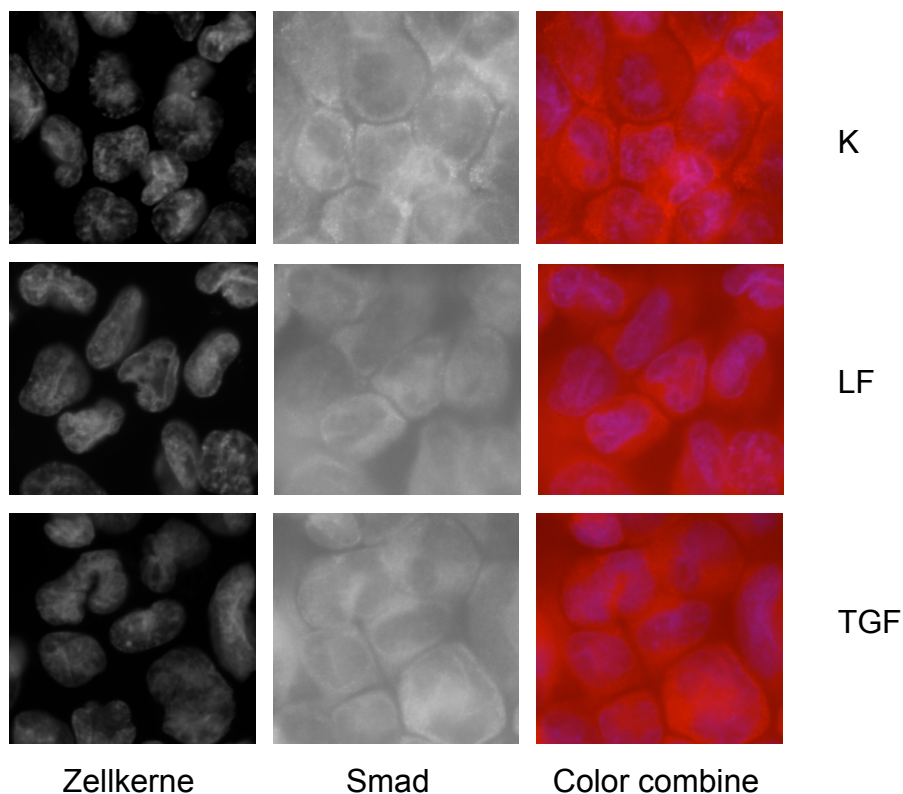


Abbildung 19: Bilder der Immunfluoreszenz. Analysiert wurde die Smad-2 Translokation in den Zellkern PMA-differenzierter THP-1 Zellen nach einstündiger Behandlung mit Laktoferrin in der Konzentration 500 μ g/ml und TGF- β 1 in der Konzentration 10 ng/ml. Die Zellkerne (links) wurden mittels DAPI gefärbt, Smad2 (Mitte) mittels Smad2 Antikörper und Tritc-konjugierten Secondary Antikörper. In der Überlagerung (rechts) sind die Kerne blau und Smad2 rot dargestellt.

Die Bilder der Immunfluoreszenz zeigen keinerlei Smad-2 Translokation in die Zellkerne, weder durch die Inkubation mit Laktoferrin, noch durch die mit TGF- β 1. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Zellfraktionierung, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass differenzierte THP-1 Zellen nicht mehr auf TGF- β 1 reagieren.

5 Diskussion

Das Milchprotein Laktoferrin und das Zytokin TGF- β 1 sind in wesentliche regulatorische und immunologische Prozesse im Organismus involviert, was in der Literatur bereits ausführlich beschrieben wurde. Eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen beiden wichtigen Substanzen sind bisher jedoch unerforscht. In unserer Arbeitsgruppe konnte innerhalb der letzten Jahre in unterschiedlichsten Zelllinien die Aktivierung des Smad-Pathways durch Laktoferrin beobachtet und beschrieben werden, über welchen Mechanismus dies jedoch geschieht, bedarf es noch herauszufinden.

Laktoferrin wurde 2004 mit der Stimulierung des Wachstums von Osteoblasten [CORNISH et al., 2004] in Verbindung gebracht, in unserer Arbeitsgruppe erwies sich das Protein ebenfalls wachstumsstimulierend auf humane artikuläre Chondrozyten [BRANDL, 2005]. Gegenteilige Effekte wurden jedoch zum Beispiel in HeLa – Zellen nachgewiesen [KREUZWIESER, 2006], in THP-1 Zellen wurde das Wachstum in keinerlei Hinsicht beeinflusst [SCHELCH, 2008]. Das ebenfalls wachstumsregulierende TGF- β 1 kann sich genauso hemmend und fördernd auf das Wachstum von Zellen auswirken; so erfahren zum Beispiel Epithel- oder Endothelzellen eine Wachstumshemmung, Mesenchymzellen hingegen eine Wachstumssteigerung [LEE und BAE, 2002, BATTEGAY et al., 1990]. Auch Monozyten werden durch das Zytokin in ihrem Wachstum gehemmt [BOMBARA und IGNOTZ, 1992], was in vorangegangenen Studien mit THP-1 Zellen bestätigt wurde [SCHELCH, 2008]. Somit wirken sich die beiden zu vergleichenden Substanzen bLF und TGF- β 1 unterschiedlich auf das Wachstum dieser Monozyten aus. In diesem Zusammenhang ist es noch wichtig zu erwähnen, dass die Wachstumskontrolle durch TGF- β 1, abgesehen von der Zelltypabhängigkeit, auch vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängt.

Der TGF- β 1 vermittelte Wachstumsstopp wird unter anderem durch die Induktion des, in den Zellzyklus eingebundenen, Proto-Onkogens c-Myc hervorgerufen [LEE und BAE, 2002]. Die Untersuchungen in dieser Studie, bezogen auf c-Myc, ergaben jedoch keinerlei Hemmwirkung auf die Genexpression durch TGF- β 1, was dem, zuvor festgestellten, wachstumshemmenden Effekt widerspricht.

TGF- β 1 ist jedoch auch in der Lage unter bestimmten Umständen die Apoptose in Zellen einzuleiten, was eine Erklärung für die fehlende Hemmwirkung auf die c-Myc Expression darstellen könnte. Der im Anschluss durchgeführte Versuch auf apoptotische Effekte durch TGF- β 1 fiel jedoch ebenfalls negativ aus. In der Literatur wird beschrieben, dass es in einigen Tumorzelllinien nach einer gewissen Zeit zu einer Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber den Apoptose einleitenden Effekten durch TGF- β 1 kommen kann [ELLIOTT und BLOBE, 2005].

Zellzählungen im Anschluss an diese unerwarteten Ergebnisse ergaben, dass TGF- β 1 die THP-1 Zellen nicht mehr in ihrem Wachstum hemmt. Daraus konnte geschlossen werden, dass diese Zellen nach einer gewissen Zeit auch nicht mehr auf die wachstumsregulatorischen Effekte von TGF- β 1 reagieren. In zahlreichen Studien wurde beschrieben, dass in 85 % aller menschlichen Karzinomzellen im Verlauf der Tumorgenese eine Resistenzentwicklung gegenüber TGF- β 1-vermittelter Effekte entsteht [NEELS et al., 1999]. Wie die oben diskutierten Ergebnisse der PAI-1 Analysen zeigten, verlieren die Zellen jedoch nicht die vollständige Antwortfähigkeit auf TGF- β 1. Nicolás F. und Hill C. brachten 2003 eine Abschwächung des Smad-Pathways in Pankreaskarzinomzellen mit dem Verlust der Reaktion auf die antiproliferativen Effekte von TGF- β 1 in Zusammenhang, während die Antworten auf andere, tumorgene Effekte des Zytokins unverändert blieben [NICOLÁS und HILL, 2003].

Die Inkubationen mit bovinem Laktoferrin ergaben im gesamten Studienverlauf keine wachstumshemmenden Effekte auf THP-1 Zellen, die Analysen des wachstumsregulierenden c-Myc blieben ebenfalls ohne Effekt und die Apoptose wurde diesen Erkenntnissen entsprechend nicht eingeleitet. Dies bestätigt die

Ergebnisse der Studie von Yoo et al., die besagen, dass Laktoferrin, eingesetzt in der hohen Konzentration von 500 µg/ml, im Gegensatz zu Laktoferricin, welches durch Spaltung von Laktoferrin durch Pepsin gebildet wird, keine apoptotischen Effekte auf THP-1 Zellen ausübt [YOO et al., 1997].

Durch den Einfluss von LF konnte in vorangegangenen Studien eine annähernd TGF-β1 vergleichbar starke Smad2-Akkumulation im Zellkern der THP-1 Zellen nachgewiesen werden [SCHELCH, 2008], was für die Aktivierung des Smad-Pathways durch LF spricht.

Um die physiologische Relevanz der Aktivierung dieses Pathways zu untersuchen, wurden die beiden TGF-β – Zielgene PAI-1 und Fibronektin auf transkriptioneller Ebene in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert. PAI-1, wurde bereits nach einstündiger Behandlung mit LF, zwar in etwas schwächerem Ausmaß, jedoch gleichermaßen signifikant wie durch TGF-β1, in seiner Expression stimuliert. Der Effekt war, in der eingesetzten Konzentration von 50 µg/ml, von kürzerer Dauer als der, der durch TGF-β1 hervorgerufen wurde, sodass er bereits nach 4 Stunden mit großen Schwankungen abnahm und nach 24 Stunden nicht mehr nachzuweisen war. Die Verzehnfachung der verwendeten Laktoferrinkonzentration auf 500 µg/ml führte jedoch nach 24 Stunden zu einer, zwar nicht signifikanten, aber dennoch beinahe gleichstarken Expression des Zielgens wie in Antwort auf TGF-β1. TGF-β1 und bLF, in höherer Dosis, sind somit in der Lage eine vermehrte Expression von PAI-1 zu induzieren, was eine Hemmung der Matrix-abbauenden Enzyme und in Folge die Verhinderung der EZM-Degradation mit sich bringt [MASSAGUE et al., 1990].

Das andere analysierte Zielgen Fibronektin, welches einen wesentlichen Bestandteil der EZM darstellt [IGNOTZ und MASSAGUE, 1986, MASSAGUE et al., 1990], wurde nach keiner der drei Inkubationszeiten mit Laktoferrin exprimiert und konnte auch nach Dosissteigerung auf das Zehnfache nicht gemessen werden, wohingegen TGF-β1 die Expression nach 24 Stunden deutlich hervorrief. Anhand dieser Ergebnisse kann man sagen, dass

Laktoferrin auch in THP-1 Zellen zur Aktivierung des Smad-Pathways und von klassischen TGF- β – Zielgenen führt, wobei die Effekte dosisabhängig sind.

Die verwendeten THP-1 Monozyten sind in der Lage, unter bestimmten Umständen zu Makrophagen zu differenzieren [AUWERX et al., 1988]. In der Literatur wird die Fähigkeit von TGF- β 1 beschrieben, das Wachstum von Monozyten zu hemmen und morphologische Veränderungen sowie ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten zu induzieren [BOMBARA und IGNOTZ, 1992]. Unsere morphologischen Analysen der THP-1 Zellen ließen auf Grund auffälliger Veränderungen Rückschlüsse zu, dass die Differenzierung zu Makrophagen durch Behandlung mit TGF- β 1 eventuell gefördert wird. Jedoch wurde, wie die Ergebnisse des Adhärenztestes mit Kristallviolett zeigten, die Adhärenz der Zellen nicht induziert. Die Laktoferrinbehandlung der THP-1 Monozyten veränderte weder die morphologischen Eigenschaften, noch führte es zur Adhärenz der Zellen, obwohl der Smad Pathway aktiviert wurde.

Im Verlauf der Differenzierung werden zahlreiche Gene reguliert, wie zum Beispiel LRP-1 oder Endoglin. Um den Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Differenzierung der THP-1 Zellen zu untersuchen, wurden folgende vier Gene genauer analysiert: Endoglin, da es als Co-Rezeptor eine integrale Komponente des TGF-Rezeptor Systems darstellt [BARBARA et al., 1999, LETAMENDIA et al., 1998]; LRP-1, da es als Rezeptor für Laktoferrin maßgeblich für die Weiterleitung dessen mitogener Effekte verantwortlich sein kann [LEGRAND et al., 2006, TAKAYAMA et al., 2003]; MMP-9, da es unter anderem durch TGF- β 1 reguliert wird [MASSAGUE et al., 1990] und eine wesentliche Rolle in der Zellmigration und –metastasierung spielt [SCHULTZ et al., 1988] und CD36, da es während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen vermehrt exprimiert wird [HUH et al., 1996].

Endoglin, MMP-9, CD 36 und LRP-1, die laut Literatur alle vier als Differenzierungsmarker für Makrophagen gelten [WATANABE et al., 1994, O'CONNELL et al., 1992, HUH et al., 1996, XIE et al., 1998], wurden nach 24-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 nicht vermehrt exprimiert. Dies wiederum spricht gegen die Förderung der Zelldifferenzierung durch das Zytokin, was

jedoch zu den Ergebnissen passt, dass die Zellen durch diesen Einfluss nicht adhärent werden. Dass LRP-1 erst mit der PMA-induzierten Differenzierung zu Makrophagen verstärkt in THP-1 Zellen exprimiert wird, zeigte bereits eine zuvor durchgeführte Studie in unserer Arbeitsgruppe [SCHELCH, 2008].

Die Untersuchungen des Vergleichsproteins Laktoferrin lieferten keine Anzeichen einer möglichen Förderung der Differenzierung, keiner der vier untersuchten Differenzierungsmarker wurde verstärkt exprimiert.

Der Mechanismus, über den Laktoferrin zur Aktivierung des Smad-Pathways führt, ist noch ungeklärt und die mögliche Aktivierung von latentem TGF- β 1 durch LF könnte Aufschluss darüber geben. Laktoferrin kann eine Protease-Funktion einnehmen [HENDRIXSON et al., 2003] und die im Organismus am häufigsten beobachtete TGF- β 1-Aktivierung erfolgt durch die Proteolyse [FORTUNEL et al., 2000]. Daher verfolgen wir unsere Hypothese einer direkten Aktivierung von TGF- β 1 durch Laktoferrin.

Die dazu durchgeführten ELISA-Experimente, in denen lediglich aktives TGF- β 1 gemessen wurde, führten zu dem Ergebnis, dass sich LF nach einstündiger Behandlung in geringem Ausmaß direkt aktivierend auf latentes TGF- β 1 auswirkt. Jedoch ist fraglich, ob diese geringe Aktivierung des TGF- β 1 tatsächlich ausschlaggebend dafür sein kann, den Smad-vermittelten Signaltransduktionsweg zu induzieren. Nach 4 und 24 Stunden konnte keine direkte Aktivierung mehr von TGF- β 1 durch Laktoferrin beobachtet werden.

Ebenso wie die undifferenzierten THP-1 Monozyten wahrscheinlich ihre Reaktion auf die wachstumshemmenden Effekte von TGF- β 1 mit der Zeit verlieren, entwickeln die differenzierten Makrophagen eine gewisse Resistenz, was erste Ergebnisse einer Zellfraktionierung und die anschließende Analyse der Kernfraktion ergaben. Es konnte keine Smad-Translokation in den Zellkern festgestellt werden, was dafür spricht, dass die differenzierten THP-1 Zellen einen vollständigen Reaktionsverlust auf TGF- β 1 – Effekte erfahren [SCHELCH, 2008]. Eine Immunfluoreszenz mit differenzierten THP-1 Zellen in dieser Studie konnte diese Ergebnisse bestätigen. Durch TGF- β 1 erfolgte

weder in der üblichen zugegebenen Konzentration, noch in der höheren eine Smad2-Translokation in den Zellkern, ebenso wenig wie durch die Laktoferrinzugabe. Sowohl die undifferenzierten, als auch die differenzierten THP-1-Zellen, verlieren offensichtlich mit der Zeit ihre Responsivität auf TGF- β 1-vermittelte Effekte, wie zum Beispiel die Einleitung der Apoptose oder die Hemmung des Wachstums. Aus welchem Grund die Zellen jedoch diese Resistenz entwickeln ist noch ungeklärt und entsprechend bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ist somit zu sagen, dass Laktoferrin in THP-1 Zellen nicht nur den TGF-Smadpathway aktiviert, sondern auch in weiterer Folge die Expression des klassischen TGF- β 1 Zielgens PAI-1 stimuliert, diese Eigenschaft aber verloren gehen kann.

Zwar lassen erste Versuche vermuten, dass Laktoferrin in der Lage ist, sich direkt aktivierend auf das Zytokin auszuwirken, jedoch muss in weiteren Studien vertiefend untersucht werden unter welchen Bedingungen dieser geringe Effekt für eine vollkommene Aktivierung verantwortlich sein kann.

6 Zusammenfassung

Dass das Glykoprotein Laktoferrin zur Aktivierung des TGF- β 1 Pathways in der Lage ist, wurde bereits in einigen vorangegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe in unterschiedlichsten Zelllinien, wie zum Beispiel Chondrozyten, HeLa-, Mef- oder Mink-Zellen, nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, Aufschluss über diesen Vorgang in der humanen monozytären leukämische Zelllinie THP-1, im direkten Vergleich zu TGF- β 1 selbst, zu erlangen. Als Grundlage dienten die Ergebnisse einer Zellfraktionierung und anschließender Analyse der Kernfraktion mittels Western Blot, die besagen, dass es durch beide Substanzen zu einer Smad2-Akkumulierung im Zellkern kommt. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde diese Studie mit dem Ziel, die physiologische Relevanz dieser Aktivierung zu untersuchen, durchgeführt.

RT-PCR-Analysen zeigten, dass die Aktivierung durchaus physiologische Effekte für die Zellen mit sich bringt. Laktoferrin stimulierte dosisabhängig das klassische Zielgen PAI-1 und erreichte in der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 μ g/ml beinahe einen gleichstarken Effekt wie TGF- β 1 selbst. Die Expression des anderen analysierten Zielgens Fibronectin wurde zwar auch durch TGF- β 1 erst nach 24 Stunden verstärkt stimuliert, im Gegensatz zu PAI-1 jedoch keineswegs durch Laktoferrin, auch nicht in der höheren Konzentration.

Auf die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zeigte Laktoferrin in keinem der durchgeführten Experimente Wirkung, ebenso wenig wie auf das Wachstum oder die Morphologie. Hingegen wirkte sich TGF- β 1 zu Beginn der Studie stark wachstumshemmend auf die Zellen aus, rief deutliche morphologische Veränderungen hervor, induzierte jedoch keinerlei Expression von Differenzierungsmarkern und förderte nicht die Adhäsion der Zellen. Im Verlauf der Studie verlor die Zelllinie die Reaktion auf das regulatorische

Zytokin und wurde nicht mehr in ihrem Wachstum gehemmt. In weiterer Folge kam es auch nicht zur Inhibierung der Expression von c-Myc, einem Gen, das maßgeblich in die Regulation des Zellzyklus involviert ist und unter normalen Umständen durch TGF- β 1 in seiner Wirkung gehemmt wird.

Auch die Analyse auf die apoptotischen Wirkungen von TGF- β 1 fiel negativ aus, was ebenso durch den Reaktionsverlust der Zellen auf das Zytokin zu erklären ist. Differenzierte THP-1 Zellen entwickeln ebenfalls eine gewisse Resistenz gegenüber den Wirkungen von TGF- β 1, was durch eine Analyse der Smad Translokation bestätigt werden konnte. Auch Laktoferrin führte zu keiner Smad-Akkumulierung im Zellkern in differenzierten THP-1 Zellen.

Vorläufige Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es durch Laktoferrin zu einer direkten Aktivierung von latentem TGF- β 1 kommt, jedoch ist nicht klar, ob das Ausmaß dieser Aktivierung ausreichend für die Aktivierung des Smad-Pathways ist, was es in weiteren Untersuchungen herauszufinden gilt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass THP-1 Zellen prinzipiell TGF- β 1-responsive sind, bestätigt durch die Ergebnisse der Zielgene PAI-1 und Fibronektin. Die Aktivierung des TGF-Smad-Pathways durch Laktoferrin ist durchaus physiologisch relevant für die THP-1 Zellen, was ebenfalls die PAI-1-Analysen zeigen. Die direkte Aktivierbarkeit von TGF- β 1 durch Laktoferrin liefert erste Ansätze, den Mechanismus, über den Laktoferrin den Smad-Pathway stimuliert, aufzuklären.

7 Summary

In recent studies the ability of the glycoprotein lactoferrin to activate the TGF- β 1 Pathway has been investigated and confirmed in different cell lines like chondrocytes, HeLa-, Mef – or Mink-cells.

The purpose of the present study was to investigate this activation in the human monocytic leukemia cell line THP-1 compared in relation to the effects of TGF- β 1. The experiments were based on the results of a cell fractionation, followed by an analysis of the fraction of the nucleus by western blotting. They indicated that treatment with lactoferrin and TGF- β 1 results in a Smad2-accumulation in the nucleus. These findings initiated us to carry out this study aiming at the investigation of the physiological relevance of this activation.

RT-PCR-analyses showed that this activation results in physiological effects in THP-1 cells. Depending on the dose lactoferrin used in the highest concentration of 500 μ g/ml has stimulated the target-gene PAI-1 and has reached an effect, equally intense as TGF- β 1. The expression of the target gene fibronectin was stimulated, but took a 24-hour treatment with TGF- β 1 and compared to the effect on PAI-1 lactoferrin induced no stimulation of fibronectin expression, neither in low nor in high doses.

Neither has the differentiation of monocytes into macrophages been induced by the treatment with lactoferrin nor has growth or morphology changed at all. In contrast TGF- β 1 inhibited the growth of the THP-1 cells in the beginning of the experiments and induced clear changes in morphology. But TGF- β 1 had no effects on the expression of the differentiation markers and has not induced the adhesion of the cells. In the process of the study the leucemic cells lost their reaction towards the regulating cytokine and have not been inhibited in their growth anymore. In addition, the expression of the c-myc gene which is involved in the regulation of the cell cycle has not been inhibited by the treatment with TGF- β 1, a quite unusual effect.

Experiments concerning the apoptotic effects of TGF- β 1 have not shown any effects and confirmed the loss of reaction of the cells towards the cytokine. Differentiated THP-1 cells also developed a resistance towards TGF- β 1, what could be confirmed by immunofluorescence. Lactoferrin did not lead to an accumulation of Smad in the nucleus of differentiated THP-1 cells, either.

Preliminary results lead to the presumption that lactoferrin directly activates latent TGF- β 1. To this end we are not sure that this effect is sufficient for the activation of the Smad Pathway. Analysing the conditions that promote the activation of this impact may be appropriate for further research.

Summing up the results proved that THP-1 cells generally are TGF- β 1 responsive. This has been confirmed by the results of the TGF- β 1 target gene analyses. The analyses of PAI-1 also indicated that the activation of the TGF-Smad-Pathway by lactoferrin is physiologically relevant for the THP-1 cells. The ability of lactoferrin for activating TGF- β 1 directly gives first insights into the mechanism by which lactoferrin leads to the stimulation of the Smad Pathway.

8 Literaturverzeichnis

AFELTRA A, CACCAVO D, FERRI GM, ADDESSI MA, DE ROSA FG, AMOROSO A, BONOMO L. Expression of lactoferrin on human granulocytes: analysis with polyclonal and monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1997; 109: 279-285.

ALEXANDER SS, JR., COLONNA G, YAMADA KM, PASTAN I, EDELHOCH H. Molecular properties of a major cell surface protein from chick embryo fibroblasts. J Biol Chem 1978; 253: 5820-5824.

AUWERX JH, DEEB S, BRUNZELL JD, PENG R, CHAIT A. Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. Biochemistry 1988; 27: 2651-2655.

BAGGIOLINI M, DE DUVE C, MASSON PI, HEREMANS JF. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. 1970; 559-570.

BAKER EN. Lactoferrin: A multi-tasking protein par excellence. Cellular and Molecular Life Sciences 2005; 62: 2529-2530.

BAKER EN, ANDERSON BF, BAKER HM, DAY CL, HARIDAS M, NORRIS GE, RUMBALL SV, SMITH CA, THOMAS DH. Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. Adv Exp Med Biol 1994; 357: 1-12.

BAKER EN, BAKER HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2531-2539.

BAKER EN, BAKER HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. Biochimie 2008.

BAKER EN, RUMBALL SV, ANDERSON BF. Transferrins: insights into structure and function from studies in lactoferrin. TIBS 1987; 12: 350-353.

BALAZOVICH KJ, FERNANDEZ R, HINKOVSKA-GALCHEVA V, SUCHARD SJ, BOXER LA. Transforming growth factor-beta1 stimulates degranulation and oxidant release by adherent human neutrophils. J Leukoc Biol 1996; 60: 772-777.

BARBARA NP, WRANA JL, LETARTE M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. J Biol Chem 1999; 274: 584-594.

BATTEGAY EJ, RAINES EW, SEIFERT RA, BOWEN-POPE DF, ROSS R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990; 63: 515-524.

BAUVOIS B, VAN WEYENBERGH J, ROUILLARD D, WIETZERBIN J. TGF-beta 1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN-gamma: dependence on alpha 5 beta 1 and beta 2 integrins. *Exp Cell Res* 1996; 222: 209-217.

BAVEYE S, ELASS E, FERNIG DG, BLANQUART C, MAZURIER J, LEGRAND D. *Infection and Immunity* 2000; 68: 6519-6525.

BAVEYE S, ELASS E, MAZURIER J, SPIK G, LEGRAND D. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(3): 281-286.

BENNET RM, KOKOCINSKI T. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1978; 39(4):509-521.

BERNHARD EJ, GRUBER SB, MUSCHEL RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4293-4297.

BIRGENS HS. Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia. *Scand J Haematol* 1985; 34(4):326-331.

BLANCO FJ, SANTIBANEZ JF, GUERRERO-ESTEO M, LANGA C, VARY CP, BERNABEU C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005; 204: 574-584.

BLOBE GC, SCHIEMANN WP, LODISH HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358.

BOMBARA C, IGNOTZ RA. TGF-beta inhibits proliferation of and promotes differentiation of human promonocytic leukemia cells. *J Cell Physiol* 1992; 153: 30-37.

BOSMA PJ, VAN DEN BERG EA, KOOISTRA T, SIEMIENIAK DR, SLIGHTOM JL. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1988; 263: 9129-9141.

BOUCHARD C, STALLER P, EILERS M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 202-206.

BRANDL N. New Receptor-Ligand Interactions in Chondrocyte Metabolism. Dissertation am Institut für medizinische Chemie 2005

BRITIGAN BE, SERODY JS, HAYEK MB, CHARNIGA LM, COHEN MS. Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane autoperoxidation. *J Immunol* 1991; 147(12): 4271-4277.

CAO C, LAWRENCE DA, LI Y, VON ARNIM CA, HERZ J, SU EJ, MAKAROVA A, HYMAN BT, STRICKLAND DK, ZHANG L. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *Embo J* 2006; 25: 1860-1870.

CHEIFETZ S, BELLON T, CALES C, VERA S, BERNABEU C, MASSAGUE J, LETARTE M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 19027-19030.

CHEN CL, LIN IH, FLIESLER SJ, HAN X, HUANG SS, HUANG JS. Cholesterol suppress cellular TGF- β responsiveness: implications in atherogenesis. *Journal of Cell Science* 2007; 120: 3509-3621.

CHEN YG, MASSAGUE J. Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 3672-3677.

CHOI ME, BALLERMANN BJ. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 21144-21150.

CLAASSEN GF, HANN SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9498-9503.

CLARK DA, COKER R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 293-298.

CORNISH J, CALLON KE, NAOT D, PALMANO KP, BANOVIC T, BAVA U, WATSON M, LIN JM, TONG PC, CHEN Q, CHAN VA, REID HE, FAZZALARI N, BAKER HM, BAKER EN, HAGGARTY NW, GREY AB, REID IR. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 2004; 145: 4366-4374.

CUBELLIS MV, WUN TC, BLASI F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J* 1990; 9: 1079-1085.

CURRAN CS, DEMICK KP, MANSFIELD JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways. *Cellular Immunology* 2006; 242: 23-30.

CZEKAY RP, AERTGEERTS K, CURRIDEN SA, LOSKUTOFF DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 2003; 160: 781-791.

CZEKAY RP, KUEMMEL TA, ORLANDO RA, FARQUHAR MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1467-1479.

DECLERCK PJ, DE MOL M, ALESSI MC, BAUDNER S, PAQUES EP, PREISSNER KT, MULLER-BERGHHAUS G, COLLEN D. 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* 1988; 263: 15454-15461.

DENG G, CURRIDEN SA, HU G, CZEKAY RP, LOSKUTOFF DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol* 2001; 189: 23-33.

DESRUISSEAU S, GHAZAROSSIAN-RAGNI E, CHINOT O, MARTIN PM. Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1996; 66: 796-801.

DONJERKOVIC D, SCOTT DW. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res* 2000; 10: 1-16.

DOREE M, GALAS S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *Faseb J* 1994; 8: 1114-1121.

DUBOIS CM, LAPRISE MH, BLANCHETTE F, GENTRY LE, LEDUC R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 1995; 270: 10618-10624.

ELLIOTT RL, BLOBE GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-2093.

EVAN G, LITTLEWOOD T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.

EVAN GI, VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348.

FORTUNEL NO, HATZFELD A, HATZFELD JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 2022-2036.

GILLETT CE, BARNES DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 1998; 51: 310-316.

GRADY WM, MYEROFF LL, SWINLER SE, RAJPUT A, THIAGALINGAM S, LUTTERBAUGH JD, NEUMANN A, BRATTAIN MG, CHANG J, KIM SJ, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, WILLSON JK, MARKOWITZ S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 320-324.

GRAINGER DJ, MOSEDALE DE, METCALFE JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 133-145.

GRANDORI C, EISENMAN RN. Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 177-181.

GREY A, BANOVIC B, ZHOU O, WATSON M, CALLON K, PALMONO K, ROSS J, NAOT D, REID IR, CORNISH J. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2004; 18(9): 2268-2278.

GROVES ML. The isolation of a red protein from milk. 1960; 82: 3345-3350.

GUERRERO-ESTEO M, SANCHEZ-ELSNER T, LETAMENDIA A, BERNABEU C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002; 277: 29197-29209.

HÅVERSEN L, OHLSSON BG, HAHN-ZORIC, HANSON LÅ, MATTSBY-BALTZER I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappaB. *Cellular Immunology* 2002; 220: 83-95.

HEKMAN CM, LOSKUTOFF DJ. Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* 1985; 260: 11581-11587.

HENDRIXSON DR, QIU J, SHEWRY SC, FINK DL, PETTY S, BAKER EN, PLAUT AG, ST GEME JW, 3RD. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. *Mol Microbiol* 2003; 47: 607-617.

HERZ J, BEFFERT U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 51-58.

HERZ J, HAMANN U, ROGNE S, MYKLEBOST O, GAUSEPOHL H, STANLEY KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 1988; 7: 4119-4127.

HERZ J, KOWAL RC, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *Embo J* 1990; 9: 1769-1776.

HERZ J, STRICKLAND DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001; 108: 779-784.

HUBER H, EGGERT A, JANSS AJ, WIEWRODT R, ZHAO H, SUTTON LN, RORKE LB, PHILLIPS PC, GROTZER MA. Angiogenic profile of childhood primitive neuroectodermal brain tumours/medulloblastomas. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2064-2072.

HUG H. Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 2000; 30: 128-135.

HUH H, PEARCE SF, YESNER LM, SCHINDLER JL, SILVERSTEIN RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 1996; 87:2020-2028.

HYNES RO, YAMADA KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 369-377.

IGNOTZ R, MASSAGUÉ J. Transforming Growth Factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261: 4337-4345.

JOHANSON B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand* 1960; 14: 510-512.

KANWAR JR, PALMANO KP, SUN X, KANWAR RK, GUPTA R, HAGGARTY N, ROWAN A, RAM S, KRISSANSEN GW. 'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 277-288.

KAVSAK P, RASMUSSEN RK, CAUSING CG, BONNI S, ZHU H, THOMSEN GH, WRANA JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365-1375.

KIM WS, PARK C, JUNG YS, KIM HS, HAN J, PARK CH, KIM K, KIM J, SHIM YM, PARK K. Reduced transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-beta RII) expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res* 1999; 19: 301-306.

KINGSLEY DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8: 133-146.

KLEEFF J, ISHIWATA T, MARUYAMA H, FRIESS H, TRUONG P, BUCHLER MW, FALB D, KORC M. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 1999; 18: 5363-5372.

KREUZWIESER P. Der Einfluss von Laktoferrin und TGF- β auf die Zellproliferation und die Signaltransduktion. 2006

KRUITHOF EK. Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* 1988; 40: 113-121.

LAIHO M, SAKSELA O, ANDREASEN PA, KESKI-OJA J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor- β . *The Journal of Cell Biology* 1986a; 103 (Pt 1): 2403-2410.

LAIHO M, SAKSELA O, KESKI-OJA J. Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human akin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1986b; 164(2): 399-407.

LANDSTROM M, EKLOV S, COLOSETTI P, NILSSON S, DAMBER JE, BERGH A, FUNA K. Estrogen induces apoptosis in a rat prostatic adenocarcinoma: association with an increased expression of TGF-beta 1 and its type-I and type-II receptors. *Int J Cancer* 1996; 67: 573-579.

LASTRES P, LETAMENDIA A, ZHANG H, RIUS C, ALMENDRO N, RAAB U, LOPEZ LA, LANGA C, FABRA A, LETARTE M, BERNABEU C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 1996; 133: 1109-1121.

LASTRES P, MARTIN-PEREZ J, LANGA C, BERNABEU C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* 1994; 301 (Pt 3): 765-768.

LEE KY, BAE SC. TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 47-53.

LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, MAZURIER J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 282-290.

LETAMENDIA A, LASTRES P, BOTELLA LM, RAAB U, LANGA C, VELASCO B, ATTISANO L, BERNABEU C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998; 273: 33011-33019.

LIN TH, ROSALES C, MONDAL K, BOLEN JB, HASKILL S, JULIANO RL. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 16189-16197.

LING JM, SCHRYVERS AB. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 275-281.

LÖFFLER G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003

MAEHARA Y, KAKEJI Y, KABASHIMA A, EMI Y, WATANABE A, AKAZAWA K, BABA H, KOHNOE S, SUGIMACHI K. Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 607-614.

MASSAGUE J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.

MASSAGUE J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169-178.

MASSAGUE J, CHEIFETZ S, BOYD FT, ANDRES JL. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593: 59-72.

MASSAGUE J, CHEN YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000; 14: 627-644.

MASSON PL, HEREMANS JF, SCHONNE E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 1969; 130(3):643-658.

MASSON PL, HEREMANS JF, DIVE CH. An iron-binding Protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta* 1966; 14: 735-639.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 1998; 12: 1075-1095.

MATSUURA I, DENISSOVA NG, WANG G, HE D, LONG J, LIU F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004; 430: 226-231.

MIYAZAWA K, MANTEL C, LU L, MORRISON DC, BROXMEYER HE. Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells. *J Immunol* 1991; 146(2):723-729.

METZ-BOUTIGUE MH, JOLLES J, MAZURIER J, SCHOENTGEN F, LEGRAND D, SPIK G, MONTREUIL J, JOLLES P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem* 1984; 145: 659-676.

MIYAZAWA K, SHINOZAKI M, HARA T, FURUYA T, MIYAZONO K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002; 7: 1191-1204.

MOENS CB, AUERBACH AB, CONLON RA, JOYNER AL, ROSSANT J. A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev* 1992; 6: 691-704.

MOTTONEN J, STRAND A, SYMERSKY J, SWEET RM, DANLEY DE, GEOGHEGAN KF, GERARD RD, GOLDSMITH EJ. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 1992; 355: 270-273.

MOUSTAKAS A. Smad signalling network. *J Cell Sci* 2002; 115: 3355-3356.

MOUSTAKAS A, SOUCHELNYTSKYI S, HELDIN CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369.

MUNGER K, PIETENPOL JA, PITTELKOW MR, HOLT JT, MOSES HL. Transforming growth factor beta 1 regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 291-298.

NEELS JG, VAN DEN BERG BM, LOOKENE A, OLIVECRONA G, PANNEKOEK H, VAN ZONNEVELD AJ. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 31305-31311.

NICOLÁS FJ, HILL CS. Attenuation of the TGF- β - Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF- β induced growth arrest. *Oncogene* 2003; 22: 1698-3711.

NICHOLL SM, ROZTOCIL E, DAVIES MG. Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2006; 4: 101-116.

O'CONNELL PJ, MCKENZIE A, FISICARO N, ROCKMAN SP, PEARSE MJ, D'APICE AJ. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 154-159.

OH SP, SEKI T, GOSS KA, IMAMURA T, YI Y, DONAHOE PK, LI L, MIYAZONO K, TEN DIJKE P, KIM S, LI E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2626-2631.

PASCHE B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186: 153-168.

PELENGARIS S, KHAN M, EVAN G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 764-776.

PIETENPOL JA, HOLT JT, STEIN RW, MOSES HL. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3758-3762.

RENNER U, LOHRER P, SCHAAF L, FEIRER M, SCHMITT K, ONOFRI C, ARZT E, STALLA GK. Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3759-3765.

ROSS S, HILL CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 383-408.

ROUSSEL MF, CLEVELAND JL, SHURTLEFF SA, SHERR CJ. Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* 1991; 353: 361-363.

RUDOLPH B, SAFFRICH R, ZWICKER J, HENGLEIN B, MULLER R, ANSORGE W, EILERS M. Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *Embo J* 1996; 15: 3065-3076.

SALONEN EM, VARTIO T, HEDMAN K, VAHERI A. Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein. *J Biol Chem* 1984; 259: 1496-1501.

SCHELCH S. Signaltransduktion und Genexpression in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 unter dem Einfluss von TGF- β und Laktoferrin. 2008

SCHMIERER B, HILL CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 970-982.

SCHULTZ RM, SILBERMAN S, PERSKY B, BAJKOWSKI AS, CARMICHAEL DF. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5539-5545.

SCHUSTER N, KRIEGLSTEIN K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 1-14.

SENKOVICH O, COOK WJ, MIRZA S, HOLLINGSHEAD SK, PROTASEVICH, II, BRILES DE, CHATTOPADHYAY D. Structure of a complex of human

lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. *J Mol Biol* 2007; 370: 701-713.

SUZUKI YA, LOPEZ B, LÖNNERDAL B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62: 2560-2575

TAKAYAMA Y, TAKAHASHI H, MIZUMACHI K, TAKEZAWA T. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced collagen gel contractile activity of human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 22112-22118.

TERAMOTO T, KISS A, THORGEIRSSON SS. Induction of p53 and Bax during TGF-beta 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 56-60.

THALAKER FW, NILSEN-HAMILTON M. Specific induction of secreted proteins by transforming growth factor-beta and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Relationship with an inhibitor of plasminogen activator. *J Biol Chem* 1987; 262(5):2283-2298.

THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P. Anatomie Physiologie Pathophysiologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999

TSUCHIYA S, KOBAYASHI Y, GOTO Y, OKUMURA H, NAKAE S, KONNO T, TADA K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982; 42: 1530-1536.

TSUCHIYA S, YAMABE M, YAMAGUCHI Y, KOBAYASHI Y, KONNO T, TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176.

TSUKAZAKI T, CHIANG TA, DAVISON AF, ATTISANO L, WRANA JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 1998; 95: 779-791.

VAN MOURIK JA, LAWRENCE DA, LOSKUTOFF DJ. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 14914-14921.

VAUX DL, KORSMEYER SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254.

VUENTO M, SEKIGUCHI K, KORKOLAINEN M. Identification of fibronectin fragments that bind to carboxy-group-modified proteins. *Biochem J* 1983; 215: 613-616.

WAGNER DD, HYNES RO. Domain structure of fibronectin and its relation to function. Disulfides and sulfhydryl groups. J Biol Chem 1979; 254: 6746-6754.

WAKEFIELD LM, LETTERIO JJ, CHEN T, DANIELPOUR D, ALLISON RS, PAI LH, DENICOFF AM, NOONE MH, COWAN KH, O'SHAUGHNESSY JA, ET AL. Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 1995; 1: 129-136.

WANG AC, FU L. Fibronectin regulates the activation of THP-1 cells by TGF-beta1. Inflamm Res 2001; 50: 142-148.

WANG ZQ, LIANG KH, PAHL MV, VAZIRI ND. Effect of heparin on mesangial cell growth and gene expression of matrix proteins. Nephrol Dial Transplant 1998; 13: 3052-3057.

WARNER BJ, BLAIN SW, SEOANE J, MASSAGUE J. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. Mol Cell Biol 1999; 19: 5913-5922.

WATANABE Y, INABA T, SHIMANO H, GOTODA T, YAMAMOTO K, MOKUNO H, SATO H, YAZAKI Y, YAMADA N. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1000-1006.

WIEMAN TJ, MANG TS, FINGAR VH, HILL TG, REED MW, COREY TS, NGUYEN VQ, RENDER ER, JR. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. Surgery 1988; 104: 512-517.

WILLNOW TE, MOEHRING JM, INOCENCIO NM, MOEHRING TJ, HERZ J. The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. Biochem J 1996; 313 (Pt 1): 71-76.

WIMAN B, ALMQUIST A, SIGURDARDOTTIR O, LINDAHL T. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma. FEBS Lett 1988; 242: 125-128.

WOODHOUSE EC, CHUAQUI RF, LIOTTA LA. General mechanisms of metastasis. Cancer 1997; 80: 1529-1537.

XU L, CHEN YG, MASSAGUE J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. Nat Cell Biol 2000; 2: 559-562.

YAMAMURA Y, HUA X, BERGELSON S, LODISH HF. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis. J Biol Chem 2000; 275: 36295-36302.

YOO YC, WATANABE R, KOIKE Y, MITOBE M, SHIMAZAKI K, WATANABE S, AZUMA I. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 237: 624-628.

YU J, ZHANG L, CHEN A, XIANG G, WANG Y, WU J, MITCHELSON K, CHENG J, ZHOU Y. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling. *J Cell Physiol* 2008; 215: 422-433.

YU RH, SCHRYVERS AB. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 81-90.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Adresse

Karin Pröpper
Rauchgasse 36/18
A-1120 Wien

Email: karin.proepper@web.de
Mobil: +43 650 5150909

Geb.: 13. Mai 1983



AUSBILDUNG

März 2003 **Universität Wien-**
Okt 2008 **Studium der Ernährungswissenschaften**
Schwerpunkt: Ernährung und Ökonomie

Okt 2002- **Universität Wien**
März 2003 **Pflegewissenschaften**

Aug 1993- **Gymnasium zum Altenforst, Troisdorf (D)-**
Juni 2002 **Abitur**

Sep 1989- **Volksschule Brückberg, Siegburg (D)**
Jun 1993

BERUFSERFAHRUNG

Seit Nov **Institut für medizinische Chemie, Wien**
2007 **Diplomandin**

8. - 31. Okt **Institut für medizinische Chemie, Wien**
2007 **Praktikantin**

2. Jul 2007- **Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Bonn**
28. Sep 07 **Praktikantin**

25. Jan **Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung (AKE), Wien**
2007 **Praktikantin am NutritionDay 2007**

1.-14. Feb **Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung (AKE), Wien**
2007 **Praktikantin**

14. Aug – **Lebensmittel- und Gewerbeüberwachung des Ordnungs- und**
8. Sep 2006 **Straßenverkehrsamtes der Bundesstadt Bonn**
Praktikantin

1.-31. Aug **Club Heide Ecker-Rosendahl GmbH, Leverkusen**
2005 **Praktikantin**

SONSTIGE INTERESSEN

Sprachkenntnisse

- Englisch: fließend
- Französisch: Grundkenntnisse
- Spanisch: Grundkenntnisse
- Portugiesisch: Grundkenntnisse

IT Skills

- Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)
- Prism
- Photoshop
- Internet

Hobbies

- Sport (Schwimmen, Inliner, Squash)
- Reisen
- Lesen

Weitere Interessen

- Mitgliedschaft bei der ÖGE (Österreichische Gesellschaft für Ernährung)
- Ehrenamtliche Mitarbeit im Aids Hilfe Haus Wien

Wien, den 23. September 2008