



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Laktoferrininduzierte Signaltransduktion und Genexpression in THP-1 Monozyten“

Band 1 von 1

Verfasserin

Ellen Maria Wetzel

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im März 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger

DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich herzlich:

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Manfred Hüttinger für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Thematik, die Gelegenheit als Tutorin tätig zu sein und vor allem für die stets optimistische Zusprache und Zuversicht vor diversen Vorträgen, was wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich gelernt habe, auch an mich selbst zu glauben.

Dr. Nina Kaori Zemann für alles was ich bei ihr gelernt habe, die hervorragende Einschulung und Betreuung, ihre unermüdliche Geduld, Unterstützung und Hilfe im Labor und für ihr stets fröhliches Wesen.

Beiden zusammen für das überaus angenehme Arbeitsklima, die Freiheit selbstständig zu arbeiten und die unterhaltsamen Pausen.

Dr. Sabine Schreier für die Bereitstellung der THP-1 Monozyten und die feinen Gespräche.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, die Unbeschwertheit, das viele Lachen und das Wissen, dass sie immer für mich da sind, was meiner Ansicht nach eines der wichtigsten Dinge im Leben ist.

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
III	TABELLENVERZEICHNIS	XI
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	3
2.1	Laktoferrin	3
2.1.1	Struktur	3
2.1.2	Vorkommen	3
2.1.3	Biologische Funktionen	4
2.1.4	Laktoferrinrezeptoren	9
2.1.4.1	MMPs - Matrix Metalloproteinasen	12
2.2	TGF-β1 – transforming growth factor-beta1	14
2.2.1	Struktur, Synthese, Aktivierung	14
2.2.2	TGF- β /Smad Pathway	15
2.2.2.1	SB-431542	19
2.2.3	MAPK Pathway (mitogen-activated protein kinase pathway)	19
2.2.3.1	U0126	23
2.2.3.2	SB202190	23
2.2.4	PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)	23
2.2.5	Biologische Funktionen von TGF- β	26
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Zellkultur	31
3.1.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	31
3.1.2	Arbeitsbedingungen	32
3.1.3	Zelllinie	33
3.1.3.1	THP-1 Zelllinie	33

3.1.3.2 Monozyten-Makrophagen-Differenzierung	33
3.1.4 Zellkulturmedium	33
3.1.5 Kultivierung der Zellen	34
3.1.6 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität	34
3.1.7 Aussetzen der Zellen	34
3.1.8 Inkubation	35
3.2 Zellfraktionierung	36
3.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	36
3.2.2 Durchführung	36
3.3 Lysieren von Zellen	38
3.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	38
3.3.2 Durchführung	39
3.4 Proteinbestimmung	40
3.4.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	40
3.4.2 Durchführung	40
3.5 Western Blot	41
3.5.1 SDS Gelelektrophorese	41
3.5.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	41
3.5.1.2 Polyacrylamidgele	43
3.5.1.3 Probenvorbereitung	44
3.5.1.4 Beladung der Gele und Elektrophorese	45
3.5.2 Western Transfer Blotting	45
3.5.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	45
3.5.2.2 Durchführung	46
3.5.3 Immunodetektion	47
3.5.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	47
3.5.3.2 Durchführung	50
3.6 Gelatinezymogramm	51
3.6.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	51
3.6.2 Gelatinepolyacrylamidgele	53
3.6.3 Probenvorbereitung	54
3.6.4 Gelbeladung und Elektrophorese	54

3.6.5	Inkubation	54
3.7	RNA-Extraktion, reverse Transkription, cDNA-Synthese	54
3.7.1	Probenherstellung PCR	54
3.7.2	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	55
3.7.3	RNA-Extraktion	56
3.7.4	Reverse Transkription, Umschreibung in cDNA	57
3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
3.8.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	58
3.8.2	Durchführung	60
3.9	Wachstumsverlauf	62
3.9.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	62
3.9.2	Durchführung	62
3.10	Adhäsionstest; Kristallviolettffärbung	63
3.10.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	63
3.10.2	Durchführung	64
3.11	Zellproliferationsassay	64
3.11.1	Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien	64
3.11.2	Durchführung	65
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF-β1 auf die Signaltransduktion und die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 zur Überprüfung der Beteiligung des MAPK Pathways	67
4.1.1	Aktivierung von MAPKAP2 in THP-1 Monozyten und Caco-2 Zellen	68
4.1.2	Einfluss von bovinem Laktoferrin auf die Aktivierung der MAPKs ERK1/2 und p38 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in einzelner und kombinierter Form	68
4.1.3	Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190	70

4.1.4	Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190	71
4.1.5	Einfluss von TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 und p38 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in kombinierter Form	72
4.1.6	TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190	73
4.2	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF-β1 auf die Signaltransduktion und die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542 zur Überprüfung der Beteiligung des Smad Pathways	74
4.2.1	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Akkumulation von Smad2 in der Kernfraktion von THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542	75
4.2.2	Bovines Laktoferrin und TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542	76
4.3	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF-β1 auf das Wachstum von THP-1 Monozyten	78
4.4	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF-β1 auf die Adhärenz von THP-1 Zellen	81
4.5	Protein Assay zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen suspendierten und adhärenen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF-β1 und PMA	82
4.5.1	Effekt von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die c-Myc mRNA Expression in THP-1 Monozyten unter Beteiligung von SB-431542	83
4.6	Morphologischer Vergleich von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF-β1 und PMA	84

4.7	Zellproliferationsassay zur Bestimmung der Anzahl an viablen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA	85
4.8	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in THP-1 Zellen	86
5	DISKUSSION	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	ABSTRACT	99
V	LITERATURVERZEICHNIS	XVI

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Grafische Darstellung der Struktur von holo-Laktoferrin [modifiziert nach BAKER und BAKER, 2009].	3
Abbildung 2:	Grafische Darstellung der Struktur von LRP-1 [modifiziert nach HERZ und STRICKLAND, 2001].	10
Abbildung 3:	Grafische Darstellung des LLC [modifiziert nach WIPFF und HINZ, 2008].	15
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Smad Pathway [MASSAGUÉ, 2000].	17
Abbildung 5:	Strukturformel von SB-431542 [Datasheet SB-431542, BIOVISION, 2009].	19
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des MAPK Pathway [modifiziert nach HOMMES et al., 2003].	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Crosstalks zwischen dem Smad und MAPK Pathway [MASSAGUÉ, 2000].	22
Abbildung 8:	Strukturformel von U0126 [Datasheet U0126, MERCK, 2011].	23
Abbildung 9:	Strukturformel von SB202190 [Datasheet SB202190, SIGMA-ALDRICH, 2003].	23
Abbildung 10:	Transferkammer und Aufbau des Western Blot Sandwich [www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193].	46
Abbildung 11:	Proteinleiter als Referenz zur Größenzuordnung der verwendeten Primärantikörper.	50
Abbildung 12:	Repräsentative Abbildung des Western Blot Signals von p-MAPKAP2 nach 4-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (33,3µg/ml) sowie U0126 (6,6µM), nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (1,3µM) (1-4) und nach 4-stündiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit ZnCl ₂ (200µg/ml) (5).	68

Abbildung 13:	Effekt von bovinem Laktoferrin auf die Aktivierung der MAPKs p38 und pERK1/2 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190.	68
Abbildung 14:	Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und der Einfluss von U0126 und SB202190.	70
Abbildung 15:	Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in kombinierter Form.	71
Abbildung 16:	Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p38, pERK1/2 in THP-1 Monozyten nach 4-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 (1ng/ml) sowie U0126 (6,6 μ M) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (1,3 μ M); panERK diene als Ladekontrolle.	72
Abbildung 17:	TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190.	73
Abbildung 18:	Einfluss von bovinem Laktoferrin sowie TGF- β 1 auf die relative Smad2 Akkumulation in der Kernfraktion von THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542.	75
Abbildung 19:	Einfluss von bovinem Laktoferrin sowie TGF- β 1 auf die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542.	76
Abbildung 20:	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf das Wachstum von THP-1 Monozyten.	79
Abbildung 21:	Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf das Adhärenzverhalten von THP-1 Monozyten.	81
Abbildung 22:	Protein Assay zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen suspendierten und adhärenen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA.	82

- Abbildung 23:** Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen c-Myc Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (50µg/ml) sowie TGF-β1 (1ng/ml) und 4,5 stündiger Inkubation mit SB-431542 (10µM). GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet. 83
- Abbildung 24:** Mikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen in 40-facher Vergrößerung nach 72-stündiger Inkubation mit bLf (50µg/ml) und TGF-β1 (1ng/ml), sowie differenzierter THP-1 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit PMA (160nM) als Positivkontrolle. 84
- Abbildung 25:** Zellproliferationsassay zur Bestimmung der Anzahl an viablen THP-1 Zellen. 85
- Abbildung 26:** Repräsentative Abbildung des Gelatinezymogrammes von pro-MMP-9 und pro-MMP-2 nach 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (50µg/ml), TGF-β1 (1ng/ml) und PMA (160nM). 86

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Überblick einiger immunmodulatorischer Effekte von Laktoferrin.	8
Tabelle 2:	Konzentrationen und Trägersubstanzen der Inkubationssubstanzen.	35
Tabelle 3:	Pipettierschema zur Herstellung der Extraktionspuffer zur Durchführung der Zellfraktionierung.	37
Tabelle 4:	Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamidgelen für die Elektrophorese.	44
Tabelle 5:	Verwendete Primärantikörper, Molekulargewicht, Isotyp und eingesetzte Verdünnung.	49
Tabelle 6:	Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix zur cDNA Synthese.	57
Tabelle 7:	Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR.	60
Tabelle 8:	Verwendete Primer, Länge des amplifizierten PCR Produkts, primerspezifische Annealingtemperatur, Anzahl der Zyklen und Sequenzen der verwendeten sense/antisense Primer.	62

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AHMs	anti mullerian hormones
ALK	activine receptor-like kinases
AP-1	activating protein-1
Apo-E	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
ATF2	activating transcription factor 2
bHLH	basic helix-loop-helix
bHLH-LZ	basic helix-loop-helix-leucine-zipper
bLF	bovines Laktoferrin
BMPs	bone morphogenic proteins
BSA	bovines Serum Albumin
bZIP	basic leucine zipper
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CEB	cytosol extraction buffer
CKIs	cyclin-dependent kinase inhibitors
Co-Smad	common-partner Smad
Dab1	disabled1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMMPRIN	extracellular MMP inducer
EMT	epithelial to mesenchymal transdifferentiation
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 und 2
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GDFs	growth and differentiation factors
HLA II	human leucocyte antigen class II
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ID1/2/3	inhibitor of differentiation/DNA binding 1, 2 und 3
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
I-Smad	inhibitory-Smad
JIP1/2	JNK-interacting protein 1 und 2
JNK	c-Jun-amino-terminal-kinase
kDa	kiloDalton
KV	Kristallviolett
LAP	latency-associated protein
LDL	low density lipoprotein
LLC	large latent complex
LPS	Lipopolysaccharide
LRP-1	low-density lipoprotein associated receptor-related protein-1
LTBP	latent TGF- β binding protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAP 2/3	MAP kinase activated protein kinase 2 und 3
MEB	membrane extraction buffer
MEKK1	MAP/ERK kinase kinase
MH	mad homology
MLCK	myosin light chain kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	membrane-type MMP
Mnks	MAP kinase-interacting kinases
NEB	nuclear extraction buffer
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMA	Phorbol12-Myristat13-Acetat
RAP	receptor-associated protein
RCL	reactive center loop
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rsk	ribosomale Proteinkinasen
R-Smad	receptor-regulated Smad
RT	reverse Transkriptase
SAPK	stress activated protein kinase
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
Shc	SH2-containing collagen-related proteins
SLC	small latent complex
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
T β R	TGF- β Rezeptor
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	transforming growth factor-beta 1
TGIF	TG-interacting factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
u-PAR	urokinase-type plasminogen activator receptor

1 EINLEITUNG

Laktotferrin, ein Mitglied der Familie der Transferrine, ist in exokrinen Sekreten, im Plasma und sekundären Granula neutrophiler Granulozyten enthalten. Das Glykoprotein wird hinsichtlich seiner zahlreichen biologischen Eigenschaften, die nicht nur auf der eisenbindenden Fähigkeit sondern auch auf der proteolytischen Aktivität sowie auf der Interaktion mit anderen Molekülen beruhen, als multifunktionelles Protein angesehen. So ist Laktotferrin in vielseitige physiologische Prozesse wie der Eisenhomöostase, der Abwehr mikrobieller Infektionen, der Modulation der Immunantwort sowie der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung involviert. Die exakten molekularen Mechanismen, über welche Laktotferrin biologische Effekte vermittelt, sind noch weitgehend unerforscht und stehen, aufgrund des vielversprechenden therapeutischen Potentials von Laktotferrin, im Fokus vieler Forschungsbereiche. Auch das pleiotrope Zytokin transforming growth factor-beta 1 ist in die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse involviert. Der Wachstumsfaktor ist wesentlich an der Kontrolle zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Apoptose beteiligt. TGF- β 1 wird von Zellen des Immunsystems sezerniert und übernimmt unter anderem eine zentrale Funktion in der Regulation der Immunantwort.

In unserer Arbeitsgruppe konnten zum Teil vergleichbare Effekte von Laktotferrin und TGF- β 1 auf die Signaltransduktion und Genexpression, in unterschiedlichen Zelllinien, aufgezeigt werden. Die hier präsentierte Arbeit schließt an Untersuchungen früherer Arbeiten mit THP-1 Monozyten an. Bei diesen konnte die Aktivierung des Smad und MAPKinase Pathways, sowie die Stimulierung der plasminogen activator inhibitor-1 Expression in Antwort auf Laktotferrin nachgewiesen werden. Um die Relevanz der Aktivierung dieser Signalwege zu untersuchen, wurden, neben der Stimulierung monozytärer THP-1 Zellen mit Laktotferrin und TGF- β 1, spezifische Inhibitoren der oben genannten Signalwege eingesetzt und anschließend Western Blot und PCR Analysen durchgeführt. Da in vorangegangenen Arbeiten auch zytokinartige Eigenschaften von Laktotferrin festgestellt werden konnten, wurde in weiterer

Folger der Einfluss sowohl von Laktoferrin als auch von TGF- β 1 auf das Wachstum der humanen leukämischen Zellen untersucht.

2 LITERATURÜBERBLICK

2.1 Laktoferrin

Laktotferrin zählt aufgrund seiner kristallinen Struktur und Aminosäuresequenz zur Familie der Transferrine [METZ-BOUTIGUE et al., 1984]. Das 80kDa Glykoprotein wurde erstmals aus humaner und boviner Milch isoliert, wo es hauptsächlich in der eisenfreien apo-Form vorliegt [JOHANSON, 1960; BAKER, 2005].

2.1.1 Struktur

Laktotferrin besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die einen N- und C-terminalen Lobus bildet. Die beiden globulären Loben sind wiederum in zwei Domänen (N_1 , N_2 , C_1 und C_2) unterteilt, über eine α -Helix miteinander verbunden und sie besitzen je eine Bindungsstelle für Metallionen [METZ-BOUTIGUE et al., 1984; ANDERSON et al., 1987]. Laktotferrin bindet Fe^{3+} -Ionen mit hoher Affinität und kann diese, im Gegensatz zu Transferrin, bis zu niedrigen pH-Werten speichern. An diese Bindungsstellen können auch andere Metalle wie Zink, Mangan und Kupfer, allerdings mit geringerer Affinität, gebunden werden [MAZURIER and SPIK, 1980; BAKER, 1994]. Während die geschlossene holo-Form von Laktotferrin sehr stabil ist, ist die flexible, offene apo-Form anfälliger gegenüber eines proteolytischen Abbaus und thermischer Denaturierung [BAKER und BAKER, 2009].

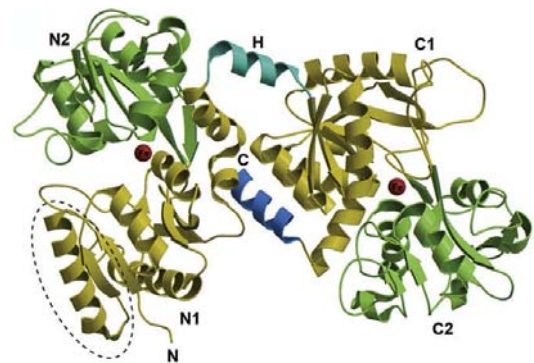


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Struktur von holo-Laktotferrin [modifiziert nach BAKER und BAKER, 2009].

2.1.2 Vorkommen

Laktotferrin wird in der apo-Form von Drüsenepithelzellen sezerniert und ist in zahlreichen exokrinen Sekreten wie Speichel-, Tränen-, Gallenflüssigkeit,

Pankreas- und Gastrointestinalensekreten enthalten. Mit 1-7g/l sind die höchsten Konzentrationen von Laktoferrin in Milch und Kolostralmilch zu finden [MASSON et al., 1966; LEVAY und VILJOEN, 1995]. Die Expression von Laktoferrin wird gewebsspezifisch durch Transkriptionsfaktoren und Hormone gesteuert [TENG et al., 2002]. Während der Granulopoese wird das Glykoprotein beim Übergang von Promyelozyten in Myelozyten synthetisiert und ist daher in sekundären Granula neutrophiler Granulozyten enthalten [MASSON et al., 1969; BENNETT und KOKOCINSKI, 1978]. Im Plasma kommt Laktoferrin in Konzentrationen von 0,4-2mg/l vor. Bei der Aktivierung von Neutrophilen, durch Sepsis oder andere entzündliche Prozesse, wird Laktoferrin freigesetzt, was zu einem Anstieg der Plasmakonzentration auf bis zu 200mg/l führen kann [MAACKS et al., 1989; MANN et al., 1994]. Laktoferrinrezeptoren sind in Leukozyten, Monozyten, Thrombozyten, Hepatozyten sowie im Intestinaltrakt vorhanden [SUZUKI und LÖNNERDAL, 2002].

2.1.3 Biologische Funktionen

Laktoferrin wird hinsichtlich seiner vielseitigen biologischen Eigenschaften als multifunktionelles Protein angesehen. So ist es unter anderem an der Abwehr mikrobieller Infektionen, der Eisenhomöostase, der Modulation der Immunantwort und der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt. Außerdem werden ihm antiinflammatorische und antikanzerogene Eigenschaften zugeschrieben [WARD und CONNEELY, 2004, WARD et al., 2005]. Weiters konnte eine Serinprotease- [HENDRIXSON et al., 2003] sowie RNase-Aktivität [FURMANSKI et al., 1989] von Laktoferrin nachgewiesen werden.

Auf der Fähigkeit von Laktoferrin Eisen mit hoher Affinität zu binden beruhen zahlreiche seiner biologischen Funktionen. So besitzt Laktoferrin beispielsweise antioxidative Eigenschaften, indem die eisenkatalysierte Bildung freier Radikale gehemmt wird [BALDWIN et al., 1984] und bakteriostatische Eigenschaften, indem die Verfügbarkeit von Eisen, welches für bakterielles Wachstum und die

Ausbildung des bakteriellen Biofilmes benötigt wird, limitiert ist [BULLEN et al., 1972; SINGH et al., 2002].

Neben der eisenbindenden Fähigkeit werden eine Reihe physiologischer Funktionen von Laktoferrin seiner proteolytischen Aktivität und der Wechselwirkung mit anderen Molekülen wie LPS (Lipopolysaccharide), Glycosaminoglykanen und zelltypspezifischen Rezeptoren zugeschrieben [WARD et al., 2005]. Der isoelektrische Punkt von Laktoferrin liegt bei pH 9, in diesem kationischen Charakter liegt seine Fähigkeit an verschiedenste Zelltypen und anionische Moleküle zu binden [BAKER und BAKER, 2009].

Das direkte Binden von Laktoferrin an die Membran gram-negativer Bakterien führt zu der Freisetzung von LPS, was mit einer erhöhten Membranpermeabilität und folglich einer Zellschädigung einhergeht. Mechanismen dieses bakteriziden Effektes sind die Fähigkeit von Laktoferrin Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu binden, welche für die Membranstabilität gram-negativer Bakterien verantwortlich sind, und die Wechselwirkung einer im N-Terminus lokalisierten kationischen Domäne mit den anionischen LPS [ELLISON et al., 1988; ELLISON et al., 1990]. Appelmelk et al. zeigten, dass Laktoferrin sättigbar an Lipid A bindet, was zu dem antiendotoxischen Effekt beiträgt [APPELMELK et al., 1994]. Indem Laktoferrin an die Oberfläche von Bakterien bindet wird auch deren Adhäsion an Epithelzellen und somit ihre intrazelluläre Invasion verhindert. Virostatische Eigenschaften von Laktoferrin beruhen ebenfalls auf der Verhinderung des Eintritts von Viren in Zielzellen. Dies geschieht entweder durch die Blockade von (Co-)Rezeptoren, oder das direkte Binden von Laktoferrin an die Virusoberfläche [VAN DER STRATE et al., 2001]. Eine im N-Terminus lokalisierte, als Laktoferricin bezeichnete Domäne wirkt, nach ihrer proteolytischen Abspaltung, gegen eine Reihe von Mikroorganismen wie gram-negativen und -positiven Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren. Der Wirkungsmechanismus beruht vermutlich auf der Fähigkeit amphiphiler Strukturen auszubilden und der Zerstörung von Zellmembranen. [BELLAMY et al., 1992; WAKABAYASHI, 2003; GIFFORD et al., 2005]. Neben direkten antimikrobiellen Eigenschaften fördert Laktoferrin auch durch Stimulation der

zellmedierten Immunantwort die Infektionsabwehr. So konnte beispielsweise eine, durch Laktoferrin induzierte, erhöhte Th1-Zellantwort gegenüber *Staphylococcus aureus* [GUILLEN et al., 2002] sowie eine erhöhte Stimulierung natürlicher Killerzellen bei Cytomegalie nachgewiesen werden [SHIMIZU et al., 1996].

Bei Entzündungsprozessen wird Laktoferrin, als Bestandteil neutrophiler Granulozyten, durch deren Aktivierung vermehrt freigesetzt [MANN et al., 1994]. Antiinflammatorische Eigenschaften von Laktoferrin beruhen unter anderem auf der Fähigkeit entzündungsfördernde Komponenten wie LPS zu binden, wodurch die Interaktion von LPS mit dem CD14-Rezeptor von Makrophagen, und somit die Synthese entzündungsfördernder Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , verhindert wird [BAVEYE et al., 1999]. Da Myeloblasten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten Laktoferrinrezeptoren exprimieren, kann Laktoferrin die Zytokin Produktion auch auf direktem Weg über rezeptorvermittelte Signalwege regulieren [CONNELLY, 2001]. In THP-1 Monozyten verhindert Laktoferrin ihre Expression auf transkriptioneller Ebene durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung [HÅVERSEN et al., 2002]. Laktoferrin unterdrückt außerdem die Bildung von Hydrogenperoxiden, die durch die Stimulierung von L-Selectin induziert wird, wodurch Entzündungsreaktionen, die bei septischem Schock auftreten, vermindert werden [BAVEYE et al., 2000]. Im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen wurden auch proinflammatorische Effekte von Laktoferrin festgestellt, indem es beispielsweise Makrophagen aktivieren kann und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α induziert [SORIMACHI et al., 1997].

Die Funktion von Laktoferrin als Wachstumsfaktor wurde anhand verschiedenster Zelllinien untersucht, wobei sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf das Zellwachstum festgestellt wurden. So wurde eine Wachstumshemmung von Brustkrebszellen in Antwort auf Laktoferrin durch die Inhibierung des Übergangs der G₁ in die S Phase, und von Kopf- und Halskrebszellen von der G₀ in die G₁ Phase des Zellzyklus, nachgewiesen.

Dieser negative Effekt auf die Zellproliferation wird durch die veränderte Expression und Aktivität von zellzyklusregulierenden Proteinen, wie den CDK-Inhibitoren p21 und p27, welche über den PI3K/Akt- und MAPKinase Pathway reguliert werden, hervorgerufen [DAMIENS et al., 1999; XIAO et al., 2004]. Eine in vivo Studie an Ratten deutet darauf hin, dass Laktoferrin die Apoptose von Krebszellen über die Aktivierung des FAS Pathways induziert [FUJITA et al., 2004]. In HeLa-Zellen wurde eine Laktoferrin induzierte Aktivierung des NF- κ B Pathways nachgewiesen, wodurch das Tumorsuppressorgen p53 und die Expression der Onkogene mdm2 und p21 aktiviert wurden [OH et al., 2004]. Der Einfluss dieses Effektes auf das Zellwachstum wurde jedoch nicht untersucht. In Chondrozyten und Osteoblasten wirkt Laktoferrin stimulierend auf die Proliferation und Differenzierung [CORNISH et al., 2004]. Der mitogene Effekt von Laktoferrin in Osteoblasten ist endozytoseunabhängig, er wird durch das Binden an LRP-1 vermittelt, wodurch der ERK1/2 MAPKinase Pathway aktiviert wird [GREY et al., 2004]. Weiters konnte gezeigt werden, dass der Smad2/3 Pathway an der laktoferrinregulierten Differenzierung von Chondrozyten beteiligt ist [TAKAYAMA und MIZUMACHI, 2010].

Der immunmodulatorische Effekt von Laktoferrin liegt unter anderem in seiner Fähigkeit die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten zu beeinflussen sowie die Reifung und Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen zu fördern. Einige immunmodulatorische Effekte von Laktoferrin sind in Tabelle 1 dargestellt.

Effekte	Referenzen
Laktoferrin ist ein Wachstumsfaktor für B- und T-Lymphozyten.	[HASHIZUME et al., 1983]
Orale Laktoferringaben an zyklaphosphamid-immunsupprimierte Mäuse führen zur Erneuerung des T-Zellpools und stellen somit die T-Zell vermittelte Immunantwort wieder her.	[ARTYM et al., 2003]
Laktoferrin induziert die Expression des CD4 Antigens über den p-56-LCK und ERK2 Pathway, wodurch die T-Zelldifferenzierung stimuliert wird.	[ZIMECKI et al., 1991; DHENNIN-DUTHILLE et al., 2000]
Orale Laktoferringaben erhöhen die Anzahl von CD4+ Zellen im lymphatischen Gewebe und intestinalen Epithelzellen.	[KUHARA et al., 2000; WANG et al., 2000]
Laktoferrin beeinflusst die Reifung und Differenzierung von T-Zellen in Th1- oder Th2-Helferzellen und somit die Zytokinbalance.	[FISCHER et al., 2006]
Laktoferrin kann die Alloantigen und Concanavalin A induzierte T-Zell Proliferation negativ beeinflussen.	[RICHIE et al., 1987; ASHORN et al., 1986]
Laktoferrin fördert die Reifung und Differenzierung von B-Lymphozyten.	[ZIMECKI et al., 1995]
Laktoferrin bindet an CpG-hältige Oligonukleotide bakterieller DNA, wodurch deren immunstimulierender Effekt auf B-Lymphozyten inhibiert wird.	[BRITIGAN et al., 2001]
Laktoferrin beeinflusst die spezifische Abwehr indem es die Reifung, Aktivierung und Migration von antigenpräsentierenden Zellen fördert.	[PUDDU et al., 2009]
Laktoferrin ist ein Reifungsfaktor dendritischer Zellen.	[SPADARO et al., 2008]

Tabelle 1: Überblick einiger immunmodulatorischer Effekte von Laktoferrin.

2.1.4 Laktoferrinrezeptoren

Viele der umfangreichen physiologischen Funktionen von Laktoferrin erfolgen rezeptorvermittelt. In Immunzellen haben Proteoglykane, Nukleolin und LRPs (low-density lipoprotein receptor-related proteins) eine zentrale Rolle in der Signalvermittlung, Endozytose und Translokation von Laktoferrin in den Zellkern [LEGRAND et al., 2006].

Proteoglykane, die an Zelloberflächen und in der Extrazellulärmatrix (EZM) lokalisiert sind, können biologisch aktive Moleküle binden, um diese in weiterer Folge an spezifische Rezeptoren zu präsentieren oder deren Aktivität zu modulieren [MANN et al., 1994]. Laktoferrin bindet, wenn auch mit geringer Affinität, an die sulfatierten Ketten von Proteoglykanen, welche die wichtigsten Bindungsstellen von Laktoferrin an der Zelloberfläche darstellen. Diesem Mechanismus liegt die hohe Bindungsdichte von Laktoferrin an der Oberfläche von Zellen zugrunde [LEGRAND et al., 1997; DAMIENS et al., 1998]. Neben weiteren Funktionen wird vermutet, dass Laktoferrin durch das Binden an Proteoglykane an spezifische Rezeptoren weitergeleitet wird, wie es auch bei anderen Wachstumsfaktoren der Fall ist [LEGRAND et al., 2006]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Heparansulfat-Proteoglykane notwendig sind um die nukleolinvermittelte Endozytose von Laktoferrin zu gewährleisten [LEGRAND et al., 2004].

Nukleolin ist ein nukleoläres Protein das hauptsächlich im Zellkern wachsender eukaryotischer Zellen vorkommt, wo es an der Regulation von Zellproliferation, Zytokinese, Replikation und Embryogenese beteiligt ist. Außerdem besitzt es ATPase, DNA- und RNA-Helikase Aktivität. In phosphorylierter Form kommt das 105kDa große Protein an der Zelloberfläche vor, wo es Rezeptorfunktion aufweist und für die meisten Liganden als shuttling Protein zwischen Zytoplasma und Nukleus fungiert [SRIVASTAVA und POLLARD, 1999; HOVANESSIAN et al., 2000]. Liganden sind unter anderen Laktoferrin, Lipoproteine, Laminin sowie L-Selektin und Viren wie HIV oder HPIV-3 [HIRANO et al., 2005]. Da Nukleolin in großen Mengen im Gehirn und

differenzierenden Nervenzellen vorkommt, ist es vermutlich nicht nur an Proliferation, sondern auch an Differenzierung und Aufrechterhaltung von Nervengewebe beteiligt [KIBBEY et al., 1995].

Während das Binden von Laktoferrin an Nukleolin zur Endozytose und Weiterleitung beider Moleküle in den Zellkern führt, führt die Interaktion von Laktoferrin mit LRP zur Aktivierung von Signalwegen und/oder Endozytose von Laktoferrin [LEGRAND et al., 2004; LEGRAND et al., 2006].

LRP-1 (low-density lipoprotein associated receptor-related protein-1) ist ein ubiquitärer, endozytotischer Rezeptor, welcher der LDL-Rezeptorfamilie angehört [HERZ and STRICKLAND, 2001]. Im endoplasmatischen Retikulum wird eine 600kDa große Vorstufe von LRP-1 synthetisiert, die im Golgi-Apparat durch eine Furin-like Protease in eine 515 kDa große (α -Kette) und 85kDa große (β -Kette) Untereinheit geteilt wird. Während die α -Kette zur Gänze extrazellulär lokalisiert ist, enthält die β -Kette eine extrazelluläre, transmembrane und zytoplasmatische Domäne [HERZ et al., 1990; VAN DER GEER, 2002]. Die α -Kette enthält mehrere Bindungsstellen, an welche Liganden unterschiedlicher Struktur und Funktion mit hoher Affinität gebunden und endozytiert werden. Diese Ligandenbindungseinheiten werden in Cluster I bis IV eingeteilt. Liganden wie Laktoferrin, PAI-1, tPA, uPA und MMP-9 binden sowohl an Cluster II als auch an Cluster IV. Im Bereich von Cluster III sind RAP (receptor-associated protein) und apo-E bislang als einzige Liganden identifiziert worden [NEELS et al., 1999; HERZ und STRICKLAND, 2001]. Darüber hinaus enthält die intrazelluläre Domäne zwei Adapterproteinbindungsstellen (NpxY-Motive), an die zytoplasmatische Proteine wie Dab1, JIP1/2 oder Shc binden. Da diese

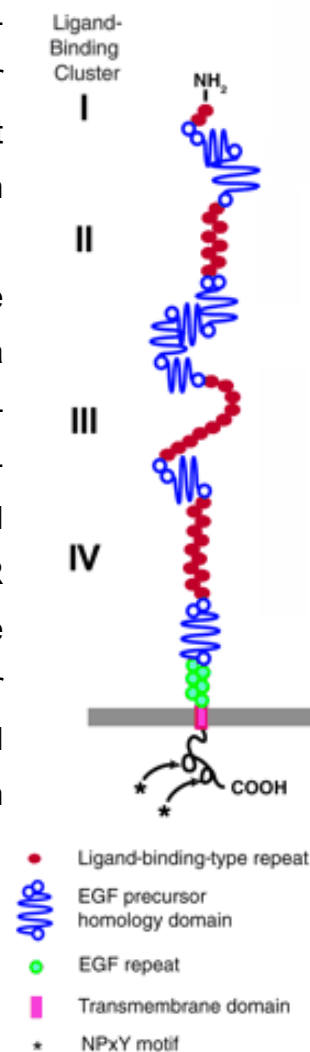


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Struktur von LRP-1 [modifiziert nach HERZ und STRICKLAND, 2001].

Proteine Regulatoren von Signaltransduktionswegen wie beispielsweise dem MAPKinase Pathway sind, ist LRP-1, neben seiner Funktion als Scavengerrezeptor, auch in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert. Die Bindungskapazität von LRP-1 für diverse Liganden bedingt seine Beteiligung an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen. So ist LRP-1 an der Homöostase von Proteasen und -inhibitoren, dem Lipidstoffwechsel, der Aktivierung lysosomaler Enzyme und dem Eintritt von Toxinen und Viren in Zielzellen involviert [HERZ und STRICKLAND, 2001].

LRP-1 ist unter anderem auch an der Regulation der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, und somit an der Pathogenese von Atherosklerose, beteiligt. Über LRP-1, den TGF- β und PDGF-BB Pathway kann ein Schutz von atherosklerotischen Läsionen vermittelt werden [BOUCHER und HERZ, 2011]. In Fibroblasten vermittelt LRP-1 die kontraktile und migratorische Aktivität von Laktoferrin, indem die MAPKinasen ERK1/2 und in weiterer Folge die myosin light chain kinase (MLCK) aktiviert werden [TAKAYAMA et al., 2003]. Die Fähigkeit von Laktoferrin das Wachstum von Osteoblasten zu induzieren wird ebenfalls über LRP-1, als mitogener Rezeptor, und die Signalisierung über den ERK1/2 Pathway vermittelt [GREY et al., 2004]. Darüber hinaus kann die Differenzierung von Makrophagen von LRP-1, über den ERK1/2 Pathway, vermittelt werden [BONACCI et al., 2007]. LRP-1 wird während der Differenzierung von THP-1 Monozyten zunehmend exprimiert und gilt daher als Differenzierungsmarker für Makrophagen [WATANABE et al., 1994].

LRP-1 kann indirekt oder direkt mit Matrix Metalloproteinasen wie MMP-2, MMP-9 oder MMP-13 interagieren, was zu einer Abnahme der proteolytischen Aktivität der MMPs führt. Somit ist LRP-1 am Umbau der EZM sowie der Zellmigration und -invasion beteiligt [BARMINA et al., 1999; HAHN-DANTONA et al., 2001; YANG et al., 2001; EMONARD et al., 2004].

2.1.4.1 MMPs - Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen bilden eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die in der Lage sind Komponenten der EZM abzubauen und somit an der Zellmigration und -invasion beteiligt sind. Darüber hinaus interagieren MMPs mit zahlreichen Nichtmatrixproteinen wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren und Serinproteaseinhibitoren, wodurch sie einen Einfluss auf diverse physiologische und pathologische Prozesse wie Embryogenese, Wundheilung, Gewebsmorphogenese, inflammatorische Prozesse und Tumorerkrankungen haben [MASSOVA et al., 1998; BUTLER und OVERALL, 2009]. Je nach Substratspezifität und Struktur werden MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Matrilysine, Stromelysine, MT-MMPs (membrane-type MMPs) sowie nicht klassifizierbare MMPs eingeteilt [PASTERNAK and ASPENBERG, 2009].

Alle MMPs verfügen über ein N-terminales Propeptid und eine katalytische Domäne, die eine Zinkbindungsstelle enthält. Zusätzlich sind bei MMP-2 und MMP-9 drei Fibronectin Typ II Domänen in die katalytische Domäne integriert. Das Cystein innerhalb der Propeptiddomäne bindet das Zink (cysteine switch) um die Latenz der pro-MMPs aufrecht zu erhalten. Die Sequenzhomologie mit MMP-1, das Cystein switch-Motiv sowie die Zinkbindungsstelle sind die Charakteristika der Familie der MMPs. Mit Ausnahme der Matrilysine besitzen MMPs zusätzlich eine C-terminale Hämopeksin-like Domäne, welche für Kollagenasen zur Aufspaltung der Triple Helices von interstitiellem Kollagen benötigt wird, und die an der Substratbindung sowie der Interaktion mit TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) beteiligt ist [NAGASE and WOESSNER, 1999; MASSOVA et al., 1998; VISSE and NAGASE, 2003].

Da die Zusammensetzung der EZM von der Balance zwischen Neubildung und Degradation abhängt, sind die MMPs wesentlich an der Aufrechterhaltung der Homöostase der EZM beteiligt. Die Regulation der MMPs erfolgt sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch über die Aktivierung der Vorstufen. [PASTERNAK und ASPENBERG, 2009; HIDALGO and ECKHARDT, 2001].

Während die meisten MMPs als Zymogene (pro-MMPs) sezerniert werden, können einige auch innerhalb von Zellen gespeichert oder an Zellmembranen gebunden vorliegen. Die proteolytische Aktivierung der pro-MMPs erfolgt im Extrazellularraum durch Plasmin, bereits aktivierte oder MT-MMPs [VISSE und NAGASE, 2003; HIDALGO und ECKHARDT, 2001]. Die enzymatische Aktivität von MMPs kann einerseits durch unspezifische Proteaseinhibitoren wie α 2-Makroglobulin und α 1-Antiprotease, andererseits durch die spezifischen TIMPs reguliert werden. Die Expression der TIMPs wird unter anderem durch TGF- β 1 induziert. Die Regulation der MMPs über TIMPs gilt als kritischer Kontrollpunkt, sie können sowohl die proteolytische Aktivität von MMPs als auch ihre katalytische Aktivierung unterbinden [OVERALL et al., 1991; HIDALGO und ECKHARDT, 2001].

Die Expression der MMPs erfolgt meist AP-1 (activating protein-1) vermittelt, ihre Synthese wird durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli, wie Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen, Wachstumsfaktoren (u.a. TGF- β 1), Zytokine (u.a. TNF- α) sowie EMMPRIN (extracellular MMP inducer) induziert [HIDALGO und ECKHARDT, 2001; GABISON et al., 2005]. In Fibroblasten wird die Expression von MMP-1 über die MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK reguliert [WESTERMARCK et al., 1998]. In Mäusefibroblasten und T-Lymphozyten induziert Laktoferrin die Expression von MMP-1 über die stressaktivierten MAPKinasen p38 und JNK, AP-1 abhängig [OH et al., 2001]. Die Expression von MMP-2 und MMP-9 wird in Brustkrebszellen durch TGF- β smadabhängig induziert [WIERCINSKA et al., 2010].

2.2 TGF- β 1 – transforming growth factor-beta1

Transforming growth factors-beta (TGF- β) bilden wie die bone morphogenic proteins (BMPs), growth and differentiation factors (GDFs) und Activine eine der Hauptgruppen der TGF- β Superfamilie, zu der noch weitere Wachstumsfaktoren wie Inhibin α und die anti mullerian hormones (AHMs) zählen. Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie haben sowohl unterschiedliche als auch komplementäre Aufgaben; einige werden nur in wenigen Zelltypen, oder auch nur für eine gewisse Zeit, exprimiert [MASSAGUÉ, 1998; MASSAGUÉ et al., 2000].

Zur TGF- β Subfamilie zählen pleiotrope Zytokine, von denen, im Organismus von Säugern, die drei Isoformen TGF- β 1, - β 2 und - β 3 bekannt sind [PELTON et al., 1991]. TGF- β 1 ist der strukturelle Prototyp der TGF- β Superfamilie und wurde erstmals aus humanen Blutplättchen isoliert, welche die reichste TGF- β 1 Quelle darstellen [ASSOIAN et al., 1983].

2.2.1 Struktur, Synthese, Aktivierung

TGF- β 1 ist ein homodimeres Protein, dessen beide, je aus 112 Aminosäuren bestehenden, identen Ketten über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [DERYNCK et al., 1985; DERYNCK et al., 1988]. TGF- β 1 wird, wie alle anderen Mitglieder der TGF- β Superfamilie, als Propeptid synthetisiert, welches aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Proregion und einer C-terminalen, bioaktiven Domäne besteht [MASSAGUÉ, 1990]. Nach erfolgter Abspaltung der Signalsequenz und N-terminaler Glykosylierung der pro-TGF- β -Vorstufe, erfolgt die Translokation in den Golgi-Apparat. Dort wird das pro-TGF- β -Monomer durch die Endopeptidase Furin proteolytisch gespalten und dimerisiert in weiterer Folge zu einem 25kDa großen Protein [DUBOIS et al., 1995]. TGF- β wird in latenter Form sezerniert, indem es nicht kovalent an das Glykoprotein LAP (latency-associated protein) gebunden ist und den sogenannten small latent complex (SLC) bildet. Die meisten Zelltypen sezernieren TGF- β jedoch als Teil des large latent complex (LLC), indem LTBP (latent TGF- β binding proteins) kovalent an den SLC binden. Als Mitglieder der Fibrillin-like Proteine

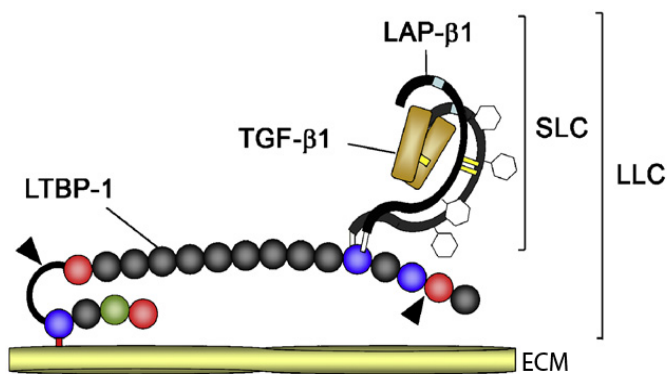


Abbildung 3: Grafische Darstellung des LLC [modifiziert nach WIPFF und HINZ, 2008].

sind LTBP-1s in der Lage an Proteine der EZM zu binden, wodurch der LLC ein Reservoir an latentem TGF-β1 in der EZM darstellt [MIYAZONO et al., 1991; WIPFF und HINZ, 2008]. In der latenten Form kann TGF-β1 nicht an Oberflächen-

rezeptoren binden und muss, um seine biologische Wirkung entfalten zu können, aktiviert werden. Die Überführung in die biologisch aktive Form erfolgt, je nach Zelltyp und physiologischem Kontext, durch verschiedene Mechanismen. Allen gleich ist die Dissoziation von TGF-β1 vom LAP [FLAUMENHAFT et al., 1993]. Die proteolytische Spaltung des LLC ist der häufigste Mechanismus der Aktivierung des latenten TGF-β. Diese kann durch BMP-1, einige MMPs, uPA, tPA, Plasmin, Thrombin, Elastasen oder Cathepsine erfolgen. Die Interaktion des LLC mit Integrinen, Thrombospondin 1 oder Glykosidasen führt zu Konformationsänderungen, wodurch TGF-β1 ebenfalls aus dem LLC entlassen und aktiviert wird. In Thrombozyten wird TGF-β1 durch eine Furin-like Proprotein Konvertase aktiviert [WIPFF und HINZ, 2008]. In vitro kann die Aktivierung von TGF-β durch Senkung des pH-Wertes, Hitzeeinwirkung oder enzymatische Proteolyse erfolgen [TAYLOR, 2009].

Liegt TGF-β1 in der aktiven Form vor, kann es seine biologische Aktivität entfalten indem es an spezifische Rezeptoren bindet, wodurch die Signaltransduktion eingeleitet wird.

2.2.2 TGF-β/Smad Pathway

TGF-β1 initiiert die Signaltransduktion, indem es, wie andere Mitglieder der TGF-β Superfamilie, an der Zelloberfläche an Typ I und Typ II Rezeptoren bindet. Dadurch werden Smad-Proteine aktiviert und die intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst [ROSS und HILL, 2008].

TGF- β Rezeptoren gehören den Serin/Threonin-Kinasen an und werden aufgrund ihres Molekulargewichtes, struktureller und funktioneller Eigenschaften in Typ I, II und III Rezeptoren eingeteilt. Typ I Rezeptoren mit TGF- β 1 als Ligand sind der T β R-I (ALK5) und ALK1 (activine receptor-like kinases), Typ II Rezeptor ist der T β R-II [MASSAGUÉ et al., 2000; CHEIFETZ et al., 1988; ATTISANO et al., 1993]. Typ III Rezeptoren sind das homodimere Glykoprotein Endoglin (CD105) und das membranverankerte Proteoglykan T β R-III/Betaglycan. Als Co-Rezeptoren haben Typ III Rezeptoren eine regulatorische Funktion, indem sie den Zugang von TGF- β zu den signalauslösenden Rezeptoren vermitteln, ohne selbst Signale auszulösen [MASSAGUÉ, 1998].

TGF- β 1 bindet an der Zelloberfläche an den T β R-II Rezeptor, wodurch der Typ I Rezeptor aktiviert wird und die transmembranen Rezeptoren einen heterotetrameren Komplex, der aus je zwei Typ I und Typ II Rezeptoren besteht, bilden, und der für die Signalweiterleitung unerlässlich ist [FRANZÉN et al., 1993; OKADOME et al., 1994; VIVIEN et al., 1995]. Die Phosphorylierung der GS-Domäne des Typ I Rezeptors durch den T β R-II geht mit einer Konformationsänderung einher, dadurch wird diese Region, die im inaktiven Zustand mit dem Repressorprotein FKBP12 besetzt ist, zu einer Bindungsstelle für intrazelluläre Signalproteine, die Smads [WRANA et al., 1994; HUSE et al., 2001].

Smad-Proteine werden in die drei Subfamilien rezeptorregulierte Smads (R-Smad), common-Partner Smads (Co-Smad) und inhibitorische Smads (I-Smad) eingeteilt. R-Smad2 und 3 sind Substrate des TGF- β und Nodal/Activin Pathways, R-Smad1, 5 und 8 des BMP und GDF Pathways. In Endothelzellen werden über den gewebspezifischen ALK1 Rezeptor, durch TGF- β Ligandenstimulierung, auch Smad1 und 5 phosphoryliert [MASSAGUÉ, 1998; GOUMANS et al., 2002]. Sowohl R-Smads als auch Co-Smad4 besitzen konservierte mad homology (MH) Regionen, die N-terminale MH1- und die C-terminale MH2-Domäne. MH-Domänen bilden globuläre Strukturen und sind über eine variable, prolinreiche Linkerregion verbunden. Diese beinhaltet eine

Reihe von Phosphorylierungsstellen, durch die eine spezifischer Crosstalk mit anderen Signalproteinen wie z.B. den MAPKs (mitogen-activated protein kinases) oder CDKs (cyclin-dependent kinases) ermöglicht wird. Bis auf Smad2, dessen MH1-Domäne keine Bindungsaktivität für DNA besitzt, binden sowohl R-Smads als auch Co-Smad4 über die MH1-Domäne an DNA. Die MH2-Domäne gilt als Effektorregion, sie vermittelt die Bindung an den Typ I Rezeptor, die Ausbildung von Smad-Smad Komplexen sowie die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren und Co-Repressoren [SHI and MASSAGUÉ, 2003; MASSAGUÉ und GOMIS, 2006; SCHMIERER und HILL, 2007].

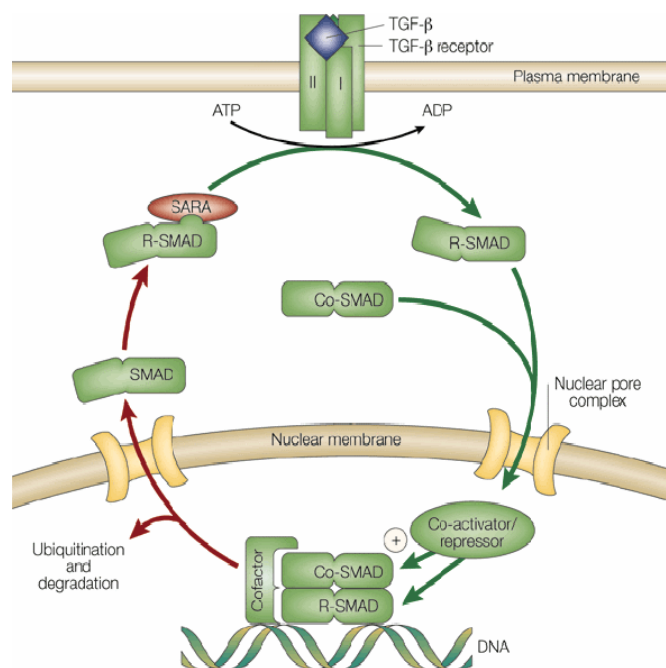


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Smad Pathway [MASSAGUÉ, 2000].

Die Interaktion zwischen dem Typ I Rezeptor und R-Smads wird durch das membrangebundene Smad anchor for receptor activation Protein (SARA) und das Adaptermolekül Disabled-2 (Dab2) beeinflusst [ROSS und HILL, 2008]. SARA vermittelt die subzelluläre Verteilung von R-Smads und bindet sie spezifisch in ihrer unphosphorylierten Form. Dieser Komplex tritt mit dem aktivierten T β R-I in Interaktion, wodurch R-Smads phosphoryliert werden und von SARA dissoziieren. Durch die Aktivierung von R-Smads wird ihre Affinität

gegenüber Co-Smad4 erhöht, mit dem sie heteromere Komplexe bilden und als solche in den Zellkern translozieren, wo sie unter Mitwirkung von Co-Faktoren, Co-Aktivatoren und Co-Repressoren die Transkription spezifischer Zielgene regulieren [WRANA und ATTISANO, 2000; TSUKAZAKI et al., 1998; FENG und DERYNCK, 2005]. Da die Affinität und Spezifität von Smad-Proteinen zur DNA gering ist, und Smad2 aufgrund eines zusätzlichen Exons in der MH1-Domäne nicht direkt an DNA binden kann, synergisieren sie mit anderen DNA-Bindungsfaktoren. Diese gehören unterschiedlichen Familien wie z. B. der forkhead-, basic-helix-loop-helix- (bHLH) oder basic leucine zipper (bZIP) Familie an. Die Expression dieser Co-Faktoren ist zelltypabhängig und bildet somit die Basis für die Zellspezifität der Genantworten auf TGF- β [DENNLER et al., 1999; WRANA und ATTISANO, 2000; MASSAGUE, 2000; FENG und DERYNCK, 2005]. Im Zellkern erfolgt die Dephosphorylierung der R-Smads und damit einhergehend die Dissoziation des R-Smad-Smad4 Komplexes. Die inaktiven Smads treten über Kernporen zurück ins Zytoplasma, wo sie, an SARA gebunden, gespeichert werden. Zusätzlich kann Smad2 im Zellkern einer Ubiquitinierung und proteasomabhängigen Degradation unterliegen [LO and MASSAGUE, 1999; SHI und MASSAGUÉ, 2003].

Die inhibitorischen Smad-Proteine, Smad6 und Smad7, können den TGF- β Pathway negativ regulieren. Smad7 inhibiert sowohl die TGF- β /Activin als auch die BMP induzierte, Smad6 hingegen bevorzugt die BMP induzierte Signaltransduktion [MIYAZONO, 2000]. Die Hemmung kann durch die kompetitive Bindung an den aktivierten Typ I Rezeptor oder durch seine Degradation erfolgen. Letztere wird durch Interaktion von Smad7 mit den Ubiquitin Ligasen Smurf1 und Smurf2 hervorgerufen. Ein weiterer Mechanismus ist die Verhinderung der smadabhängigen Promoteraktivierung, indem Smad7 an DNA bindet [HAYASHI et al., 1997; KAVSAK et al., 2000; EBISAWA et al., 2001; ZHANG et al., 2007].

2.2.2.1 SB-431542

SB-431542 wurde als Inhibitor von ALK5 entwickelt, indem er kompetitiv an die ATP-Bindungsdomäne bindet [INMAN et al., 2002a]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Inhibitor auch ALK4 und 7 blockieren kann, da die Bindungsstellen dieser Kinasen in der ATP relevanten Domäne eine hohe Ähnlichkeit aufweisen [INMAN et al., 2002a]. Als Liganden von ALK4, 5 und 7, wird die durch TGF- β , Activin und Nodal induzierte Aktivierung von Signalkaskaden gehemmt [INMAN et al., 2002a; REISSMANN et al., 2001]. So hemmt SB-431542 die TGF- β induzierte Phosphorylierung von Smad2/3 und verhindert deren Translokation in den Zellkern [INMAN et al., 2002b]. TGF- β aktiviert neben dem Smad Pathway weitere Signalwege wie die MAPKinasen p38, ERK oder JNK [DERYNCK and ZHANG, 2003]. Inman et al. zeigten, dass SB-431542, bis auf eine schwache Inhibierung von p38 α , keine hemmenden Effekte auf die Aktivierung dieser Signalwege ausübt [INMAN et al., 2002a].

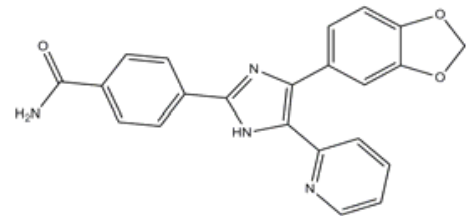


Abbildung 5: Strukturformel von SB-431542 [Datasheet SB-431542, BIOVISION, 2009].

2.2.3 MAPK Pathway (mitogen-activated protein kinase pathway)

Neben dem Smad Pathway können TGF- β 1 und Laktoferrin auch die Aktivierung des MAPK Pathway induzieren. Die Aktivierung von ERK1/2, p38 und JNK in Antwort auf TGF- β ist zelltypabhängig und kann smadabhängig oder smadunabhängig erfolgen [DERYNCK und ZHANG, 2003; MASSAGUÉ und GOMIS, 2006; TAKAYAMA et al., 2003].

MAPKs zählen zu den Serin/Threonin-Kinasen und sind an der Regulation einer Reihe zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, -differenzierung, -teilung und Apoptose beteiligt. Die Extracellular signal-regulated kinases 1 und 2 (ERK 1/2), p38 (- α , - β , - γ , - δ) und c-Jun-amino-terminal-kinase (JNK) stellen die wichtigsten Subfamilien der MAPKs dar [SCHAEFFER and WEBER, 1999; SCHÄFER and WILLIAMS, 2000; JOHNSON and LAPADAT, 2002]. Unterschiedliche Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und

zelluläre Stressoren können die Aktivierung des MAPK Signaltransduktionsnetzes induzieren [KIM und CHOI, 2010]. Die Signalweiterleitung bei den einzelnen MAPK Signalwegen wird durch sequentielle Aktivierung einer dreistufigen Signalkaskade vermittelt (Abbildung 6). Durch die duale Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin, innerhalb eines konservierten Thr-X-Tyr Motivs, wird die Aktivität der MAPKs durch MAPKKs (MAPK kinases) reguliert. MAPKKs haben eine hohe Selektivität für bestimmte MAPKs und sind wiederum Substrate von MAPKKKs (MAPK kinase kinases) [KYRIAKIS and AVRUCH, 2001; JOHNSON und LAPADAT, 2002].

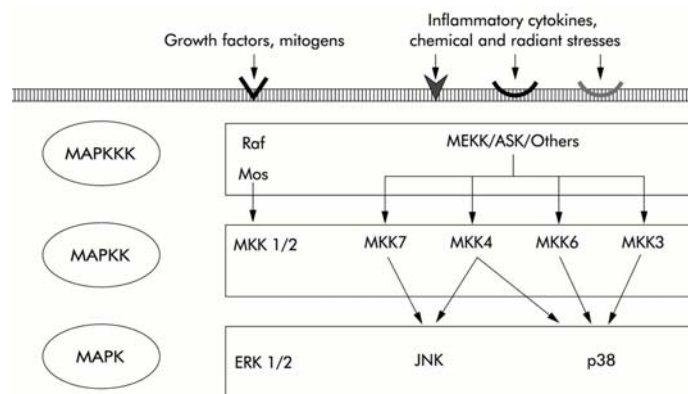


Abbildung 6: Schematische Darstellung des MAPK Pathway [modifiziert nach HOMMES et al., 2003].

Aktivierte MAPKs werden in den Zellkern transloziert, wo sie die Genexpression direkt, durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, oder indirekt, durch die Aktivierung weiterer downstream Effektoren, regulieren können. Solche downstream Effektoren sind ribosomale Proteinkinasen (Rsks), MAP kinase-interacting kinases (Mnks) oder MAP kinase activated protein kinase 2 und 3 (MAPKAP2/3 kinase) [SCHAEFFER und WEBER, 1999; JOHNSON und LAPADAT, 2002; PEARSON et al., 2001].

Die physiologische Antwort eines bestimmten MAPK Pathways ist meist zelltypspezifisch. Generell sind ERK1/2 vor allem an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung, die stressaktivierten Proteinkinasen (SAPKs) p38 und JNK an der Apoptose beteiligt [SCHAEFFER und WEBER, 1999]. Während die Raf-MEK1/2-ERK1/2 Kaskade vor allem durch mitogene

Faktoren und Protoonkogene aktiviert wird, werden p38 und JNK hauptsächlich in Antwort auf Stressreize wie genotoxischen, osmotischen oder oxidativen Stress, und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β aktiviert [JOHNSON und LAPADAT, 2002; KIM und CHOI, 2010]. Eine Reihe intrazellulärer Proteine wie MEKK1 oder TAK1 (TGF- β -activated kinase 1), fungieren als upstream Aktivatoren von p38 und JNK, MAPKKs von p38 sind MKK3, 4 und 6, von JNK MKK4 und 7 [HOMMES et al., 2003].

Durch TGF- β kann, neben dem Smad Pathway, auch der MAPK Pathway aktiviert werden [JAVELAUD and MAUVIEL, 2005]. Dabei können beispielsweise TAK1 und MEKK1 über MKK3 oder MKK6 den p38, über MKK4 den JNK Pathway, in Antwort auf TGF- β , aktivieren [YAMAGUCHI et al., 1995; BROWN et al., 1999]. Auch über die Rho-Proteine Rac und Cdc42 kann die Aktivierung von p38 oder JNK durch TGF- β induziert werden [DERYNCK und ZHANG, 2003]. Die Aktivierung des Raf-MEK-ERK Pathways durch TGF- β impliziert die Signalisierung durch Ras [YUE und MULDER, 2000].

Neben der autonomen Signalweiterleitung besteht ein Crosstalk zwischen den einzelnen MAPK Signalwegen. Dieser kann zwischen vor- oder nachgeschalteten Effektoren stattfinden und in der Aktivierung oder Inhibierung einzelner MAPK Isoformen resultieren [HOMMES et al., 2003]. Darüber hinaus können MAPKs über verschiedene Mechanismen mit anderen Signalwegen wie dem Smad Pathway interagieren [JAVELAUD und MAUVIEL, 2005].

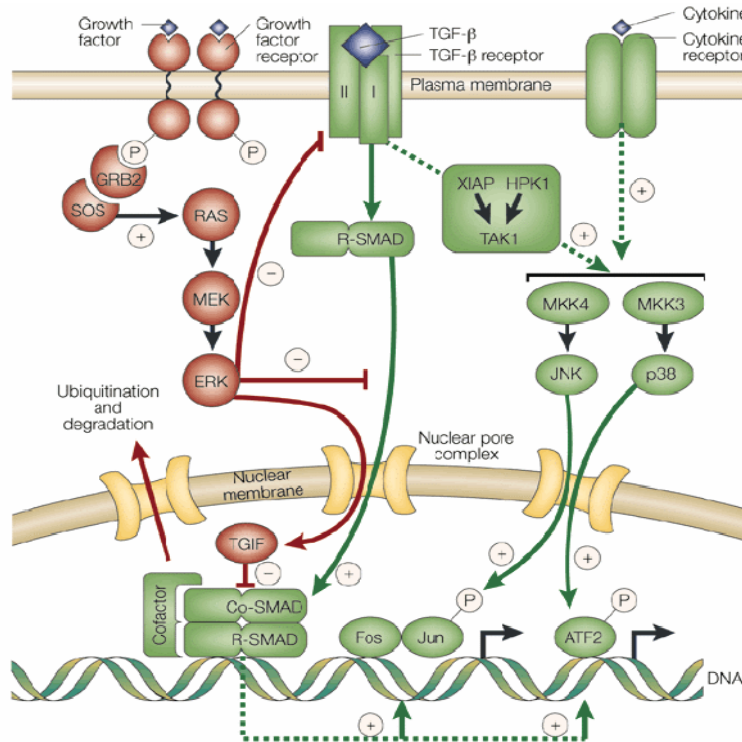


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Crosstalks zwischen dem Smad und MAPK Pathway [MASSAGUÉ, 2000].

Über den Ras-MEK-ERK Pathway können beispielsweise TGF- β -Rezeptorlevel modifiziert sowie das Vorkommen des Smad Co-Repressors TGIF (TG-interacting factor) erhöht werden [MASSAGUÉ, 2000]. Indem Smad1/2/3 in der Linkerregion, katalysiert durch ERK, phosphoryliert werden, wird ihre nukleäre Akkumulation und Transkriptionsaktivität abgeschwächt. Im Falle von Smad2/3 geht dies mit einer Senkung des antimitogenen Effektes von TGF- β einher [KRETZSCHMAR et al., 1997; KRETZSCHMAR et al., 1999]. Die transkriptionelle Aktivität von Smad2/3 kann ebenfalls über den p38 und JNK Pathway modifiziert werden, indem diese beispielsweise die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Jun und ATF2 (activating transcription factor 2) induzieren [HANAFUSA et al., 1999; SANO et al., 1999; PESSAH et al., 2002]. Zusätzlich stimuliert MEKK1 die Linkerphosphorylierung von Smad2/3, wodurch ihre Interaktion mit Co-Smad4 und Co-Aktivatoren wie CBP/P300 gefördert wird [BROWN et al., 1999; ENGEL et al., 1999].

2.2.3.1 U0126

U0126 ist ein selektiver Inhibitor des Raf-MEK-ERK Pathways, indem er nichtkompetitiv an MEK1/2 bindet. Ursprünglich wurde U0126 als AP-1 Antagonist identifiziert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch den Inhibitor nicht nur die Aktivierung von MEK1/2 gehemmt wird, sondern dass er auch in der Lage ist die aktive Form von MEK1/2 zu inhibieren. Durch die Inhibierung von MEK1/2 wird die Phosphorylierung der nachgeschalteten MAPKs ERK1/2 verhindert. Dadurch werden downstream Effekte von ERK1/2 wie beispielsweise die Phosphorylierung von Elk-1, folglich die Aktivierung von c-Fos und c-Jun und damit die transkriptionelle Aktivität des AP-1 Komplexes, unterbunden [FAVATA et al., 1998; DUNCIA et al., 1998; RAVICHANDRAN et al., 2007].

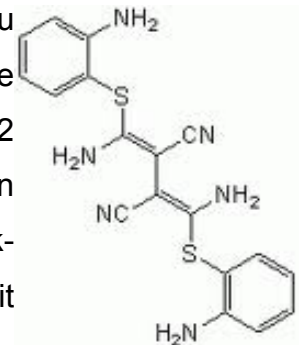


Abbildung 8: Strukturformel von U0126 [Datasheet U0126, MERCK, 2011].

2.2.3.2 SB202190

Pyridinylimidazolverbindungen wie SB202190 inhibieren die Kinaseaktivität von p38, indem sie an die ATP-Bindungsstelle binden. SB202190 ist ein selektiver Inhibitor der p38 α - und β -Isoformen und ist in der Lage sowohl an ihre inaktive als auch an ihre aktive Form zu binden. Die Aktivierung von p38 geht mit einer Konformationsänderung einher, wodurch die Affinität gegenüber ATP erhöht wird, der Inhibitor kompetitiert mit diesem um die Bindungsstelle. Da der Inhibitor an aktives und inaktives p38 bindet, ist es notwendig den Aktivitätszustand von downstream Effektoren zu ermitteln [YOUNG et al., 1997; FRANTZ et al., 1998].

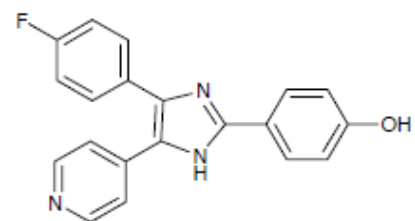


Abbildung 9: Strukturformel von SB202190 [Datasheet SB202190, SIGMA-ALDRICH, 2003].

2.2.4 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)

Ein typisches Zielgen von TGF- β ist PAI-1. Die Expression von PAI-1 wird oft als Marker für die Smad2/3-abhängige Antwortfähigkeit verschiedener Zelllinien

auf TGF- β herangezogen [CHEN et al., 2007], und kann beispielsweise in Antwort auf TGF- β 1 während der Zelladhäsion auch über den MEK-ERK Pathway induziert werden [KUTZ et al., 2001; CHANG et al., 2003].

PAI-1 ist Bestandteil des Plasminogen-Aktivator-Systems (PA-Systems), zu dem weiters die beiden Plasminogenaktivatoren u-PA (urokinase-type PA) und t-PA (tissue-type PA), der u-PA Rezeptor (u-PAR) und PAI-2 zählen [BAKER et al., 2000]. Als Schlüsselregulator des PA-Systems ist PAI-1 an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Fibrinolyse, Wundheilung, Gewebsneubildung, Tumorangiogenese, Homöostase der EZM, Zellmigration, -invasion und -adhäsion beteiligt [LIJNEN, 2005].

PAI-1 ist ein Glykoprotein das aus 379 Aminosäuren besteht, in der nicht-glykolysierten Form eine molekulare Masse von 45kDa aufweist und zur Familie der Serinproteaseinhibitoren (Serpine) gehört [GINSBURG et al., 1986]. Wie bei allen Serpinen weist die Tertiärstruktur von PAI-1 drei β -Faltblätter, neun α -Helices und ein exponiertes reactive center loop (RCL) auf. Letzteres enthält das reaktive Zentrum (P1(Arg₃₄₆)-P1'(Met₃₄₇)) des Inhibitors für die Zielserinprotease [HUBER und CARRELL, 1989]. Thrombozyten sind die einzigen Zellen die PAI-1 in der latenten Form speichern. Von allen anderen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten, glatten Muskelzellen und Adipozyten wird PAI-1 nach der Synthese in der aktiven Form sezerniert. [LIJNEN, 2005, KRUIHOF, 2008]. PAI-1 enthält kein Cystein, wodurch keine stabilisierenden Disulfidbindungen im Molekül ausgebildet werden können, was mit der Instabilität der aktiven Form von PAI-1 in Verbindung gebracht wird. Aufgrund dieser Instabilität geht aktives PAI-1 spontan in eine latente Form über, indem das RCL in das β -Faltblatt A eingebracht wird, und verliert seine inhibitorische Aktivität [LEVIN and SANTELL, 1987; HEKMAN and LOSKUTOFF, 1988; LINDAHL et al., 1989; HUBER et al., 2001]. Latentes PAI-1 kann durch Denaturantien, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol in die aktive Form überführt werden [HEKMAN and LOSKUTOFF, 1985; LAMBERS et al., 1987]. Im Plasma liegt

aktives PAI-1 mit hoher Affinität an Vitronektin gebunden vor, wodurch seine Stabilität erhöht wird [WIMAN et al., 1988; DECLERCK et al., 1988].

PAI-1 gilt als wichtigster physiologischer PA Inhibitor. Die katalytische Aktivität von u-PA und t-PA wird durch die Ausbildung eines 1:1 stöchiometrischen Komplexes, bei dem P1-P1' mit dem aktiven Zentrum der PA reagiert, gehemmt [EGELUND et al., 1998]. Die Regulation der Aktivität der PA spielt unter anderem bei der Proteolyse der EZM und deren Degradation eine wesentliche Rolle [BOSMA et al., 1988]. PAI-1 vermittelt die Inhibierung der perizellulären proteolytischen Aktivität, hat daher einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität und Organisation der EZM und ist wesentlich an der Modulation von Zellmorphologie, -adhäsion und -migration beteiligt [LAIHO und KESKI-OJA, 1989; RYAN und HIGGINS, 1994].

Hinsichtlich der Zelladhäsion hat PAI-1 duale Funktionen. So kann PAI-1 beispielsweise die vitronektinbedingte Zelladhäsion fördern, indem u-PA, und somit die proteolytische Degradation von Vitronektin, inhibiert wird [CIAMBRONE und MCKEOWN-LONGO, 1990]. Antiadhäsive Effekte von PAI-1 beruhen unter anderem auf der Eigenschaft an Vitronektin zu binden, welches, neben anderen Matrixproteinen, als Adhäsionsmolekül fungiert und an das Zellen über den u-PAR oder Integrine binden können. Da die Bindungsstellen von PAI-1, dem u-PAR und Integrinen am NH₂-Terminus von Vitronektin sehr dicht beieinander liegen, wird das Anhaften von Zellen an Vitronektin durch PAI-1 kompetitiv inhibiert [DENG et al., 2001]. Indem PAI-1 an den u-PA-u-PAR-Integrin Komplex bindet und die LRP vermittelte Endozytose dieses Komplexes induziert, kann PAI-1 auch das Ablösen von Zellen bewirken [CZEKAY et al., 2003]. Auch bei der Migration aktivierter Makrophagen spielt die Interaktion von PAI-1 mit LRP eine wesentliche Rolle. So wird während inflammatorischen Prozessen die Zellablösung gefördert, indem PAI-1 das Binden, das für die Zelladhäsion verantwortlichen, Integrin-tPA Komplexes an LRP fördert, was zur Endozytose des Komplexes führt [CAO et al., 2006].

Die Synthese von PAI-1 wird durch ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen, Proteasen und Endotoxinen induziert [HUBER et al., 2001] und erfolgt auf eine zellzyklusabhängige Art, wobei die Expression während der Wachstumsaktivierung (G_0 - G_1 Transition) erhöht ist [RYAN und HIGGINS, 1993; MU et al., 1998].

TGF- β 1 ist eines der ersten Zytokine, welches mit der Regulation der PAI-1 Expression auf transkriptioneller Ebene in Verbindung gebracht wurde [LAIHO et al., 1986; THALACKER und NILSEN-HAMILTON, 1987]. Verschiedene Zelltypen haben für Wachstum und Differenzierung unterschiedliche Ansprüche auf die Zusammensetzung der EZM [ENAT et al., 1984]. Der Fähigkeit von TGF- β 1 das Wachstum verschiedener Zellen zu fördern oder zu hemmen, liegt unter anderem die Eigenschaft zugrunde, die Expression spezifischer Gene, die für Proteine codieren, welche die proteolytische Degradation von EZM-Komponenten hemmen oder fördern, zu beeinflussen [THALACKER und NILSEN-HAMILTON, 1986].

2.2.5 Biologische Funktionen von TGF- β

Die TGFs- β sind als pleiotrope Zytokine an der Kontrolle einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Proliferation, Migration, Adhäsion, Differenzierung und Apoptose beteiligt [MASSAGUÉ, 1998; SIEGEL and MASSAGUE, 2003]. Die drei unterschiedlichen Isoformen haben in vitro ähnliche Eigenschaften, zeigen in vivo aber unterschiedliche Effekte [ANNES et al., 2003]. Die Signalisierung durch TGF- β reguliert während der Embryonalentwicklung Gewebswachstum und Morphogenese, und ist in entwickeltem Gewebe maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt [SIEGEL und MASSAGUÉ, 2003; TEN DIJKE and ARTHUR, 2007]. Änderungen bzw. Störungen der TGF- β Signaltransduktion bringen Funktionsstörungen des Organismus mit sich und treten bei verschiedenen Erkrankungen wie Tumorerkrankungen, Fibrosen, Autoimmun- und Vaskulärerkrankungen auf [BLOBE et al., 2000].

Die physiologische Antwort auf TGF- β 1 ist abhängig von Zelltyp und Differenzierungsgrad sowie von Wachstumsfaktoren und Hormonen, welche auf die entsprechende Zelle einwirken [SPORN and ROBERTS, 1992].

TGF- β 1 ist wesentlich an der zellulären Wachstumskontrolle beteiligt. Das Zytokin limitiert beispielsweise das Wachstum von Epithel-, Endothel-, Karzinom- sowie hämatopoetischen Zellen und wirkt stimulierend auf das Wachstum von Mesenchymzellen [NEWMAN, 1990; BATTEGAY et al., 1990]. Die Inhibierung des Zellwachstums vermittelt TGF- β , indem das Fortschreiten des Zellzyklus in der G₁-Phase gehemmt wird. Die Blockade des Zellzyklus ist meist reversibel, kann aber auch zur terminalen Differenzierung oder dem programmierten Zelltod führen [MASSAGUÉ et al., 2000]. Zellzyklusübergänge werden durch CDKs (cyclin-dependent kinases) gesteuert, deren Aktivität wird durch Cycline positiv, durch cyclinabhängige Kinaseinhibitoren (CKI) negativ reguliert. Die Passage der G₁- in die S-Phase wird durch CDK2/4/6 kontrolliert, deren Aktivität wiederum von Cyclin D, E und A reguliert wird [WEINBERG, 1995; SHERR, 1996]. Ein Mechanismus des antiproliferativen Effektes von TGF- β ist die Induktion der Transkription der CKI p21 und p15 [HANNON und BEACH, 1994; DATTO et al., 1995; DATTO et al., 1997], deren transkriptionelle Aktivierung unter anderem smadabhängig reguliert wird [PARDALI et al., 2000; RICH et al., 1999]. An der TGF- β -vermittelten Hemmung von CDKs und der damit einhergehenden Blockade des Zellzyklus, ist ein weiterer CKI, p27, beteiligt. Während p15 als spezifischer Inhibitor von CDK4/6 fungiert, bindet p27, nach der p15 induzierten Freisetzung von CDK4/6, zusammen mit p21 an CDK2 [REYNISDÓTTIR et al., 1995].

Darüber hinaus kommt es in Antwort auf TGF- β 1 zu verminderten mRNA-Levels des Protoonkogens c-Myc [ALEXANDROW und MOSES, 1995]. c-Myc gehört zur Familie der bHLH-LZ (basic helix-loop-helix-leucine-zipper) Transkriptionsfaktoren, gilt als ubiquitärer Promotor von Zellwachstum und -differenzierung [FACCHINI und PENN, 1998] und besitzt auf transkriptioneller Ebene, je nach assoziierten Faktoren, aktivierende oder hemmende Eigenschaften [DANG, 1999]. c-Myc ist wesentlich am Fortschreiten des

Zellzyklus beteiligt, kann die terminale Zelldifferenzierung hemmen sowie die Apoptose induzieren; eine deregulierte Expression von c-Myc ist stark mit der Entstehung von Tumoren assoziiert [FACCHINI und PENN, 1998; EISENMAN, 2001]. Die verminderte Expression von c-Myc führt zur Hemmung des Übergangs von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus [ROUSSEL et al., 1991] und ist für die TGF- β -vermittelte Induktion von p15 und p21 erforderlich [WARNER et al., 1999; CLAASSEN und HANN, 2000]. Über Miz-1 (Myc-interacting zink-finger protein) kann c-Myc, wenn es in hohen Konzentrationen vorhanden ist, an p15 und p21 Promotoren binden, wodurch ihre transkriptionelle Aktivierung durch TGF- β , den Tumor-Supressor p53 oder andere Signale beeinträchtigt wird. Da in Antwort auf TGF- β 1 die Expression von c-Myc gesenkt wird, wirkt das Zytokin dieser Störung entgegen [PADUA und MASSAGUE, 2009].

Auch die Expression von ID1/2/3 (inhibitor of differentiation/DNA binding 1, 2 und 3) wird in Antwort auf TGF- β gehemmt [KANG et al., 2003]. ID-Proteine sind essentiell für die Progression des Zellzyklus und fungieren unter anderem als negative Regulatoren von bHLH Transkriptionsfaktoren, welche für die Zelldifferenzierung entscheidend sind [NORTON, 2000].

Hinsichtlich der Tumorgenese übernimmt TGF- β 1 duale Funktionen. In frühen Phasen von Neoplasien gilt das Zytokin, aufgrund seiner antiproliferativen und proapoptotischen Eigenschaften, als Tumorsupressor, fördert jedoch in fortgeschrittenen Stadien das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren [PERERA et al., 2010]. Sowohl die Fähigkeit von TGF- β 1 die Apoptose zu induzieren als auch der Mechanismus über welchen sie eingeleitet wird ist zelltypabhängig [SIEGEL und MASSAGUÉ, 2006] und unter anderem wesentlich an der Aufrechterhaltung der T- und B-Zellhomöostase beteiligt [SCHUSTER and KRIEGLSTEIN, 2002]. Der Verlust der antiproliferativen und apoptotischen Antwortfähigkeit maligner Zellen und auch die erhöhte TGF- β -Sekretion von Tumorzellen, die deren Differenzierung sowie ihre umgebende Matrix beeinflusst, begünstigt die Tumordinvasion und Metastasierung [HANAHAHAN and WEINBERG, 2000; AKHURST und BALMAIN, 1999]. Während

der Tumorprogression unterliegen Gewebe morphologischen Veränderungen, welche oft von dem Prozess der EMT (epithelial to mesenchymal transdifferentiation) begleitet werden. Die EMT trägt wesentlich zur Invasion und Metastasierung bei und kann, neben anderen extrazellulären Stimuli, durch TGF- β 1 induziert werden [OFT et al., 1998; HAN et al., 2005].

TGF- β 1 wird von allen Zellen des Immunsystems sezerniert und übernimmt eine wesentliche Rolle in der Vermittlung der Immunantwort, mit der zentralen Funktion die Immuntoleranz, durch Regulation von Proliferation, Differenzierung und des Überlebens von Lymphozyten, aufrecht zu erhalten [LETTERIO and ROBERTS, 1998; LI et al., 2006]. In Abhängigkeit der Anwesenheit anderer Zytokine und des Differenzierungsgrades, kann TGF- β auf die Proliferation von Makrophagen sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte ausüben; generell wirkt TGF- β auf Monozyten stimulierend und auf aktivierte Makrophagen inhibierend [LETTERIO und ROBERTS, 1998; ASHCROFT, 1999]. TGF- β 1 besitzt chemotaktische Eigenschaften gegenüber Monozyten und Neutrophiler, was zu deren Ansammlung bei inflammatorischen Prozessen führt [WAHL et al., 1987; REIBMAN et al., 1991]. Neben der chemotaktischen Wirkung vermittelt TGF- β 1 die Migration von Monozyten durch Stimulierung von MMPs und deren Akkumulation indem es die Expression von Integrinen und Fibronektinrezeptoren induziert, wodurch die Zelladhäsion gefördert wird [WAHL et al., 1993].

Die Fähigkeit von TGF- β die Zelladhäsion zu fördern wird durch eine erhöhte Synthese von EZM-Proteinen, einer verminderten perizellulären Proteolyse sowie durch Modifikation des Repertoires an Adhäsionsrezeptoren vermittelt. Den ursprünglichen Anstoß diese molekularen Mechanismen zu untersuchen lieferten vorangegangene Beobachtungen über den Einfluss von TGF- β auf Zellmorphologie und -differenzierung sowie der Beteiligung an der Wundheilung [MASSAGUÉ, 1990]. Die Fähigkeit von TGF- β 1 die Differenzierung von Monozyten zu induzieren wurde anhand verschiedener Zelllinien aufgezeigt [TURLEY et al., 1996].

TGF- β 1 induziert die Expression einer Reihe von Matrixproteinen wie Fibronectin, welches ein klassisches Zielgen von TGF- β 1 ist [IGNOTZ and MASSAGUÉ, 1986] und an diversen zellulären Prozessen wie der Zelladhäsion, -migration und -differenzierung beteiligt ist [HYNES and YAMADA, 1982]. Andere EZM-Proteine, deren Synthese in Antwort auf TGF- β stimuliert wird, sind unter anderem Proteoglykane, einige Kollagentypen, Vitronectin sowie Osteopontin und Osteonektin [IGNOTZ und MASSAGUÉ, 1986; BASSOLS und MASSAGUÉ, 1988; NODA et al., 1988; KOLI et al., 1991].

An der Regulation des proteolytischen Abbaus von Bestandteilen der EZM ist TGF- β einerseits durch Stimulierung von Inhibitoren von EZM abbauenden Enzymen wie PAI-1 und TIMPs, andererseits durch die verminderte Synthese von EZM abbauenden Enzymen wie Kollagenasen und PA beteiligt [LAIHO et al., 1986; EDWARDS et al., 1987].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Laminar Flow Hood Biosafe2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Mikroskop	Zeiss Axiovert135
CASY [®] Cell Counter + Analyser System Model TT	Schärfe Systeme GmbH
Wasserbad Thermo-Boy	MGW Lauda
Trockenschrank	Binder
Zellkulturflaschen	Greiner
6- und 12-Well-Platten	Greiner
Sterilfilter (0,2µM Porendurchmesser)	Sartorius
Megafuge 1.0R	Heraeus
RPMI 1640	Biochrom AG
FCS	Gibco
L-Glutamin (200mM in 0,85%NaCl Solution)	PAA;BioWhittaker [®] ,Lonza
PENICILLIN-STREPTOMYCIN (100U/ml;10.000U/ml)	PAA;BioWhittaker [®] ,Lonza
Ethanol	MERCK
humanes rekombinantes TGF-β1 (4µg/ml)	Calbiochem
HCl rauchend	MERCK
Bovine Serum Albumin (BSA)	Amresco
bovines Laktoferrin (20mg/ml)	Morinaga Milk Industry

5x PBS, pH 7,4

- NaCl Roth
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, NaOH MERCK

U0126 (5mM) Alomona Labs

SB202190 (1mM) Sigma

SB-431542 (10mM) Sigma

DMSO MERCK

Herstellung von:

5x PBS

Für 1000ml 5x PBS, pH 7,4 werden:

- 40g NaCl,
- 14,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,
- 1g KH_2PO_4 und
- 1g KCl eingewogen,
- mit Aqua dest. auf ca. 800ml aufgefüllt und auf dem Magnetrührer gelöst.
- Anschließend wird der pH-Wert mit 37%HCl eingestellt und mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

1x PBS

- 5x PBS 1:5 mit Aqua dest. verdünnen und
- steril filtrieren.

3.1.2 Arbeitsbedingungen

Um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden erfolgt das Arbeiten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter einer sterilen Laminar-Airflow, die über Nacht mittels UV-Licht desinfiziert wird. Alle verwendeten Materialien sind entweder sterile Einweg-Produkte oder werden steril filtriert oder sterilisiert.

Pipettenspitzen aus Plastik werden 30 Minuten bei 120°C autoklaviert und anschließend im Trockenschrank bei 70°C getrocknet, Glasmaterialien werden

bei 160°C, über Nacht, sterilisiert. Zusätzlich werden alle Materialien wie beispielsweise Pipettenschachteln, Flaschen, etc. vor dem Einbringen in die Werkbank mit 70% EtOH gereinigt.

3.1.3 Zelllinie

3.1.3.1 THP-1 Zelllinie

THP-1 Zellen sind humane, leukämische Monozyten, die 1980 aus dem Blut eines Jungen, der an akuter monozytärer Leukämie erkrankt ist, isoliert wurden [TSUCHIYA et al., 1980].

THP-1 Zellen besitzen die Fähigkeit, durch Behandlung mit z.B. Phorbolestern, zu differenzieren, wodurch sie morphologische und funktionelle Charakteristika von Makrophagen erlangen. Diese Eigenschaft macht die THP-1 Zelllinie zu einem geeigneten Modell um die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in vitro zu untersuchen [TSUCHIYA et al., 1982].

3.1.3.2 Monozyten-Makrophagen-Differenzierung

Die in vitro Differenzierung der monozytären THP-1 Zellen zu Makrophagen wird durch den Zusatz von PMA (Phorbol12-Myristat13-Acetat) induziert [AUWERX, 1991]. Die zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen unterscheiden sich morphologisch von den Monozyten. So sind THP-1 Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten adhärent, weisen eine geringere Anzahl an Microvilli und Vesikel auf, haben ein ausgeprägtes raues endoplasmatisches Reticulum und die Anzahl an freien Ribosomen ist erhöht. Durch die Expression von Oberflächenmarkern (IgG Fc), Lysozymaktivität und gesteigerter Phagozytoseaktivität weisen differenzierte THP-1 Zellen auch funktionelle Eigenschaften aktivierter Makrophagen auf [TSUCHIYA et al., 1982].

3.1.4 Zellkulturmedium

Zur Kultivierung der THP-1 Zellen wird das RPMI 1640 Medium (1640 Roswell Park Memorial Institute) verwendet.

Herstellung des Mediums:

Das Zellkulturmedium wird aus einem Konzentrat hergestellt. Dazu werden 104,3g RPMI 1640 und 20g NaHCO_3 unter Rühren in neun Liter Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 37% HCl auf 7,25 eingestellt und das Volumen auf zehn Liter aufgefüllt.

Das Medium wird in der Werkbank mit Hilfe einer Pumpe sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 μm ; Sartorius) und in sterile Glasflaschen abgefüllt (450ml Medium pro 500ml Glasflasche).

Das Medium wird mit 10% FCS, L-Glutamin (2mM), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (0,1mg/ml) komplementiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C, vor Gebrauch wird das Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.1.5 Kultivierung der Zellen

Die THP-1 Zellen werden als Suspensionszellen in sterilen Kulturflaschen (75cm²) mit 20-30ml Nährmedium (RPMI 1640) gezüchtet. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 5%ige CO₂-Atmosphäre). Um einen Gasaustausch zu ermöglichen werden die Kulturflaschen nicht ganz geschlossen. Das Medium wird jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt, wobei die Zelldichte auf 0,5 x 10⁶ Zellen/ml Medium eingestellt wird.

3.1.6 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der THP-1 Zellen erfolgt mit dem CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT. Dazu werden in einen, mit 10ml Casyton-Flüssigkeit gefüllten, CASY[®] Cup 50 μl Zellsuspension pipettiert, das Cup wird geschwenkt und die gemessene Zellmenge wird am CASY[®] abgelesen.

3.1.7 Aussetzen der Zellen

THP-1 Zellen werden mit einer Dichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml in 6- oder 12-Well-Platten ausgesetzt.

Um die entsprechende Zelldichte zu erreichen, wird die benötigte Menge an Zellsuspension in einem 50ml Falcon fünf Minuten bei 820xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in entsprechender Menge frischem Medium resuspendiert.

3.1.8 Inkubation

THP-1 Monozyten werden unmittelbar nach dem Aussetzen inkubiert.

Die Inkubationssubstanzen der durchgeführten Experimente sind:

Substanz	Stock- konzentration	End- konzentration	Trägersubstanz
bovines Laktoferrin	20mg/ml	50µg/ml	1xPBS
humanes recombinantes TGF-β1	4µg/ml	1ng/ml	4mM HCl + 0,1% BSA
U0126	5mM	10µM	DMSO
SB202190	1mM	2µM	DMSO
SB-431542	10mM	10µM	DMSO

Tabelle 2: Konzentrationen und Trägersubstanzen der Inkubationssubstanzen.

Die Inkubationsdauer für PCR und Western Blot Proben beträgt vier Stunden, wobei SB202190 eine Stunde, SB-431542 eine halbe Stunde vor der Inkubation mit TGF-β1 oder Laktoferrin zugesetzt werden. Die Inkubationsdauer für die Zellfraktionierung beträgt eine Stunde.

3.2 Zellfraktionierung

3.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Zentrifuge Eppendorf 5417R

FraktionPREP™ Cell Fractionation System BioVision

- Cytosol Extraction Buffer
- Membrane Extraction Buffer
- Nuclear Extraction Buffer
- Protease Inhibitor Cocktail Sigma
- DTT (1M) Bio Vision

5x PBS, pH 7,4

- NaCl Roth
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, NaOH MERCK

1x PBS

3.2.2 Durchführung

Die Zellfraktionierung erfolgt mittels FractionPREP™ Cell Fractionation System der Firma BioVision Research Products. Durch die Zellfraktionierung werden die Zellen in folgende Fraktionen aufgetrennt:

Zytosolfraktion

Membranfraktion

Kernfraktion

Zytoskelettfraktion

Um die Fraktionierung durchzuführen werden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesetzt und inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die Extraktionspuffer nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

	Buffer [μ l]	DTT [μ l]	Proteaseinhibitor [μ l]
CEB-Mix	200	0,4	0,4
MEB-A-Mix	200	0,4	0,4
NEB-Mix	100	0,2	0,2

Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung der Extraktionspuffer zur Durchführung der Zellfraktionierung.

Die Puffer werden, wie auch die Eppendorf Reaktionsgefäße, auf Eis gekühlt und die Zentrifuge wird vorgekühlt.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wird die 12-Well-Platte auf Eis gestellt um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu stoppen. Die Zellen werden aus den Wells entnommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgt der erste Zentrifugationsschritt bei 720xg und 4°C für fünf Minuten. Das Medium wird mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Zellpellet wird zwei Mal mit 2ml eiskaltem 1x PBS gewaschen und jeweils bei 720xg und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert, in 0,5ml 1x PBS resuspendiert und wieder bei 720xg und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Das Zellpellet wird nun in 200 μ l CEB-Mix, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette, suspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße alle fünf Minuten leicht angetippt werden um die Proben zu durchmischen. Nach der Inkubationszeit wird bei 720xg und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand, die zytosolische Fraktion, wird abgenommen und in ein vorgekühltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Das Zellpellet wird nun in 200 μ l MEB-A-Mix, wieder durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette, suspendiert und 10-15 Sekunden lang gevortext. Anschließend werden 11 μ l MEB-B hinzugefügt, fünf Sekunden lang gevortext, eine Minute auf Eis inkubiert und wieder fünf Sekunden lang gevortext. Dann wird fünf Minuten bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, die

Membranfraktion, wird abgenommen und in vorgekühlte Eppendorf Reaktionsgefäße überführt.

Nun wird das Zellpellet in 100µl NEB-Mix gelöst, 15 Sekunden gevortext und 40 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle zehn Minuten 15 Sekunden lang gevortext wird. Anschließend erfolgt eine 10 minütige Top Speed Zentrifugation bei 13500rpm und 4°C. Der Überstand, die Kernfraktion, wird abgenommen und in ein vorgekühltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das verbleibende Pellet ist die Zytoskelettfraktion.

Die Lagerung aller Zellfraktionen erfolgt bei -20°C.

3.3 Lysieren von Zellen

3.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

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

5x PBS, pH 7,4

- | | |
|---|-------|
| • NaCl | Roth |
| • Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , KCl, NaOH | MERCK |

1x PBS

peqGOLD TriFast™	PEQLAB
------------------	--------

Lysis Puffer, pH 7,2

- | | |
|---|-------|
| • Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan,
NaCl | Roth |
| • EDTA, HCl rauchend | MERCK |
| • 0,5% Nonidet-P | USB |

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

Herstellung von:

Lysis Puffer

Für 100ml Lysis Puffer, pH 7,2 werden:

- 121mg Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan,
- 876,6mg NaCl und
- 74,4mg EDTA, mit
- 0,5ml Nonidet-P (5%) versetzt und auf dem Magnetrührer gelöst.
- Dann wird der pH-Wert mit HCl eingestellt und mit Aqua dest. auf 100ml aufgefüllt.

3.3.2 Durchführung

Nach der Inkubation wird die Well-Platte sofort auf Eis gestellt, sodass die Stoffwechselaktivität der Zellen gestoppt wird.

Die Zellsuspension wird pro Well entnommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation, mit bereits vorgekühlter Zentrifuge, bei 720xg und 4°C für fünf Minuten. Das Medium wird mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das entstandene Zellpellet wird zwei Mal mit einem Milliliter eiskaltem 1x PBS gewaschen, wobei nach beiden Waschschritten fünf Minuten bei 720xg und 4°C zentrifugiert wird. Der 1x PBS wird mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Für Western Blot Analysen wird jedes Zellpellet mit 80µl Lysis Puffer überschichtet, gevortext und zehn Minuten inkubiert. Der Lysis Puffer wird kurz vor Gebrauch 1:100 mit dem Protease Inhibitor Cocktail vermischt. Nach abgelaufener Inkubation werden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, auf Eis aufgetaut und 15 Minuten bei 13500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, in frische Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert.

Für PCR Analysen wird das Zellpellet unter dem Abzug in einem Milliliter TriFastTM gelöst, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur RNA-Extraktion bei -20°C gelagert.

3.4 Proteinbestimmung

3.4.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Platereader 550	Bio-Rad
Belly Dancer	Stovall Lifesciences
Prism 3.02	GraphPad
96-Well-Platte	Greiner
Parafilm	Manesha
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce
• Protein Assay Reagent A & B • Albumin Standard (BSA) 2mg/ml	

3.4.2 Durchführung

BSA, mit der Konzentration von 2mg/ml, dient als Proteinstandard. Davon ausgehend wird in sechs 1:2 Verdünnungsschritten eine Standardreihe hergestellt, als letzte Verdünnungsstufe dient Aqua dest. Die Proben werden zur Proteinbestimmung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Sowohl von der Standardreihe als auch von den Proben werden, im Dreifachansatz, je 10µl in eine 96-Well-Platte aufgetragen und mit 200µl Detektionslösung vermengt. Die Detektionslösung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Dazu werden die Protein Assay Reagentien A und B im Verhältnis 1:50 vermengt. Die 96-Well-Platte wird mit Parafilm verschlossen, am Belly Dancer durchmischt und 30 Minuten im Brutschrank, bei 37°C, inkubiert. Nachdem die Platte bei Raumtemperatur und lichtgeschützt abgekühlt ist, erfolgt mittels Platereader die photometrische Messung der Extinktion bei 550nm. Zur Auswertung dient die Software Prism 3.02.

3.5 Western Blot

3.5.1 SDS Gelelektrophorese

3.5.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Power Pac 200	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
Glasplatten 0,75mm	Bio-Rad
10- & 15-Well-Kämme	Bio-Rad
Mini Protean® II Apparatur	Bio-Rad
10% SDS Solution	
• SDS ultra pure	Roth
10% APS	
• Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech
3M Tris-HCl, pH 8,45	
• Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base	Roth
• 37% HCl	MERCK
Acrylamid	Sigma
• Bis	Sigma
TEMED	GERBU
HCl rauchend	MERCK
Isopropanol	MERCK
Ethanol	MERCK

Sample Buffer

- Glycerol, Tris-HCl, 2-Mercaptoethanol,
Bromphenolblau MERCK
- SDS ultra pure Roth

5x PBS, pH 7,4

- NaCl Roth
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, NaOH MERCK

1x PBS

Tris-Glycin Puffer

- Glycin, Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan;
Tris Base, SDS ultra pure Roth

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Fermentas

Herstellung von:

10% SDS Solution

- 10g SDS ultra pure einwiegen und
- in 100ml Aqua dest. auf dem Magnetrührer lösen.
- Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

30% Acrylamid/Bis (29:1)

- 29g Acrylamid und
- 1g Bis einwiegen,
- 100ml Aqua dest. zugeben und unter dem Abzug, auf dem Magnetrührer lösen.

10% APS

- 0,1g Ammoniumpersulfat einwiegen,
- in 1ml Aqua dest. lösen,
- Aliquote von 50µl herstellen.
- Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3M Tris-HCl/pH 8,45/0,3%SDS

- 182g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base einwiegen,
- in 400ml Aqua dest. auf dem Magnetrührer lösen,
- mit 37% HCl den pH-Wert einstellen,
- 1,5g SDS ultra pure zugeben und
- mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen.

4x Sample Buffer

- 50µl Glycerol,
- 24µl 0,5M Tris-HCl (pH 6,8; 8% SDS),
- 21µl Aqua dest. mit
- 5µl 2-Mercaptoethanol vermischen und
- eine Spatelspitze Bromphenolblau zugeben.

10x Tris-Glycin Puffer

- 30g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base und
- 144g Glycin einwiegen,
- 100ml 10% SDS Lösung zugeben,
- mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen und auf dem Magnetrührer lösen.
- Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

3.5.1.2 Polyacrylamidgele

Beim Western Blotting dienen reduzierende und denaturierende Bedingungen zur Auftrennung von Proteinen. Dazu werden Polyacrylamidgele hergestellt, die aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestehen. Die Gele werden entweder unmittelbar vor Gebrauch oder am Tag davor hergestellt. Werden die Gele vorher hergestellt, werden sie in feuchte Papiertücher eingewickelt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Herstellung der Gele:

Bereits gereinigte Glasplatten werden mit 70% EtOH fettfrei gemacht, getrocknet und in die dafür vorgesehene Apparatur gespannt. Das folgende Pipettierschema gilt für die Herstellung eines Gels mit der Stärke von 0,75mm.

	10% Trenngel	4% Sammelgel
Aqua dest.	2ml	1,54ml
3M Tris-HCl/pH 8,45/0,3%SDS	2ml	0,62ml
30% Acrylamid	2ml	0,34ml
10% APS	30µl	20µl
TEMED	3µl	2µl

Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamidgelen für die Elektrophorese.

Alle Komponenten werden in einem Röhrchen, auf dem Vortex, vermischt und rasch, bis zur Markierung, in den Zwischenraum der Glasplatten pipettiert. 10% APS und TEMED werden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben, da diese beiden Komponenten der Polymerisation des Gels dienen. Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erhalten und die Bildung von Luftblasen zu verhindern wird dieses mit 30% Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels (ca. 30 Minuten) wird das Isopropanol entfernt und der Zwischenraum der Glasplatten mehrmals mit Aqua dest. gespült, zurückbleibendes Wasser wird mit Filterpapier entfernt. Das Sammelgel wird bis zum oberen Rand der Glasplatten gefüllt und der vorher gereinigte, fettfreie Kamm wird hineingesteckt.

Während das Sammelgel polymerisiert werden die Proben vorbereitet.

3.5.1.3 Probenvorbereitung

Die Proben werden auf Eis aufgetaut und je nach Proteingehalt mit 1x PBS verdünnt, sodass die Proteinmengen der Proben gleich sind. Nun werden die Proben 1:4 mit Sample Buffer versetzt, gevortext und bis zum weiteren Gebrauch bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Sample Buffer wird kurz vor Gebrauch hergestellt, durch das darin enthaltene SDS werden Proteine negativ geladen und aufgefaltet, das 2-Mercaptoethanol wirkt reduzierend.

3.5.1.4 Beladung der Gele und Elektrophorese

Die Glasplatten, zwischen denen die fertigen Gele sind, werden in die Mini Protean® II Apparatur eingespannt und in die Elektrophoresekammer gegeben. Diese wird mit 1x Tris-Glycin Puffer gefüllt. Die Kämme werden nach oben weg entfernt und die Taschen mit Hilfe einer Spritze gespült, um Gelreste zu entfernen. Als Größenmarker werden 2-3µl Prestained Protein Ladder in eine Tasche pipettiert. Die gevortexten Proben werden mit Hilfe von Gelbeladungsspitzen in die Taschen pipettiert. Das Volumen richtet sich nach der zur Verfügung stehenden Menge an Probe, beträgt aber, bei einer Geldicke von 0,75mm, im Falle von 10-Well-Kämmen Maximal 25µl, im Falle von 15-Well-Kämmen maximal 15µl.

Die Elektrophorese erfolgt 90 Minuten, konstant bei 180V und 4°C. Der 1x Tris-Glycin Puffer wird verworfen, die Glasplatten werden entnommen und mit Hilfe eines Spatels voneinander getrennt. Das Gel wird für den Transfer vorbereitet.

3.5.2 Western Transfer Blotting

3.5.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Power Pac 200	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Pure Nitrocellulose-Membran (0,45µM) Trans-Blot®	Bio-Rad
Transfer Puffer	
• Methanol	Fisher Scientific
• 10x Tris-Glycin Puffer, 10% SDS Solution	Roth
Ponceau S	
• Ponceau S, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure	MERCK

Herstellung von:

Transfer Puffer

- 100ml 10x Tris-Glycin Puffer,
- 200ml Methanol und
- 10ml 10% SDS Solution vermengen und
- mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Ponceau S

- 300g Trichloressigsäure,
- 300g Sulfosalicylsäure und
- 10g Ponceau S einwiegen,
- mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen und am Magnetrührer lösen.
- Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

3.5.2.2 Durchführung

Die bei der Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine werden durch Anlegen eines Spannungsfeldes auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und in weiterer Folge immunologisch detektiert. Zum Blotten wird ein Western Blot Sandwich hergestellt.

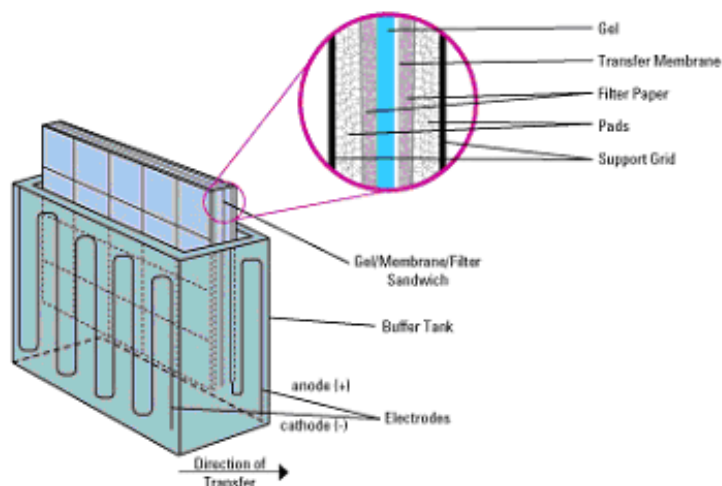


Abbildung 10: Transferkammer und Aufbau des Western Blot Sandwich [www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193].

Schwämme, Filterpapier und Nitrozellulose werden zuvor in Transfer Puffer getränkt. Das Gel wird mit Hilfe eines Spatels von der Glasplatte auf die Nitrozellulose-Membran übertragen und mit Filterpapier überdeckt. Um etwaige Luftblasen zwischen Gel und Membran, die den Transfer stören, zu entfernen wird mit einer Glaseprouvette vorsichtig gewalkt. Die Transferkassette wird geschlossen, die Seite der Transferkassette, auf welcher sich die Nitrozellulosemembran befindet wird zur schwarzen, anodischen Seite der Transferapparatur ausgerichtet und in die Transferkammer gestellt. In diese wird, zur Kühlung, ein Eisblock gegeben, anschließend wird die Kammer mit kaltem Transfer Puffer gefüllt. Der Transfer läuft 45 Minuten, konstant bei 400mA und 4°C. Da der Transfer Puffer mehrmals verwendet wird, wird seine Qualität beim Start des Transfers durch Überprüfen der Spannung (100-120V) bestimmt.

Ist der Transfer abgelaufen, wird die Nitrozellulosemembran entnommen und fünf Minuten mit Ponceau S gefärbt. Das Ponceau S wird abgenommen und die Membran wird mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, sodass die nun gefärbten Proteinbanden sichtbar werden. Durch die Färbung mit Ponceau S wird der Verlauf des Transfers kontrolliert und die Blots können für die weitere Verwendung zugeschnitten werden.

3.5.3 Immunodetektion

3.5.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Belly Dancer	Stovall Lifesciences
Chemilmager™ 4400	Biozym
AlphaEaseFC-Chemilmager 4400	Alpha Innotec
Prism 3.02	GraphPad
Washing Buffer	
• Tween20	MERCK

10x TBS Puffer

- Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base Roth
- HCl rauchend, NaCl MERCK

Blocking Buffer

- Magermilchpulver Fixmilch INSTANT

Primäre Antikörper

- panERK BD Biosciences
- phospho-ERK1/2 Cell Signalling
- p38 Cell Signalling
- phospho-MAPKAP2 Cell Signalling
- Smad2 Cell Signalling
- Smad5 Cell Signalling

BSA Amresco

NaN₃ Sigma

Sekundäre Antikörper

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

SuperSignal[®] West Femto & West Dura Pierce

Herstellung von:

10x TBS Puffer; pH 7,4; 1000ml

- 24,2g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base und
- 84,8g NaCl einwiegen, mit
- Aqua dest. auffüllen und auf dem Magnetrührer lösen.
- Anschließend wird mit 37% HCl der pH auf 7,4 eingestellt.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Washing Buffer; 1000ml

- 1x TBS mit
- 1ml Tween vermengen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Blocking Buffer 5%; 50ml

- 2,5g Magermilchpulver in
- 50ml Washing Buffer lösen.

Primäre-Antikörperlösung

- 0,3g BSA in
- 10ml Washing Buffer lösen,
- unter dem Abzug eine Spatelspitze Natriumazid zugeben und
- den jeweiligen Antikörper in entsprechender Verdünnung zusetzen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Sekundäre-Antikörperlösung

- Sekundäre Antikörper werden 1:15 000, unmittelbar vor Gebrauch, in Blocking Buffer gelöst.

Antikörper	Molekular- gewicht [kDa]	Isotyp	Verdünnung
panERK	42	Mouse IgG2a	1:5000
pERK1/2	42/44	Rabbit IgG	1:1000
p38	43	Rabbit IgG	1:2000
pMAPKAP2	46	Rabbit IgG	1:3000
Smad2	58	Rabbit IgG	1:1000
Smad5	52	Rabbit IgG	1:1000

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper, Molekulargewicht, Isotyp und eingesetzte Verdünnung.

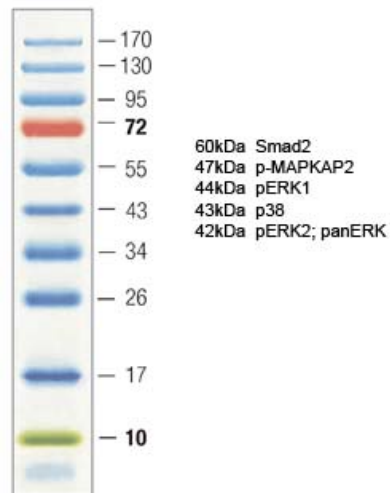


Abbildung 11: Proteinleiter als Referenz zur Größenordnung der verwendeten Primärantikörper.

3.5.3.2 Durchführung

Folgende Arbeitsschritte werden unter ständiger Bewegung am Belly Dancer durchgeführt. Der Blot wird eine Stunde bei Raumtemperatur mittels Blocking Buffer geblockt. Das Blocken dient der Verhinderung einer unspezifischen Bindung der Antikörper. Anschließend wird der Blot zwei Mal, drei Minuten mit Washing Buffer gewaschen und dann mit circa 10ml Primär-Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Primär-Antikörperlösung wird abgenommen und für weitere Verwendung bei 4°C gelagert. Der Blot wird drei Mal, zehn Minuten lang mit Washing Buffer gewaschen und anschließend eine Stunde mit 15ml Sekundär-Antikörper-Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wird der Blot mit SuperSignal®-ECL-Lösung (Enhancer Solution: Peroxidase Solution 1:1) fünf Minuten inkubiert. Nun wird der Blot in die Belichtungskammer des Chemilmager™ 4400 gegeben und photographiert. Die Belichtungszeit richtet sich nach dem jeweiligen Protein, sie kann von einer Sekunde bis zu 50 Minuten betragen.

Die Auswertung erfolgt semiquantitativ mit der Software AlphaEaseFC-Chemilmager 4400, die Signalstärke der einzelnen Banden wird als Integrated Density angegeben, die statistische Auswertung erfolgt mit Microsoft Excel und Prism 3.02.

3.6 Gelatinezymogramm

3.6.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Belly Dancer	Stovall Lifesciences
Chemilmager™ 4400	Biozym
AlphaEaseFC-Chemilmager 4400	Alpha Innotec
Prism 3.02	GraphPad
Power Pac 200	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
Glasplatten 0,75mm	Bio-Rad
10- & 15-Well-Kämme	Bio-Rad
Mini Protean® II Apparatur	Bio-Rad
10% SDS Solution	
SDS ultra pure	Roth
10% APS	
Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech
3M Tris-HCl, pH 8,45	
• Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base	Roth
• 37% HCl	MERCK
Acrylamid	Sigma
• Bis	Sigma
Gelatin from cold water fish skin	Sigma-Aldrich
TEMED	GERBU

HCl rauchend	MERCK
Isopropanol	MERCK
Ethanol	MERCK
Sample Buffer	
Glycerol, Tris-HCl, Bromphenolblau	MERCK
SDS ultra pure	Roth
Tris-Glycin Puffer	
Glycin, Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base, SDS ultra pure	Roth
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
5x PBS, pH 7,4	
NaCl	Roth
Na₂HPO₄*12H₂O, KH₂PO₄, KCl, NaOH	MERCK
1x PBS	
Page Blue Protein Staining Solution	Fermentas
Destain Solution	
Methanol	Fisher Scientific
Essigsäure	MERCK
Washing Buffer	
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan;Tris Base	Roth
HCl rauchend, Triton X 100	MERCK
Incubation Buffer	
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan;Tris Base	Roth
NaCl, CaCl₂	MERCK

Herstellung von:

4x Sample Buffer

- 50µl Glycerol,
- 24µl 0,5M Tris-HCl (pH 6,8; 8% SDS),
- 26µl Aqua dest. vermischen und
- eine Spatelspitze Bromphenolblau zugeben.

Washing Buffer; 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5% Triton; 500ml

- 3g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base in
- 400ml Aqua dest. lösen
- pH mit HCl auf 7,5 einstellen,
- 12,5ml Triton X 100 zugeben,
- mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Incubation Buffer; 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM CaCl₂, 20mM NaCl; 1000ml

- 11,6g NaCl,
- 1,47g CaCl₂,
- 6g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base einwiegen,
- in 1000ml Aqua dest. lösen und pH mit HCl auf 7,5 einstellen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Destain Solution; 1000ml

- 200ml Methanol,
- 100ml Essigsäure und
- 700ml Aqua dest. vermengen.
- Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

3.6.2 Gelatinepolyacrylamidgele

Für Gelatinezymogramme werden, wie beim Western Blot, 10%ige Polyacrylamidgele verwendet, mit dem Unterschied, dass dem Gel 1% Gelatine zugegeben wird, wodurch die Polymerisation etwas länger dauert.

3.6.3 Probenvorbereitung

Um die Zellzahl der Proben anzugleichen werden diese mit 1x PBS verdünnt und anschließend 1:4 mit Sample Buffer verdünnt.

3.6.4 Gelbeladung und Elektrophorese

Die Beladung der Gele und die Elektrophorese erfolgen wie beim Western Blot.

3.6.5 Inkubation

Nach abgelaufener Elektrophorese erfolgen, mit Washing Buffer, drei Waschschriffe am Belly Dancer zu je 30 Minuten. Nach dem Waschen wird das Gel zwei Mal mit Aqua dest. gespült um den Washing Buffer zu entfernen. Nun wird das Gel im Incubation Buffer bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre über Nacht inkubiert. Nach abgelaufener Inkubation wird das Gel mittels Page Blue Protein Staining Solution 20-90 Minuten am Belly Dancer bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wird mit der Destain Solution solange entfärbt, bis die Banden, wo die Gelatine von den MMPs verbraucht wurde, auf blauem Hintergrund gut sichtbar sind.

Das Gel wird am Chemilmager™ 4400 photographiert, die Auswertung erfolgt mit dem Programm AlphaEaseFC-Chemilmager 4400 semiquantitativ, und statistisch mittels Microsoft Excel und Prism 3.02.

3.7 RNA-Extraktion, reverse Transkription, cDNA-Synthese

3.7.1 Probenherstellung PCR

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die 12-Well Platte aus dem Brutschrank genommen und sofort auf Eis gestellt um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu stoppen. Die Zellsuspension wird pro Well entnommen und in je ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird mit vorgekühlter Zentrifuge bei 720xg und 4°C, fünf Minuten zentrifugiert, wobei ein Zellpellet entsteht. Das Medium wird mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Pellet ein Mal mit einem Milliliter eiskaltem 1x PBS gewaschen und nochmals bei 720xg und 4°C, fünf Minuten lang zentrifugiert. Der 1x PBS wird mittels Wasserstrahlpumpe

abgenommen, das Pellet in TriFast™ gelöst, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei -20°C gelagert. Nach Arbeitsanleitung des Herstellers wird für fünf bis zehn Millionen Zellen ein Milliliter TriFast™ verwendet.

3.7.2 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Zentrifuge	Eppendorf 5417R
DRI-BLOCK DB3	Techne
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
peqGOLD TriFAST™	PeqLab
DEPC • DEPC-Wasser RNase frei • DEPC-Pipettenspitzen und -Reaktionsgefäße RNase frei	Sigma
Chloroform	MERCK
Isopropanol	MERCK
Ethanol	MERCK
Random Hexamer Primer (0,2µg/µl)	Fermentas
RT Buffer (5x)	Fermentas
dNTP Set: dATP, dGTP, dTTP & dCTP (je 100mM)	Fermentas
RiboLock™ RNase Inhibitor (40U/µl)	Fermentas
RevertAid™ M-MuIV Reverse Transkriptase (200U/µl)	Fermentas

Herstellung von:

DEPC-Wasser

- Pro Liter destilliertem Wasser werden 100µl DEPC zugegeben,
- zwei Stunden unter dem Abzug auf dem Magnetrührer gelöst und anschließend
- zwei Stunden bei 120°C autoklaviert.

DEPC-Pipettenspitzen und -Reaktionsgefäße

- Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße werden in frischem, nicht autoklaviertem DEPC-Wasser über Nacht getränkt,
- zwei Stunden bei 120°C autoklaviert und
- bei 70°C im Trockenschrank getrocknet.

dNTPs (10mM)

- Zu 540µl steril filtriertem Aqua dest. werden je 15µl dATP, dGTP, dTTP und dCTP (je 100mM) zugeben.

75% EtOH

- Für die RNA Extraktion werden DEPC-Wasser und EtOH 1:4 gemischt.

3.7.3 RNA-Extraktion

Die in TriFastTM gelösten Proben werden für die RNA-Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut, währenddessen wird die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt. Folgende Arbeitsschritte werden im Abzug durchgeführt, alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei 12000xg und 4°C für zehn Minuten.

Pro verwendetem Milliliter TriFastTM werden, entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers, 200µl Chloroform zugegeben. Dann werden die Proben 30 Sekunden kräftig und gleichmäßig geschüttelt, wobei die Homogenisierung ausschlaggebend für den RNA-Ertrag ist. Anschließend werden die Proben fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt der erste Zentrifugationsschritt, bei dem sich drei Phasen bilden. In der oberen, wässrigen Phase ist die RNA enthalten, in der Interphase befinden sich DNA und Proteine, die dritte Phase ist die Chloroform-Phenol-Phase. In der Zwischenzeit wird für die RNA-Präzipitation in sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen pro eingesetztem Milliliter Trifast 500µl kaltes Isopropanol

auf Eis vorgelegt. Nach abgelaufener Zentrifugation wird die obere Phase in 60µl Schritten abgenommen und zum Isopropanol hinzugefügt. Die Proben werden geschwenkt und 90 Minuten bei -20°C gelagert.

Nach neuerlichem Zentrifugieren erhält man das RNA-Pellet. Das Isopropanol wird im Abzug entfernt und es wird zwei Mal mit 75% Ethanol gewaschen, wobei pro eingesetztem Milliliter Trifast ein Milliliter Ethanol zugegeben wird. Das Ethanol wird ebenfalls im Abzug entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet unter der Laminar-Airflow bei geöffnetem Eppendorf Reaktionsgefäß getrocknet.

3.7.4 Reverse Transkription, Umschreibung in cDNA

Das Pellet wird in 15µl DEPC Wasser, durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette, suspendiert und zehn Minuten bei 55°C im Wasserbad vollständig gelöst. Danach werden je 11,5µl des RNA-Wasser-Gemisches in ein PCR-Tube überführt und mit 1µl Random Hexamer Primer versetzt. Dann erfolgt eine Inkubation im Thermo Cycler für zehn Minuten bei 70°C.

In der Zwischenzeit wird der Mastermix nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Substanz	Ausgangs-konzentration	Volumen [µl]	End-konzentration
RT Buffer	5x	4	1x
dNTPs	100mM	2	10mM
RNAse Inhibitor	40U/µl	0,5	1U/µl
Reverse Transkriptase	100U/µl	1	5U/µl

Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix zur cDNA Synthese.

Nach der Inkubation wird zu jeder Probe 7,5µl Mastermix gegeben, sodass das Gesamtvolumen pro Tube 20µl beträgt. Die Proben werden eine Stunde bei 37°C und zehn Minuten bei 70°C im Thermo Cycler inkubiert. Die fertige cDNA wird für nachfolgende PCR-Analysen bei -20°C gelagert.

3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.8.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Power Pac 200	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Mikrowelle	Moulinex
2 UV Transilluminator	UVP
AlphaEaseFC-Chemilmager 4400	Alpha Innotec
Sterilfilter (Porendurchmesser 0,45µm)	Sartorius
Taq DNA Polymerase recombinant (1U/µl)	Fermentas
10x Taq Buffer + KCl	Fermentas
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas
Genspezifische Primerpaare (sense/antisense) (je 100µM):	
• PAI-1	VBC-Genomics
• GAPDH	
dNTP Set: dATP, dGTP, dTTP & dCTP (je 100mM)	Fermentas
Agarose	MERCK

Ethidiumbromid	MERCK
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas
5x TBE Puffer	
• Tris(hydroxymethyl)-amionomethan, Borsäure (H ₃ BO ₃), EDTA-Lösung (0,5M), Titriplex, NaOH	MERCK
6x Loading Dye	Fermentas

Herstellung von:

Primer (10µM)

- Das Primerdesign erfolgt mit Hilfe von PRIMER3 Software (Web-basierte, freie Software)
- Primerpaare (100µM) werden 1:10 mit steril filtriertem Aqua dest. verdünnt.

0,5M EDTA-Lösung, pH 8; 500ml

- 93g Titriplex einwiegen,
- in 400ml Aqua dest. lösen,
- mit 10N NaOH den pH-Wert einstellen und
- mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen.

5x TBE Puffer; 1000ml

- 54g Tris(hydroxymethyl)-amionomethan und
- 27,5g H₃BO₃ einwiegen,
- 20ml EDTA-Lösung zugeben,
- mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen und auf dem Magnetrührer vermischen, bis das Tris(hydroxymethyl)-amionomethan und die Borsäure gelöst sind.

1,5% Agarosegel

- 0,45g Agarose in ein Becherglas einwiegen,
- in 30ml 1x TBE Puffer lösen,
- in der Mikrowelle aufkochen lassen bis eine klare Lösung entsteht (ca. 20sec), abkühlen lassen,

- 0,5µl Ethidiumbromid (0,5mg/ml) pro ml TBE Puffer zugeben.
- Die Gellösung wird in einen Gelschlitten, mit eingesetztem 8-Well-Kamm, gegossen.

3.8.2 Durchführung

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist ein Verfahren um selektive, Primer flankierte Nucleinsäuresequenzen exponentiell zu vervielfältigen. Zur Durchführung wird, nach Auftauen der benötigten Reagenzien auf Eis, ein Mastermix nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Substanz	Ausgangs- konzentration	Volumen [µl]	End- konzentration
Aqua dest. steril filtriert		31	
Taq Buffer	10x	5	1x
MgCl ₂	25mM	5	2,5mM
dNTPs	10mM	4	0,8mM
Primer (sense/antisense)	10µM	je 1,5	je 0,3µM
Taq DNA Polymerase	1U/µl	1	0,02U/µl

Tabelle 7: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR.

In ein PCR Tube werden 49µl Mastermix gegeben, welcher mit 1µl cDNA versetzt, am Vortex gemischt und im Thermo Cycler inkubiert wird.

Im Thermo Cycler läuft ein zyklisches Temperaturprogramm ab, welches aus folgenden Schritten besteht:

1. Denaturierung

Initiale Denaturierung: Die DNA Doppelstränge werden bei 94°C in die beiden Einzelstränge aufgetrennt (drei Minuten).

Denaturierung bei 94°C (40 Sekunden).

2. Annealing

Nach Abkühlung auf eine primerspezifische Temperatur hybridisieren die Primer an die DNA-Einzelstränge (60 Sekunden).

3. Elongation

Der Elongationsschritt erfolgt beim Temperaturoptimum der Taq Polymerase, das bei 72°C liegt. Dabei wird durch Anlagerung der freien dNTPs, ausgehend von den Primern, ein komplementärer Strang synthetisiert (60 Sekunden).

Die finale Elongation erfolgt ebenfalls bei 72°C (fünf Minuten).

Die amplifizierten cDNA-Fragmente werden anschließend mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Durch das angelegte Spannungsfeld wandert die negativ geladene cDNA Richtung Anode und wird durch den Widerstand des Agarosegels ihrer Größe nach aufgetrennt. Dem Agarosegel wird zur Sichtbarmachung der DNA-Banden Ethidiumbromid zugegeben. Nach der Polymerisation des Gels wird der Kamm entfernt und der Schlitten, in welchem sich das Gel befindet, in eine Elektrophoresekammer gegeben. Diese wird mit 1x TBE gefüllt.

Die fertig amplifizierten Proben werden mit 6x Loading Dye vermengt. Nun wird in die Taschen des Gels jeweils 15µl Probe pipettiert, die Elektrophoresekammer wird geschlossen. Die Elektrophorese läuft bei 100V konstant und bei 50-60mA für 20 Minuten.

Nach abgelaufener Elektrophorese werden die Banden, die unter UV-Licht fluoreszieren, photographiert. Die Auswertung erfolgt semiquantitativ mit der Software AlphaEaseFC Chemilmager 4400. Um Unterschiede der cDNA Menge aufzuzeigen dient das housekeeping-Gene GAPDH.

Primer	bp	°C	Zyklen	Sequenz
GAPDH	185	62	25	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3' 5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'
PAI-1	399	61	30	5'-TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT-3' 5'-CGG TCA TTC CCA GGT TCT CTA-3'

Tabelle 8: Verwendete Primer, Länge des amplifizierten PCR Produkts, primerspezifische Annealingtemperatur, Anzahl der Zyklen und Sequenzen der verwendeten sense/antisense Primer.

3.9 Wachstumsverlauf

3.9.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Laminar Flow Hood Biosafe2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
CASY [®] Cell Counter + Analyser System Model TT	Schärfe Systeme GmbH
12-Well-Platte	Greiner
humanes rekombinantes TGF- β 1 (4 μ g/ml)	Calbiochem
bovines Laktoferrin (20mg/ml)	Morinaga Milk Industry
HCl rauchend	MERCK
5x PBS	
• NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	MERCK

3.9.2 Durchführung

Es wird je ein Milliliter Zellsuspension pro Well ausgesetzt, wobei die Zelldichte zuvor auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml Medium eingestellt wurde. Die Zellen werden mit TGF- β 1 (1ng/ml) oder Laktoferrin (50 μ g/ml) inkubiert.

Am CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT wird die Gesamtzellzahl, die Lebendzellzahl, die Viabilität und der Durchmesser der Zellen gemessen. Die erste Messung erfolgt 24 Stunden nach der Inkubation und an den zwei darauf folgenden Tagen (nach 48 und 72 Stunden) wird die Messung fortgesetzt.

3.10 Adhäsionstest; Kristallviolettffärbung

3.10.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Platereader 550	Bio-Rad
12-Well-Platte	Greiner
96-Well-Platte	Greiner
25% Glutaraldehyd	MERCK
Kristallviolett	Sigma
humanes rekombinantes TGF- β 1 (4 μ g/ml)	Calbiochem
bovines Laktoferrin (20mg/ml)	Morinaga Milk Industry
Ethanol	MERCK
Isopropanol	MERCK
5x PBS	
• NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	MERCK

Herstellung von:

0,25% Glutaraldehyd

- 25% Glutaraldehyd wird 1:100 mit 1xPBS verdünnt.

2% Kristallviolett-Stocklösung

- 0,2g Kristallviolett einwiegen und
- in 10ml Ethanol (20%) lösen.

0,2% Kristallviolettlösung

- Die 2% Kristallviolettstocklösung wird mit 1x PBS auf 0,2% verdünnt.

3.10.2 Durchführung

Nach 72-stündiger Inkubation der Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wird das Zellkulturmedium mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wird mit einem Milliliter 1x PBS pro Well gewaschen. Der 1x PBS wird mittels Wasserstrahlpumpe abgenommen. In jedes Well wird ein Milliliter Glutaraldehyd (0,25%) gegeben und zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird zwei Mal mit einem Milliliter Leitungswasser pro Well gewaschen. Nach dem Waschen wird in jedes Well 0,5ml Kristallviolettlösung (0,2%) gegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird drei Mal mit einem Milliliter Leitungswasser pro Well gewaschen und mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Für die photometrische Messung der Farbintensität werden pro Well 600µl einer 1:1 Ethanol (50%) - Isopropanol (100%) Mischung zugegeben, wodurch der Farbstoff in Lösung geht. Gegebenenfalls muss die Platte etwas geschwenkt werden, damit sich der gesamte Farbstoff löst. In eine 96-Well-Platte werden, im Dreifachansatz, von jeder Probe 100µl pro Well pipettiert. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 550nm.

3.11 Zellproliferationsassay

3.11.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Laminar Flow Hood Biosafe2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Platereader 550	Bio-Rad
96-Well-Platte	Greiner
CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega

humanes rekombinantes TGF- β 1 (4 μ g/ml)	Calbiochem
bovines Lf (20mg/ml)	Morinaga Milk Industry

3.11.2 Durchführung

In eine 96-Well-Platte werden pro Well 100 μ l Zellsuspension ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) pipettiert und es wird mit TGF- β 1 (1ng/ml) oder Laktoferrin (50 μ g/ml) 72 Stunden lang inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden 20 μ l CellTiter96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay pro Well zugegeben und ein bis drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion bei 490nm, als Leerwert dient reines Zellkulturmedium, dem ebenfalls 20 μ l CellTiter96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay zugefügt werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Signaltransduktion und die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 zur Überprüfung der Beteiligung des MAPK Pathways

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die MAPKs p38 und ERK1/2, in THP-1 Monozyten, in Antwort auf TGF- β 1 und Laktoferrin aktiviert werden. Weiters wurde gezeigt, dass auf mRNA-Ebene die Expression von PAI-1 sowohl durch TGF- β 1 als auch durch Laktoferrin stimuliert wird.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zunächst Western Blot Analysen durchgeführt, wobei die Laktoferrin und TGF- β 1 induzierte Aktivierung von ERK1/2, p38 und MAPKAP2 in THP-1 Monozyten untersucht wurde. In weiterer Folge wurden RT-PCR Analysen durchgeführt, um die Stimulierung von PAI-1, hervorgerufen durch Laktoferrin und TGF- β 1, zu untersuchen. Um eine eventuelle Beteiligung des MAPK Pathways an der Vermittlung dieses Effekts zu überprüfen, wurden die Experimente in Anwesenheit der spezifischen Inhibitoren U0126 und SB202190 wiederholt.

U0126 hemmt die katalytische Aktivität der upstream MAPKK von ERK1/2, MEK1/2, wodurch die Phosphorylierung von ERK1/2, und somit die Signalweiterleitung unterbunden wird [FAVATA et al., 1998]. SB202190 bindet an die MAPK p38, sowohl in ihrer aktiven, als auch inaktiven Form, und hemmt die Kinaseaktivität von p38. Dies führt zu einer Inhibierung der Aktivierung von downstream-Kinasen von p38 wie MAPKAP2 [FRANTZ et al., 1998].

Von den folgenden Western Blot Analysen wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, jedoch konnte aufgrund unterschiedlicher Signalstärken keine statistische Auswertung erfolgen.

4.1.1 Aktivierung von MAPKAP2 in THP-1 Monozyten und Caco-2 Zellen

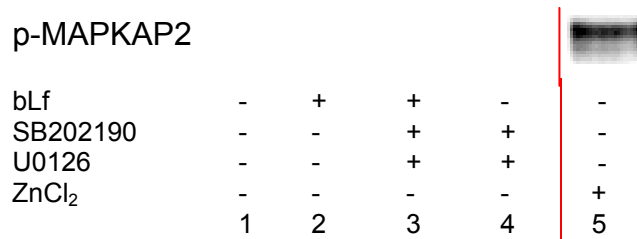


Abbildung 12: Repräsentative Abbildung des Western Blot Signals von p-MAPKAP2 nach 4-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (33,3µg/ml) sowie U0126 (6,6µM), nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (1,3µM) (1-4) und nach 4-stündiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit ZnCl₂ (200µg/ml) (5).

Die Kinase MAPKAP2 wurde in den THP-1 Monozyten nicht aktiviert, weshalb im Verlauf der Analysen eine Positivkontrolle mit Zinkchlorid inkubierten Caco-2 Zellen durchgeführt wurde.

4.1.2 Einfluss von bovinem Laktoferrin auf die Aktivierung der MAPKs ERK1/2 und p38 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in einzelner und kombinierter Form

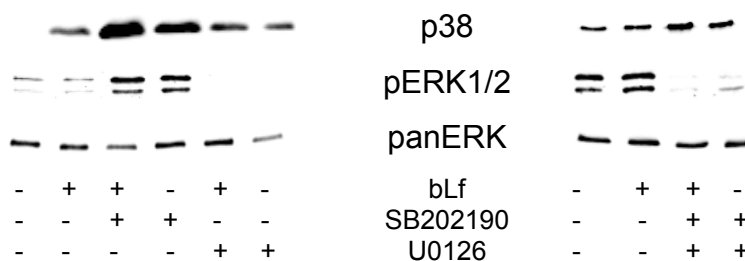


Abbildung 13: Effekt von bovinem Laktoferrin auf die Aktivierung der MAPKs p38 und pERK1/2 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190. Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p38, pERK1 und pERK2 nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (33,3µg/ml) sowie U0126 (6,6µM) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (1,2µM); panERK diente als Ladekontrolle.

Die MAPK p38 wird nach vierstündiger Inkubation mit Laktoferrin aktiviert. Auf die Aktivierung von ERK1/2 zeigt Laktoferrin keinen Effekt.

Die gemeinsame Inkubation von Laktoferrin und SB202190 führt zu einem verstärkten Signal von p38, auch der alleinige Einsatz von SB202190 zeigt ein verstärktes Signal von p38 gegenüber Laktoferrin. Problematisch ist, dass der Effekt von Laktoferrin auf den p38 Pathway und die Effizienz des Inhibitors in

dem dargestellten Versuch nicht überprüfbar sind, da es notwendig ist, die Aktivierung der downstream Kinase von p38, MAPKAP2, zu untersuchen. MAPKAP2 zeigte aber, wie bereits oben beschrieben, keinerlei Aktivität in den THP-1 Monozyten. Die Inkubation mit SB202190 führt ebenfalls zu einem verstärkten Signal von ERK1/2, was auf eine problematische Selektivität des Inhibitors hindeutet.

U0126 weist eine hohe Effektivität auf, da jeglicher Effekt auf die Stimulierung von ERK1/2 ausgeschaltet wird.

Der kombinierte Einsatz der Inhibitoren zeigt, dass sie sich gegenseitig nicht beeinflussen. Die Inkubation mit den Inhibitoren, mit und ohne Laktoferrin, führt zur Phosphorylierung von p38. Durch den Einsatz von U0126 wird das Signal von ERK1/2 ausgeschaltet.

4.1.3 Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190

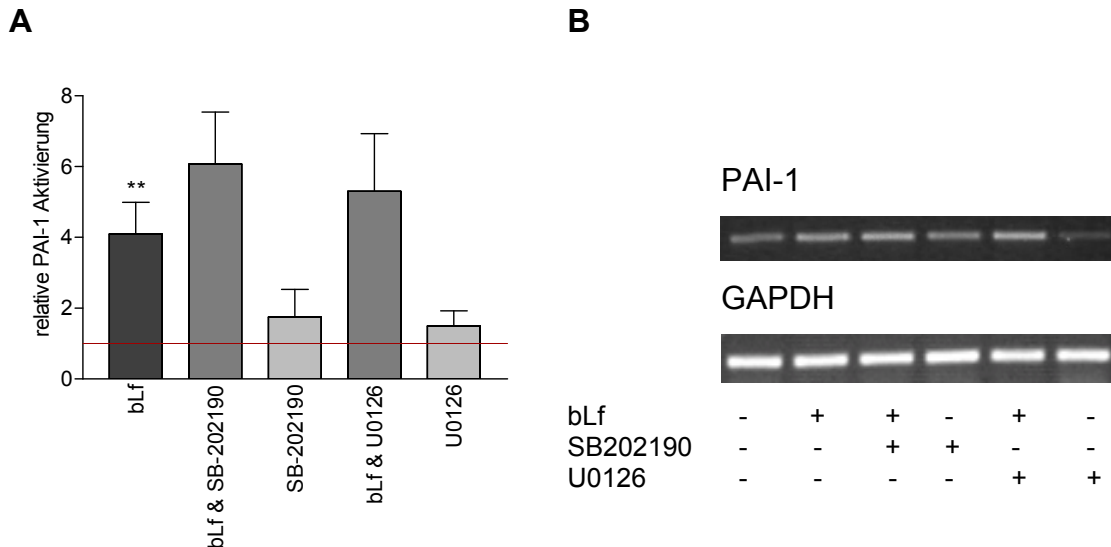


Abbildung 14: Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und der Einfluss von U0126 und SB202190.

A: Graphische Darstellung der relativen PAI-1 Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (50µg/ml) sowie U0126 (10µM) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (2µM). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt ($p < 0,01$; **). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, verglichen wurden bLf und Kontrolle, bLf und bLf kombiniert mit den Inhibitoren.

B: Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen PAI-1 Stimulierung durch bLf sowie der Ladekontrolle GAPDH.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, steigt die Expression von PAI-1 durch Inkubation mit Laktoferrin gegenüber der Kontrolle um circa das Vierfache an ($p < 0,01$). Die Stimulierung der PAI-1 mRNA nimmt sowohl durch SB202190 als auch durch U0126 gegenüber der alleinigen Inkubation mit Laktoferrin zu. Da ERK1/2, wie in den vorangegangenen Ergebnissen dargestellt, keine Aktivierung durch Laktoferrin zeigt und aufgrund dieses Ergebnisses kann darauf geschlossen werden, dass weder p38 noch ERK1/2 an der Laktoferrin induzierten PAI-1 Stimulierung beteiligt sind.

4.1.4 Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190

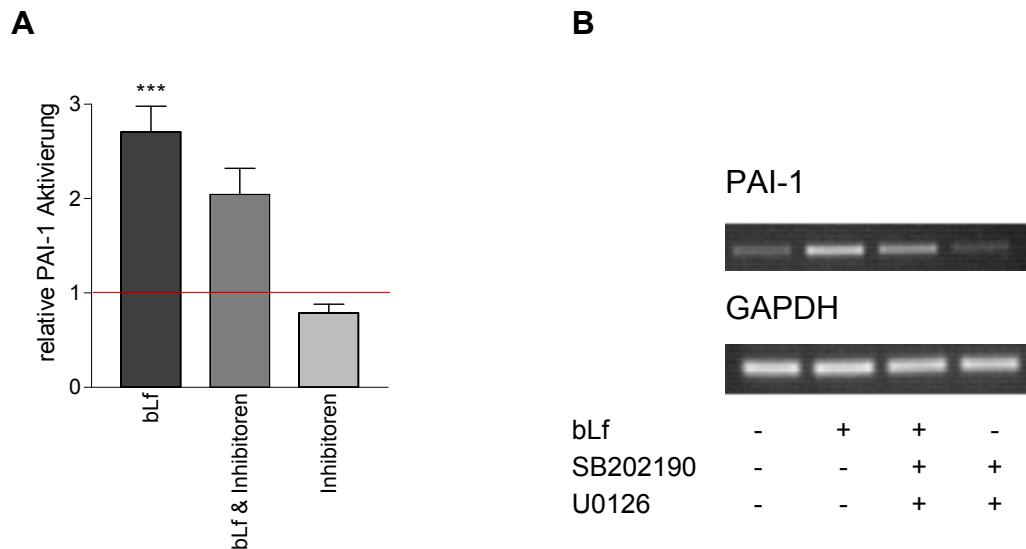


Abbildung 15: Bovines Laktoferrin induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in kombinierter Form.

A: Graphische Darstellung der relativen PAI-1 Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (50µg/ml) sowie U0126 (10µM) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (2µM). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt ($p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, verglichen wurden bLf und Kontrolle, bLf und bLf kombiniert mit den Inhibitoren.

B: Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen PAI-1 Stimulierung durch bLf sowie der Ladekontrolle GAPDH.

Auch dieses RT-PCR Ergebnis zeigt eine höchst signifikante Induktion der PAI-1 Expression in Antwort auf Laktoferrin ($p < 0,001$). Die Stimulierung der Expression der PAI-1 mRNA durch Laktoferrin steigt gegenüber der Kontrolle um beinahe das Dreifache an. Nach kombinierter Inkubation der THP-1 Monozyten mit Laktoferrin, SB202190 und U0126 nimmt die Stimulierung von PAI-1 ab. Da die Abnahme nicht signifikant ist und aufgrund der vorher dargestellten Ergebnisse ist nicht anzunehmen, dass Laktoferrin die PAI-1 mRNA Expression über den p38 oder ERK1/2 MAPK Signalweg stimuliert. Es stellt sich die Frage, ob die Abnahme der PAI-1 Expression durch die beiden Inhibitoren aufgrund einer Interaktion der Inhibitoren mit anderen Signalwegen zustande kommt.

4.1.5 Einfluss von TGF- β 1 auf die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 und p38 in THP-1 Monozyten und die Wirkung von U0126 und SB202190 in kombinierter Form

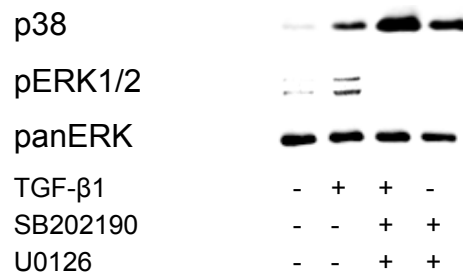


Abbildung 16: Repräsentative Abbildung der Western Blot Signale von p38, pERK1/2 in THP-1 Monozyten nach 4-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 (1ng/ml) sowie U0126 (6,6 μ M) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (1,3 μ M); panERK diente als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, induziert TGF- β 1, nach einer Inkubation von vier Stunden, die Phosphorylierung der MAPK p38 in THP-1 Monozyten und es ist eine Aktivierung von ERK1/2 in Antwort auf TGF- β 1 zu erkennen. Durch den gemeinsamen Einsatz von TGF- β 1, U0126 und SB202190 wird p38 weiter hinaufreguliert und es wäre abermals notwendig die Aktivität der downstream Kinase von p38, MAPKAP2, zu ermitteln um weitere Aussagen treffen zu können. Durch U0126 wird die TGF- β 1 induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 effektiv gehemmt.

4.1.6 TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190

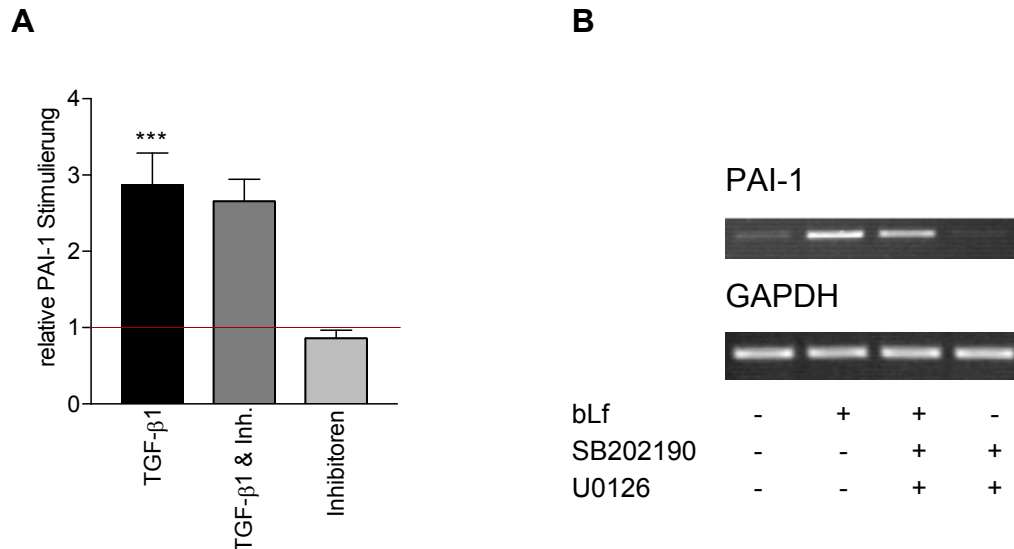


Abbildung 17: TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die kombinierte Wirkung von U0126 und SB202190.

A: Graphische Darstellung der relativen PAI-1 Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 (1ng/ml) sowie U0126 (10 μ M) und nach 5-stündiger Inkubation mit SB202190 (2 μ M). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt ($p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, verglichen wurden TGF- β 1 und Kontrolle, TGF- β 1 und TGF- β 1 kombiniert mit den Inhibitoren.

B: Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen PAI-1 Stimulierung durch TGF- β 1 sowie der Ladekontrolle GAPDH.

Wie das oben dargestellte Ergebnis der RT-PCR Analyse zeigt, führt eine vierstündige Inkubation mit TGF- β 1 zu einer höchst signifikanten ($p < 0,001$) Erhöhung der mRNA Expression von PAI-1. Die TGF- β 1 induzierte Expression von PAI-1 in THP-1 Monozyten steigt auf beinahe das Dreifache des Kontrollwertes an. Durch den kombinierten Einsatz von TGF- β 1, SB202190 und U0126 wird dieser Effekt in nicht signifikantem Ausmaß vermindert. Da die Inhibitoren die Aktivierung der PAI-1 mRNA nur in geringem Ausmaß hinabregulieren, kann darauf geschlossen werden, dass die TGF- β 1 induzierte Expression der PAI-1 mRNA in THP-1 Monozyten nicht über den p38 oder ERK1/2 Signalweg reguliert wird.

4.2 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Signaltransduktion und die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542 zur Überprüfung der Beteiligung des Smad Pathways

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass in Antwort auf Laktoferrin neben MAPK Signalwegen auch der TGF- β 1 Pathway in THP-1 Monozyten aktiviert wird.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurde, nach Durchführung einer Zellfraktionierung, mittels Western Blot Analyse die Smad2 Akkumulation im Zellkern von THP-1 Monozyten, nach Inkubation mit bovinem Laktoferrin und TGF- β 1, untersucht. In weiterer Folge wurden RT-PCR Analysen durchgeführt um die Expression des Zielgens PAI-1 zu untersuchen. Um die eventuelle Beteiligung des Smad Pathways bei dieser Stimulierung zu überprüfen wurden die Versuche in Anwesenheit von SB-431542 durchgeführt.

SB-431542 ist ein spezifischer Inhibitor von T β R-I (ALK5) und verhindert somit die Phosphorylierung von Smad-Proteinen [INMAN et al., 2002b].

4.2.1 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Akkumulation von Smad2 in der Kernfraktion von THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542

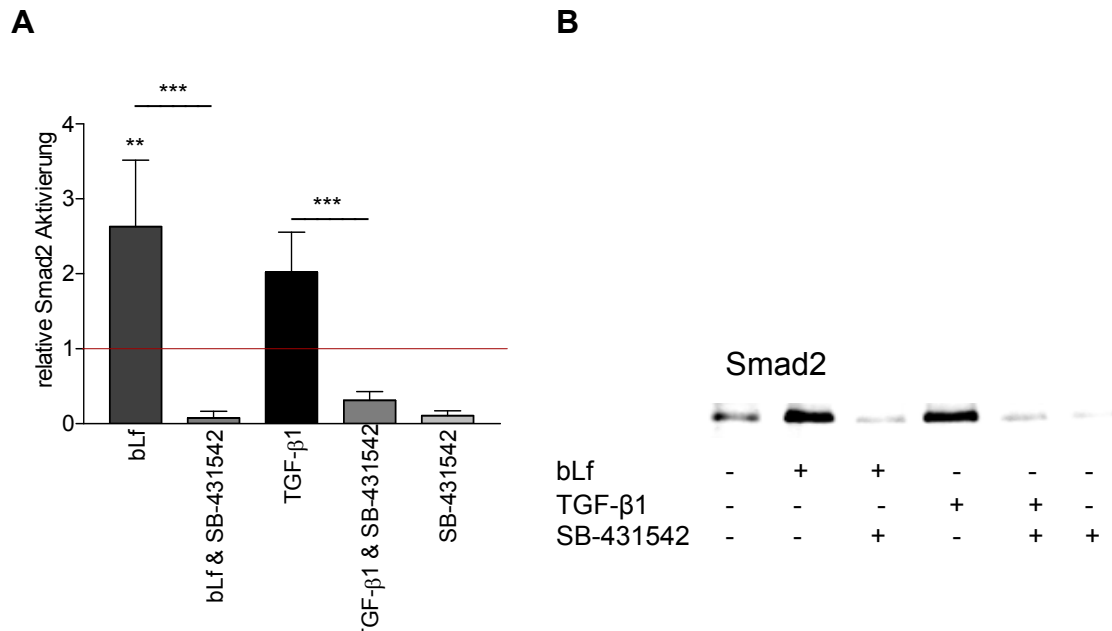


Abbildung 18: Einfluss von bovinem Laktoferrin sowie TGF- β 1 auf die relative Smad2 Akkumulation in der Kernfraktion von THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542.

A: Graphische Darstellung der relativen Smad2 Akkumulation im Zellkern von THP-1 Monozyten nach 1-stündiger Inkubation mit bLf (50 μ g/ml) sowie TGF- β 1 (1ng/ml) und 1,5-stündiger Inkubation mit SB-431542 (10 μ M). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrolle ist auf 1 gesetzt ($p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, verglichen wurden bLf bzw. TGF- β 1 und Kontrolle, bLf bzw. TGF- β 1 und bLf bzw. TGF- β 1 kombiniert mit dem Inhibitor.

B: Repräsentative Abbildung des Western Blot Signals der relativen Smad2 Aktivierung in THP-1 Monozyten in Antwort auf bLf und TGF- β 1.

Das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigt, dass Laktoferrin und TGF- β 1, nach einstündiger Inkubation, eine erhöhte Akkumulation von Smad2 im Zellkern von THP-1 Monozyten induzieren. Gegenüber der Kontrolle nimmt die Akkumulation von Smad2 durch Laktoferrin, statistisch signifikant ($p < 0,01$), um mehr als das Zweieinhalbfache, durch TGF- β 1 um circa das Zweifache zu. Das Ergebnis zeigt ebenfalls, dass sowohl die Laktoferrin als auch die TGF- β 1 induzierte Akkumulation von Smad2 durch die Anwesenheit von SB-431542 unter das Kontrollniveau sinkt. Der Effekt ist statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$).

4.2.2 Bovines Laktoferrin und TGF- β 1 induzierte PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542

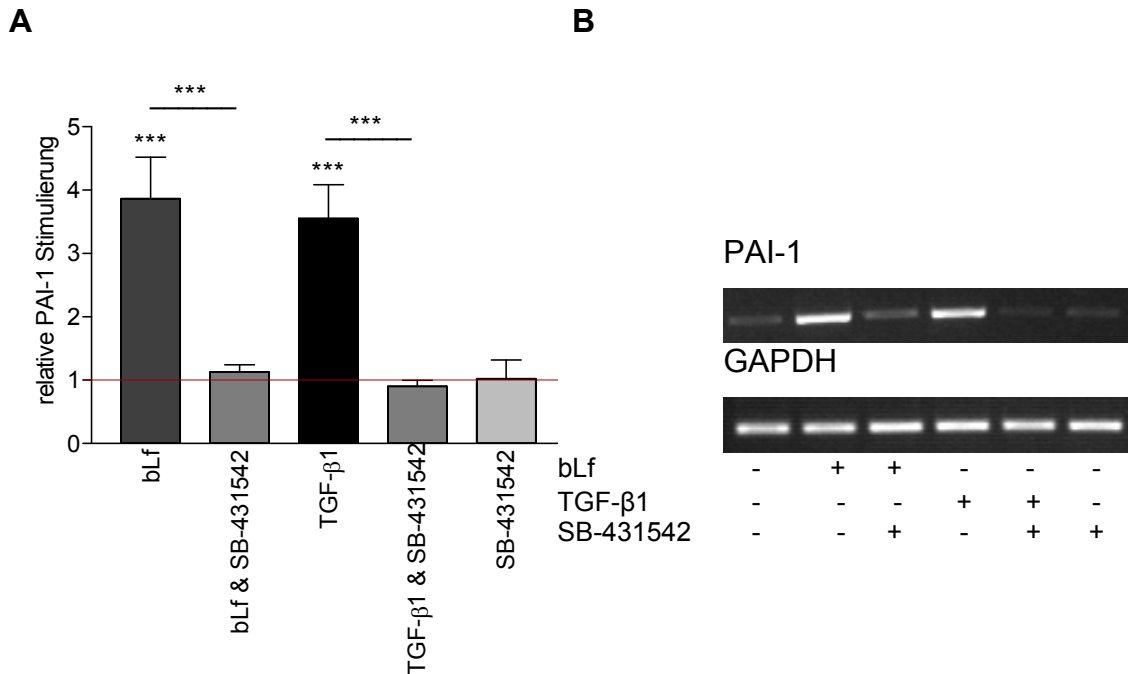


Abbildung 19: Einfluss von bovinem Laktoferrin sowie TGF- β 1 auf die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten und die Wirkung von SB-431542.

A: Graphische Darstellung der relativen PAI-1 Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (50 μ g/ml) sowie TGF- β 1 (1ng/ml) und 4,5-stündiger Inkubation mit SB-431542 (10 μ M). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt ($p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, verglichen wurden bLf bzw. TGF- β 1 und Kontrolle, bLf bzw. TGF- β 1 und bLf bzw. TGF- β 1 kombiniert mit dem Inhibitor.

B: Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen PAI-1 Stimulierung in Antwort auf bLf bzw. TGF- β 1 sowie der Ladekontrolle GAPDH.

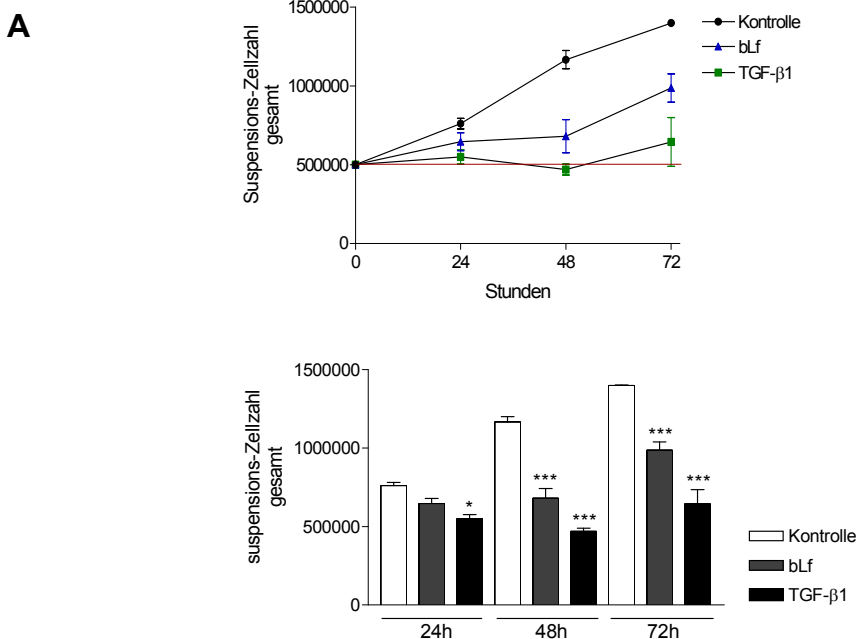
Wie die RT-PCR Ergebnisse zeigen, ist auf mRNA-Ebene bei PAI-1, nach vierstündiger Inkubation, ein statistisch höchst signifikanter Effekt von Laktoferrin ($p < 0,001$) und TGF- β 1 ($p < 0,001$) in THP-1 Monozyten zu erkennen. Die Expression von PAI-1 steigt durch Laktoferrin um beinahe das Vierfache, durch TGF- β 1 um circa das Dreieinhalbfache gegenüber der Kontrolle an. Die Stimulierung der PAI-1 mRNA Expression durch Laktoferrin und TGF- β 1 wird durch SB-431542 vollständig rückgängig gemacht ($p < 0,001$).

Aufgrund dieses Ergebnisses kann darauf geschlossen werden, dass sowohl Laktoferrin als auch TGF- β 1 die Expression von PAI-1 in THP-1 Monozyten über den Smad2 Pathway stimulieren.

4.3 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf das Wachstum von THP-1 Monozyten

Sowohl Laktoferrin als auch TGF- β 1 beeinflussen die Wachstumsrate verschiedener Zelllinien; durch ihre zytokinartige Wirkung fördern oder hemmen sie das Wachstum verschiedener Zelltypen. In unserer Arbeitsgruppe konnte beispielsweise eine Förderung des Wachstums von humanen artikulären Chondrozyten [BRANDL, 2005] und eine Inhibierung der Proliferation von HeLa-Zellen in Antwort auf Laktoferrin [ZEMANN et al., 2010] nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf das Wachstum von THP-1 Monozyten untersucht und in den nachfolgenden Abbildungen vergleichend gegenüber gestellt. Die Zellen wurden mit den Wachstumsfaktoren inkubiert und nach null, 24, 48 und 72 Stunden mit Hilfe des CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT ausgezählt.



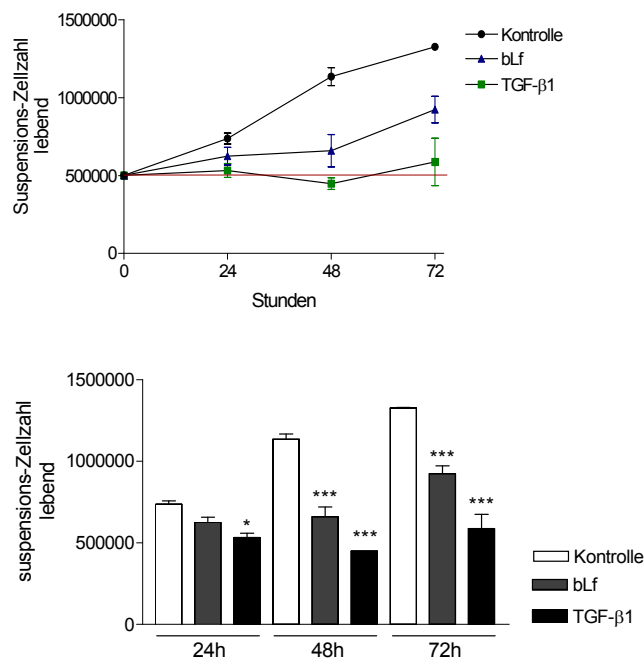
B

Abbildung 20: Einfluss von bovinem Laktoterrin und TGF-β1 auf das Wachstum von THP-1 Monozyten.

Graphische Darstellung des Effekts von bLf (50µg/ml) und TGF-β1 (1ng/ml) nach 0-, 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten auf die gesamte Anzahl an Suspensionszellen (**A**) und auf die Anzahl an viablen Suspensionszellen (**B**). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten ($p < 0,05$: *; $p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, die statistische Signifikanz gilt gegenüber der Kontrolle.

Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen zeigen, dass die Anzahl an Kontrollzellen von der Ausgangszelldichte von $0,5 \times 10^6$ nach 24 Stunden auf $0,74 \times 10^6$ Zellen/ml ansteigt. Die mit TGF-β1 inkubierten Zellen zeigen keine Zunahme der Zellzahl. Nach 48 Stunden nimmt die Anzahl der Kontrollzellen mit $1,13 \times 10^6$ Zellen/ml weiter zu, während die Anzahl der mit TGF-β1 inkubierten Zellen leicht unter die Ausgangszelldichte sinkt, und nach 72 Stunden in etwa wieder auf die Ausgangszelldichte steigt, wohingegen die Zelldichte der Kontrolle mit einem Wert von $1,33 \times 10^6$ Zellen/ml weiter ansteigt. Durch Stimulierung der THP-1 Monozyten mit Laktoterrin nimmt die Anzahl der Zellen nach 24 sowie nach 48 Stunden leicht zu und steigt nach 72 Stunden auf eine Zelldichte von $9,2 \times 10^5$ Zellen/ml an, bleibt aber stets deutlich unter dem Niveau der Kontrolle.

Zunächst wurde aufgrund dieser Ergebnisse darauf geschlossen, dass sowohl Laktoferrin als auch TGF- β 1 eine Wachstumshemmung der THP-1 Monozyten induzieren. Jedoch wurde im Verlauf dieses Versuches unter dem Mikroskop beobachtet, dass die Zellen sowohl unter dem Einfluss von Laktoferrin als auch von TGF- β 1 an die Oberfläche der 6-Well-Platte adhärieren, weshalb in weiterer Folge ein Adhäsionstest mittels Kristallviolett durchgeführt wurde.

4.4 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Adhärenz von THP-1 Zellen

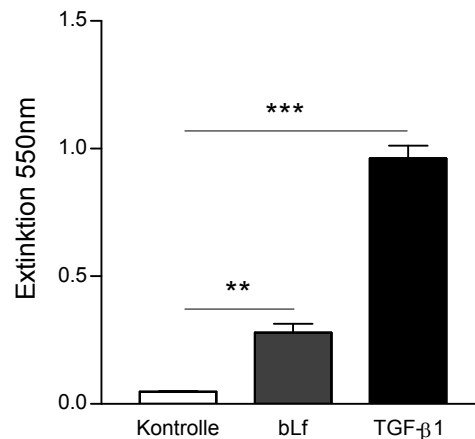


Abbildung 21: Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf das Adhärenzverhalten von THP-1 Monozyten.

Graphische Darstellung der photometrischen Messung der Kristallviolettfröbung bei 550nm nach 72-stündiger Inkubation mit bLF (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml). Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten nach Abzug des Leerwertes (1:1 Ethanol (50%) - Isopropanol (100%)) ($p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, die statistische Signifikanz gilt gegenüber der Kontrolle.

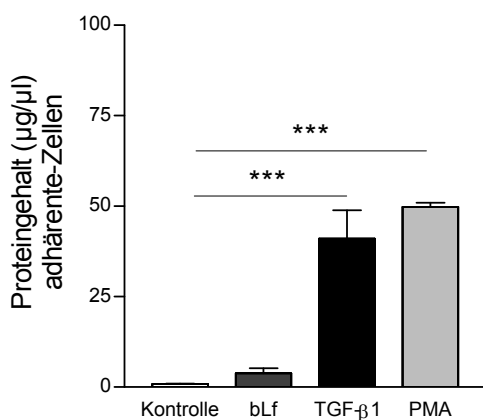
Die Kristallviolettfröbung zeigt den Einfluss von TGF- β 1 und Laktoferrin auf das Adhärenzverhalten der THP-1 Zellen nach einer Inkubation von 72 Stunden. Im Vergleich zur Kontrolle adhären die Zellen sowohl in Antwort auf Laktoferrin als auch auf TGF- β 1. Der Effekt von TGF- β 1 auf die Adhärenz der Zellen ist stärker ($p < 0,001$) als jener von Laktoferrin ($p < 0,01$).

Da die THP-1 Zellen gegenüber der Kontrolle sowohl durch Stimulierung mit TGF- β 1 als auch mit Laktoferrin adhärten, wurde nach der Kristallviolettfröbung ein Protein Assay durchgeführt, um das Verhältnis zwischen adhären THP-1 Zellen und THP-1 Zellen in Suspension zu ermitteln.

4.5 Protein Assay zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen suspendierten und adhärenen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA

Wie bereits unter Material und Methoden beschrieben, führt der Zusatz von PMA zu THP-1 Monozyten zu deren Differenzierung. Dies geht mit einer Veränderung von Morphologie und Funktion der THP-1 Zellen einher. Während THP-1 Monozyten in Suspension vorliegen bilden Makrophagen Ausläufer und adhären an Oberflächen. Wie im vorangegangenen Versuch dargestellt, induzierte der Zusatz von TGF- β 1 und Laktoferrin eine Veränderung des Adhärenzverhaltens der THP-1 Zellen. Bei dem Protein Assay wurden THP-1 Monozyten, neben Laktoferrin und TGF- β 1, zusätzlich mit PMA, als Positivkontrolle, inkubiert.

A



B

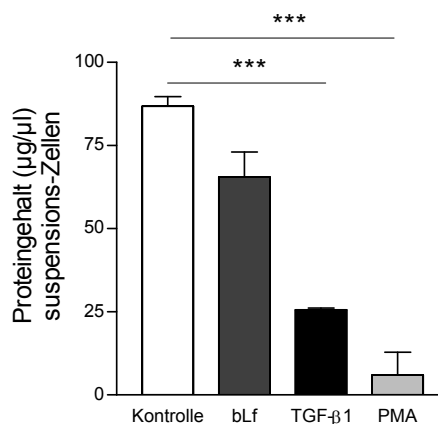


Abbildung 22: Protein Assay zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen suspendierten und adhärenen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA.

A: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung adhärenter THP-1 Zellen nach 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (50µg/ml), TGF- β 1 (1ng/ml) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (160nM).

B: Graphische Darstellung der Proteinbestimmung von THP-1 Zellen in Suspension nach 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (50µg/ml), TGF- β 1 (1ng/ml) und PMA (160nM).

Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten ($p < 0,001$: ***). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test, die statistische Signifikanz gilt gegenüber der Kontrolle.

Die graphische Darstellung des Protein Assays zeigt das Verhältnis zwischen adhärenenten THP-1 Zellen und THP-1 Zellen in Suspension, nach Stimulierung mit Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA. Gegenüber der Kontrolle induziert die Stimulierung mit Laktoferrin die Adhärenz von THP-1 Zellen. Allerdings liegt, im Vergleich zu den mit PMA behandelten Zellen, der Großteil der Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Laktoferrin noch in Suspension vor. Im Gegensatz dazu zeigen THP-1 Zellen die mit TGF- β 1 behandelt wurden ein vergleichbares Adhärenzverhalten mit den mit PMA stimulierten Zellen.

Da der Gesamtproteingehalt der mit Laktoferrin und TGF- β 1 inkubierten Zellen das Kontrollniveau nicht erreicht, wurde in weiterer Folge der Einfluss von TGF- β 1 und Laktoferrin auf die Expression des Protoonkogens c-Myc, mittels RT-PCR, untersucht. Eine verminderte Expression von c-Myc geht mit der Stilllegung des Zellzyklus in der G₁-Phase einher und deutet auf eine Wachstumshemmung hin [ROUSSEL et al., 1991].

4.5.1 Effekt von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die c-Myc mRNA Expression in THP-1 Monozyten unter Beteiligung von SB-431542

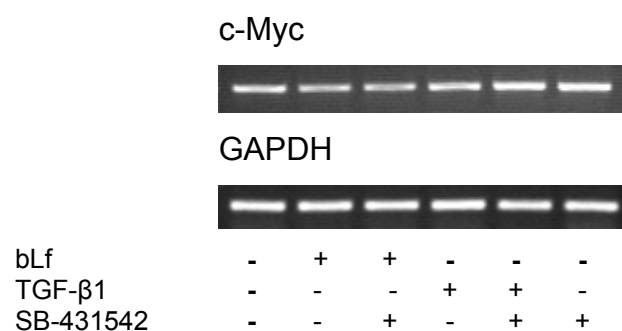


Abbildung 23: Repräsentative Abbildung des RT-PCR Signals der relativen c-Myc Stimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit bLf (50 μ g/ml) sowie TGF- β 1 (1ng/ml) und 4,5 stündiger Inkubation mit SB-431542 (10 μ M). GAPDH wurde als housekeeping-Gen verwendet.

Das oben dargestellte Resultat der RT-PCR Analyse zeigt, dass weder TGF- β 1 noch Laktoferrin die Expression von c-Myc im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst. Demnach ist die geringere Anzahl an THP-1 Zellen mit der Induktion der Differenzierung zu adhärenenten Zellen zu assoziieren.

4.6 Morphologischer Vergleich von THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA

Wie in den vorangegangenen Versuchen beschrieben, induzierte der Zusatz von TGF- β 1 und Laktoferrin die Adhärenz von THP-1 Zellen. Um den Einfluss von TGF- β 1 und Laktoferrin auf die Morphologie der THP-1 zu untersuchen, wurden die Zellen abermals inkubiert und mikroskopisch dargestellt.

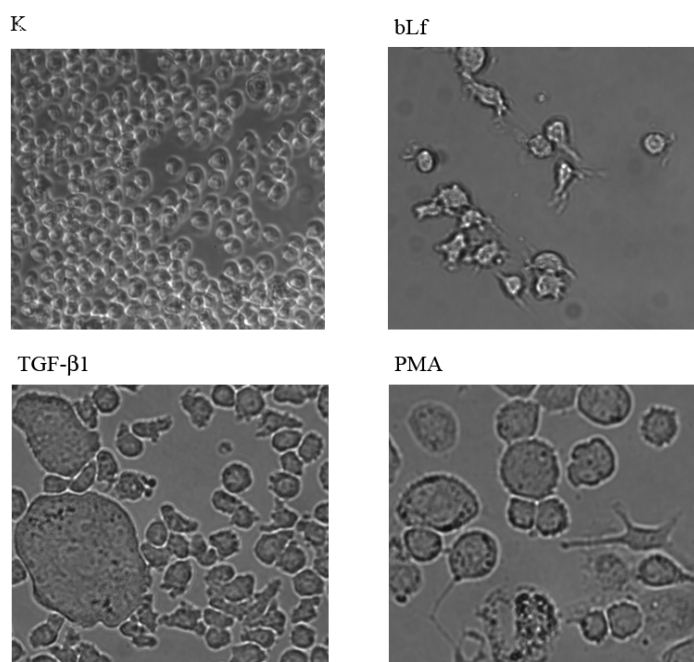


Abbildung 24: Mikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen in 40-facher Vergrößerung nach 72-stündiger Inkubation mit bLf (50 μ g/ml) und TGF- β 1 (1ng/ml), sowie differenzierter THP-1 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit PMA (160nM) als Positivkontrolle.

Wie die mikroskopische Darstellung zeigt, bilden einige THP-1 Zellen nach Inkubation mit Laktoferrin Ausläufer und die Zellkörper unterscheiden sich in ihrer Form, wenn auch in geringem Ausmaß, von den Kontrollzellen. Die Stimulierung mit TGF- β 1 führt, verglichen mit den Kontrollzellen, zu einer dramatischen Änderung der Zellmorphologie. Die Zellen zeigen eine Volumenvergrößerung, fusionieren zu mehrkernigen 'Riesenzellen' und legen die runde Form der Monozyten teilweise ab. Im Vergleich zu den, in Antwort auf

PMA, differenzierten Zellen, zeigt die Behandlung mit TGF- β 1 ähnliche Einflüsse auf die Morphologie, da die differenzierten Zellen ebenfalls in ihrem Volumen vergrößert und zu mehrkernigen Zellen fusioniert sind. Die Stimulierung der Zellen mit Laktoferrin führt nicht zu diesen Effekten, aber die mit PMA behandelten Zellen bilden charakteristische Ausläufer, was auch, wie bereits oben beschrieben, unter dem Einfluss von Laktoferrin induziert wird.

4.7 Zellproliferationsassay zur Bestimmung der Anzahl an viablen THP-1 Zellen nach Stimulierung mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl an viablen THP-1 Zellen mit dem CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay bestimmt. Bei dieser colorimetrischen Methode entspricht die Extinktion bei 490nm direkt proportional der Anzahl an lebenden Zellen. Darüber hinaus hat diese Methode den Vorteil, dass suspendierte und adhärenente Zellen gleichzeitig bestimmt werden können.

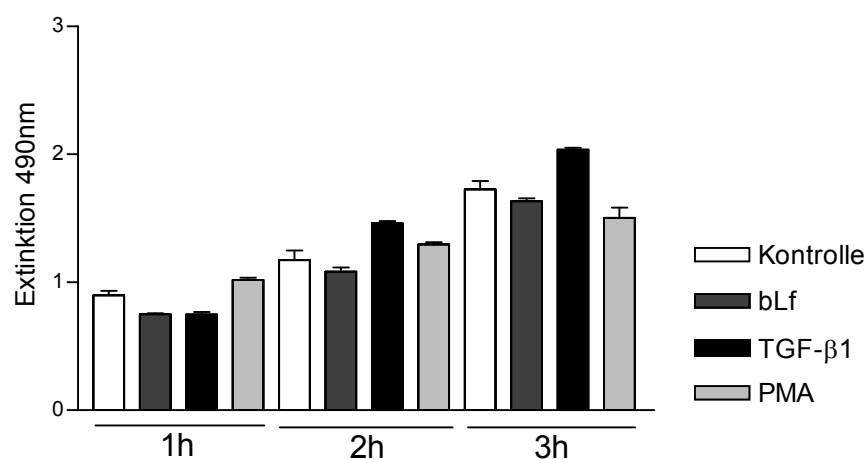


Abbildung 25: Zellproliferationsassay zur Bestimmung der Anzahl an viablen THP-1 Zellen. Graphische Darstellung des Zellproliferationsassays nach 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (50 μ g/ml), TGF- β 1 (1ng/ml) und PMA (160nm). Die photometrische Messung der Extinktion bei 490nm erfolgte nach 1-, 2- und 3-stündiger Zugabe von CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Die Mittelwerte (+/- SD) sind von drei unabhängigen Experimenten, die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Wie die graphische Darstellung des Zellproliferationsassays zeigt, liegt die Anzahl an viablen THP-1 Zellen welche mit Laktoferrin stimuliert wurden stets unter dem Kontrollniveau. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit TGF- β 1 zu einem leichten Anstieg an viablen Zellen gegenüber der Kontrolle, was auf eine Wachstumsförderung der THP-1 Zellen in Antwort auf TGF- β 1 hindeutet. Allerdings sind die Effekte, sowohl von Laktoferrin als auch von TGF- β 1, auf die Viabilität der THP-1 Zellen vernachlässigbar gering, sodass die beiden Stimuli im Endeffekt keinen Einfluss auf das Wachstum der THP-1 Zellen zeigen.

4.8 Einfluss von bovinem Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in THP-1 Zellen

In weiterer Folge wurde der Einfluss von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 ermittelt. Um die Aktivität der Gelatinasen zu untersuchen wurden undifferenzierte THP-1 Zellen 72 Stunden mit bovinem Laktoferrin, TGF- β 1 und PMA inkubiert, die Zellüberstände wurden entnommen und zur Durchführung der Gelatinezymogramme eingesetzt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen der aktiven und der pro-Form von MMPs.

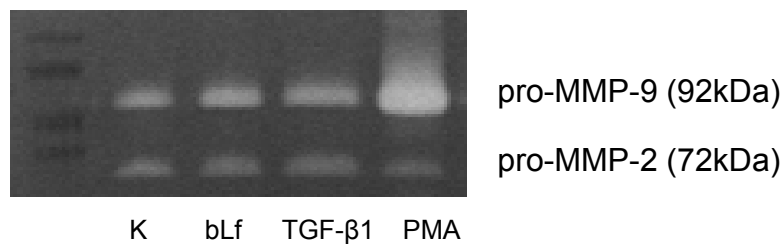


Abbildung 26: Repräsentative Abbildung des Gelatinezymogrammes von pro-MMP-9 und pro-MMP-2 nach 72-stündiger Inkubation von THP-1 Monozyten mit bLf (50 μ g/ml), TGF- β 1 (1ng/ml) und PMA (160nM).

Wie die repräsentative Abbildung des Gelatinezymogrammes zeigt, ist eine Aktivität von pro-MMP-9 und -2 in allen Proben vorhanden und es kam zu keiner Aktivierung der Zymogene. Sowohl Laktoferrin als auch TGF- β 1 zeigen gegenüber der Kontrolle keinen Einfluss auf die Aktivität der Gelatinasen. Im Gegensatz dazu führt die Stimulierung mit PMA zu einer erhöhten Aktivität von pro-MMP-9.

MMP-9 wird während der Differenzierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen verstärkt exprimiert und gilt als Differenzierungsmarker [WORLEY et al., 2003]. Da die Aktivität von MMP-9, verglichen mit den PMA behandelten Zellen, weder durch TGF- β 1, noch durch Laktoferrin beeinflusst wird, kann angenommen werden, dass die Wachstumsfaktoren zwar die Adhärenz der THP-1 Zellen fördern, nicht aber deren Differenzierung induzieren. Diese Annahme ist allerdings durch genauere Analysen auf die Expression von Differenzierungsmarkern zu bestätigen.

5 DISKUSSION

Laktoferrin vermittelt über die Signalisierung durch MAPKs einige seiner physiologischen Funktionen. Beispielsweise wird durch das Binden an LRP-1 und der nachfolgenden Aktivierung von ERK1/2 der mitogene Effekt von Laktoferrin in Osteoblasten vermittelt [GREY et al., 2004], in Fibroblasten und T-Lymphozyten induziert Laktoferrin über p38 die Expression von MMP-1 [OH et al., 2001]. TGF- β 1 kann die Aktivierung von MAPK Signalwegen smadabhängig und -unabhängig induzieren [DERYNCK und ZHANG, 2003].

Übereinstimmend mit Western Blot Analysen vorangegangener Arbeiten [BADRNYA, 2009] führt die vierstündige Inkubation mit TGF- β 1 und bovinem Laktoferrin zu einer Erhöhung von aktiviertem p38. Eine Zunahme des Aktivierungszustandes von pERK1/2 erfolgte in Antwort auf TGF- β 1, nicht aber auf Laktoferrin, was im Widerspruch zu vorangegangenen Ergebnissen steht [BADRNYA, 2009], und möglicherweise auf eine Änderung der Antwortfähigkeit der THP-1 Monozyten gegenüber Laktoferrin hindeutet.

Die Relevanz der Phosphorylierung von p38 sowie die Effizienz von SB202190, als spezifischer Inhibitor von p38, konnte bei den durchgeführten Western Blot Analysen nicht bestimmt werden. SB202190 bindet sowohl an die aktive als auch an die inaktive Form von p38, es ist daher notwendig die Aktivität der downstream Kinase MAPKAP2 zu ermitteln [FRANTZ et al., 1998], diese war in den THP-1 Monozyten jedoch nicht detektierbar.

Die Inkubation mit SB202190 führte zur Phosphorylierung von ERK1/2. Hirosawa et al. beschreiben die Aktivierung von ERK1/2 durch SB202190 als einen seiner zentralen Effekte. Sie geben als IC_{50} Werte von 50 und 100 nM an, diese Werte liegen weit unterhalb der Konzentration bei der die Aktivierung von ERK1/2 beobachtet wird ($\geq 1,3\mu M$) [HIROSAWA et al., 2009]. In der hier präsentierten Arbeit wurde eine Konzentration des SB202190 Inhibitors von $1,2\mu M$ angewendet, gewählt nach in der Literatur häufig angewandten Konzentrationen. Da diese Konzentration bei zahlreichen anderen Studien zu erfolgreichen Ergebnissen führte und, wie bereits erwähnt, die Effektivität des Inhibitors nicht überprüfbar war, kann die Eignung der eingesetzten

Konzentration nicht in Frage gestellt werden. Eine Möglichkeit wäre, wie Bain et al. bei der Erforschung physiologischer Funktionen von MAPKinasen empfehlen, zusätzlich zu SB202190 weitere spezifische Inhibitoren, wie BIRB 0796, einzusetzen [BAIN et al., 2007].

Durch den Einsatz von U0126, als selektiver Inhibitor von MEK1/2, wurden jegliche Signale von aktiviertem ERK1/2 effektiv ausgeschaltet. Jedoch führte die Inkubation mit U0126 zur Phosphorylierung von p38, was auf eine problematische Selektivität hindeutet.

Der klassische TGF- β /Smad Pathway kann auch in Antwort auf Laktoferrin aktiviert werden und wurde beispielsweise mit dem antiproliferativen Effekt von Laktoferrin in HeLa Zellen in Verbindung gebracht [ZEMANN et al., 2010]. Western Blot Analysen zur Akkumulation von Smad2 im Zellkern von THP-1 Monozyten zeigten eine zweieinhalbfache Steigerung der Smad2 Translokation nach einstündiger Inkubation mit Laktoferrin, und eine zweifache Steigerung in Antwort auf TGF- β 1. Diese Ergebnisse stimmen auch mit vorangegangenen Arbeiten überein [SCHELCH, 2008]. Sowohl der Effekt von Laktoferrin als auch von TGF- β 1 auf die erhöhte Smad2 Akkumulation im Zellkern wurde durch den Einsatz von SB-431542, als selektiver Inhibitor von T β R-I, vollständig rückgängig gemacht.

Da THP-1 Monozyten TGF- β 1 exprimieren [BADRNYA, 2009] und die proteolytische Spaltung der häufigste zelluläre Mechanismus der Aktivierung von latentem TGF- β 1 ist [ANNES et al., 2003], besteht die Möglichkeit, dass Laktoferrin aufgrund seiner Proteaseaktivität [HENDRIXSON et al., 2003] die Aktivierung von TGF- β 1 induziert, was wiederum die Aktivierung des Smad Pathways in Antwort auf Laktoferrin erklären könnte. Anhand von ELISAs wurde gezeigt, dass Laktoferrin nach einstündiger Inkubation latentes TGF- β 1 in geringem Ausmaß aktiviert, dieser Effekt war nach vierstündiger Inkubation nicht mehr zu beobachten [PRÖPPER, 2008]. Die Fragen, ob diese minimale Aktivierung von latentem TGF- β 1 ausschlaggebend für die Aktivierung des Smad Pathways sein kann und ob Laktoferrin in den THP-1 Monozyten eventuell die Expression von TGF- β 1 stimuliert, was ebenfalls für die

Aktivierung des Smad Pathways verantwortlich sein könnte, bleiben noch durch weitere Experimente zu klären.

PAI-1 gilt als klassisches Zielgen von TGF- β 1. In glatten Gefäßmuskelzellen reguliert TGF- β 1 die PAI-1 Expression über den Smad2/3 Pathway, zusätzlich wird die Signalisierung über Rho/ROCK mit der Aktivierung von ERK1/2 in Verbindung gebracht und als wichtiger Aspekt der TGF- β 1 stimulierten Regulation der PAI-1 mRNA Expression beschrieben [SAMARAKOON and HIGGINS, 2008]. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die PAI-1 Expression in Antwort auf TGF- β 1 über den p38 und MEK-ERK Pathway stimuliert wird [WOODWARD et al., 2006]. Um die Relevanz der laktoferrininduzierten Aktivierung des p38 und Smad Pathways zu untersuchen, und um die in einer vorangegangenen Arbeit entstandene Annahme, dass sowohl TGF- β 1 als auch Laktoferrin die PAI-1 Expression in THP-1 Monozyten über den MAPK Pathway, smadunabhängig, regulieren [BADRNYA, 2009] zu bestätigen, wurden PCR Analysen auf die Stimulierung der PAI-1 mRNA Expression durchgeführt. Diese zeigten eine vierfache Steigerung der PAI-1 mRNA Expression, induziert durch Laktoferrin, sowie eine dreieinhalbfache Steigerung in Antwort auf TGF- β 1. Da sowohl durch Inkubation mit SB202190 als auch mit U0126 die Stimulierung der PAI-1 mRNA Expression nicht verhindert werden konnte ist es unwahrscheinlich, dass Laktoferrin und TGF- β 1 PAI-1 in THP-1 Monozyten über den MAPK Pathway aktivieren. Im Gegensatz dazu wurde jeglicher Effekt auf die PAI-1 Stimulierung durch Inkubation mit SB-431542 vollständig rückgängig gemacht. Aufgrund dieses Resultats kann darauf geschlossen werden, dass die Expression der PAI-1 mRNA in THP-1 Monozyten sowohl in Antwort auf Laktoferrin als auch auf TGF- β 1 über den Smad2 Pathway stimuliert wird.

Es ist bekannt, dass Laktoferrin und TGF- β 1 aufgrund ihrer zytokinartigen Eigenschaften die Wachstumsrate verschiedener Zelltypen beeinflussen. Laktoferrin übt in Brust- und Halskrebszellen wachstumshemmende Effekte aus [DAMIENS et al., 1999; XIAO et al., 2004], wirkt stimulierend auf die

Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten [CORNISH et al., 2004] und hat mitogene Effekte auf B- und T-Lymphozyten [MAZURIER et al., 1989; HASHIZUME et al., 1983]. Während TGF- β 1 inhibierend auf das Wachstum der meisten Zelltypen wirkt, werden beispielsweise Fibroblasten und Mesenchymzellen in ihrem Wachstum durch Stimulierung mit TGF- β 1 angeregt [BATTEGAY et al., 1990; KHERA und CHANG, 2003]. In vitro ist die Antwort von Zellen auf wachstumshemmende oder -fördernde Eigenschaften von TGF- β 1 nicht nur abhängig von Zelltyp und Differenzierungsgrad, sondern auch von den Kulturbedingungen [NEWMANN, 1990].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf das Wachstum von monozytären THP-1 Zellen zeigten einen steten Anstieg der Anzahl an Suspensionszellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Laktoferrin, das Level blieb aber deutlich unter dem Kontrollniveau ($p < 0,001$ nach 72h). Im Verlauf dieses Experiments konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass einige Zellen adhärten. Bereits 1981 wurde gezeigt, dass Laktoferrin die Adhärenz von polymorphonukleären Leukozyten an endotheliale Monolayer fördert [OSEAS et al., 1981]. Die Änderung des Adhärenzverhaltens der THP-1 Zellen in Antwort auf Laktoferrin wurde anhand einer anschließenden Kristallviolett-färbung ($p < 0,01$) und eines Protein Assays von suspendierten und adhären Zellen bestätigt. Dieses Ergebnis und die beobachteten morphologischen Veränderungen, welche durch 72-stündige Behandlung der Zellen mit Laktoferrin hervorgerufen wurden, stehen in Kontrast zu einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe, bei der nach fünftägiger Inkubation mit Laktoferrin, in der selben Konzentration, weder ein Einfluss auf das Adhärenzverhalten noch auf die Morphologie der monozytären THP-1 Zellen festgestellt werden konnte [PRÖPPER, 2008]. Allerdings wurden die hier präsentierten Experimente mit neu erhaltenen Zellen durchgeführt, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

Die Inkubation mit TGF- β 1 führte nach 72 Stunden zu keiner Veränderung der Suspensionszellichte gegenüber der Ausgangszellichte. Es ist bekannt, dass TGF- β 1 morphologische Veränderungen von THP-1 Monozyten hervorruft und

ihre Adhärenz induziert [BOMBARA and IGNOTZ, 1992]. In vitro kann durch Behandlung monozytärer THP-1 Zellen mit PMA deren Differenzierung zu Makrophagen induziert werden [AUWERX, 1991]. Diese unterscheiden sich morphologisch von Monozyten und weisen ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten auf. Sowohl bei den Ergebnissen der Protein Assays als auch bei den beobachteten morphologischen Veränderungen zeigte TGF- β 1 ähnliche Effekte wie PMA.

Um zu erforschen über welchen Mechanismus Laktoferrin die Adhäsion der THP-1 Zellen fördert, wären weitere Untersuchungen notwendig. In einer vorangegangenen Arbeit konnte in Antwort auf TGF- β 1, nach 24-stündiger Inkubation, die Stimulierung von Fibronectin, welches an der Zelladhäsion beteiligt ist [HYNES und YAMADA, 1982], auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden, jedoch nicht in Antwort auf Laktoferrin [PRÖPPER, 2008]. Da die in dieser Arbeit beobachtete Induktion der Zelladhäsion nach 72-stündiger Inkubation mit Laktoferrin und TGF- β 1 erfolgte, wäre es interessant, die Induktion der Fibronectin mRNA Expression nach der entsprechenden Inkubationszeit zu untersuchen. β -Catenin ist an der Zelladhäsion über die Interaktion mit Cadherinen beteiligt und wird in Abhängigkeit der Zelladhäsion exprimiert [THIELE et al., 2001]. Es wurde gezeigt, dass β -Catenin sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten THP-1 Zellen exprimiert wird [BADRNYA, 2009]. Ob Laktoferrin einen Einfluss auf die Expression von β -Catenin ausübt, wäre ein weiterer Anhaltspunkt um die Veränderung des Adhäsionsverhaltens zu untersuchen.

Durch Inkubation mit Laktoferrin und TGF- β 1 blieb der Gesamtproteingehalt von suspendierten und adhärennten Zellen nach 72 Stunden unterhalb des Kontrollniveaus. TGF- β 1 vermittelt die Hemmung des Zellwachstums unter anderem durch eine gesenkte Expression des Protoonkogens c-Myc [WARNER et al., 1999]. Auf transkriptioneller Ebene konnte kein Einfluss von TGF- β 1 und Laktoferrin auf die Expression von c-Myc detektiert werden. Allerdings wurde dieses Experiment nach nur vierstündiger Inkubation durchgeführt. Jedoch wurde in einer vorangegangenen Arbeit, nach 24-stündiger Inkubation, ebenfalls

kein Effekt auf eine veränderte Expression der c-Myc mRNA festgestellt [PRÖPPER, 2008]. Ebenfalls in Übereinstimmung mit vorangegangenen Beobachtungen [PRÖPPER, 2008] konnte anhand der anschließenden Viabilitätsbestimmung bestätigt werden, dass Laktoferrin und TGF- β 1 keinen wachstumshemmenden Einfluss auf die THP-1 Zellen haben.

Durch chemotaktische Signale, Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen kommt es während inflammatorischen Prozessen zur Migration und Ansammlung von Monozyten und Makrophagen in entzündetem Gewebe. Zell-Zell sowie Zell-Matrix Interaktionen werden durch die Expression von Adhäsionsmolekülen gewährleistet. TGF- β 1 vermittelt die Migration von Monozyten nicht nur aufgrund chemotaktischer Eigenschaften, sondern auch durch Stimulierung der Monozyten MMP-2 und MMP-9 zu sezernieren, zusätzlich fördert das Zytokin durch Induktion der Expression von Integrinen und Fibronectinrezeptoren die Zelladhäsion [WAHL et al., 1993]. Die Makrophagendifferenzierung ist mit einer erhöhten MMP-9 Expression verbunden, welche wiederum mit der Fibronectin vermittelten Zelladhäsion assoziiert wird [XIE et al., 1998a].

Analysen auf die Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 zeigten weder eine Aktivierung der Zymogene noch einen Effekt auf deren Aktivität in Antwort auf Laktoferrin und TGF- β 1. Mit undifferenzierten THP-1 Zellen wurden bereits die selben Resultate erzielt, wohingegen bei differenzierten Zellen auch aktiviertes MMP-2 vorlag [SCHELCH, 2008]. Die durch PMA differenzierten Zellen zeigten eine erhöhte Aktivität von pro-MMP-9 gegenüber Laktoferrin und TGF- β 1. Somit ist anzunehmen, dass Laktoferrin und TGF- β 1 zwar die Adhärenz der THP-1 Zellen fördern, aber deren Differenzierung zu Makrophagen nicht induzieren. Da Karzinomzellen während der Tumorprogression die Antwortfähigkeit auf TGF- β 1 vermittelte Effekte teilweise verlieren [NICOLAS und HILL, 2003] und bei keiner der vorangegangenen Arbeiten die Induktion der Adhärenz der THP-1 Zellen in Antwort auf Laktoferrin und TGF- β 1 beobachtet wurde [SCHELCH, 2008; PRÖPPER, 2008], wäre es trotzdem interessant weitere Analysen auf die Expression von Differenzierungsmarkern durchzuführen. Die gesteigerte Expression von MMP-

9, LRP-1, CD-36 sowie Endoglin, welche als Differenzierungsmarker für Makrophagen gelten [XIE et al., 1998b; WATANABE et al., 1994; HUH et al., 1996; O'CONNELL et al., 1992], konnte während des Differenzierungsverlaufes der THP-1 Monozyten zu Makrophagen nachgewiesen werden [BADRNYA, 2009]. Nach 24-stündiger Inkubation konnten keine Effekte von Laktoferrin und TGF- β 1 auf die Expression der oben genannten Differenzierungsmarker festgestellt werden [PRÖPPER, 2008]. Wie bereits erwähnt, wurde bei dieser Arbeit auch keine Änderung des Adhärenzverhaltens der Zellen beobachtet [PRÖPPER, 2008] und es wäre abermals notwendig, die Experimente nach einer 72-stündigen Inkubation durchzuführen und eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit zu überprüfen.

Im Ganzen zeigen die Resultate der hier präsentierten Arbeit, dass Laktoferrin in THP-1 Monozyten PAI-1 auf transkriptioneller Ebene über den Smad2 Pathway stimuliert und die Adhärenz der Zellen induziert. Eine vermehrte Expression von PAI-1 ist mit der Hemmung der Degradation von Molekülen der EZM verbunden [THALACKER und NILSEN-HAMILTON, 1986], was für die Förderung der Zelladhäsion in Antwort auf Laktoferrin spricht. Dass Laktoferrin eventuell die Differenzierung monozytärer THP-1 Zellen in Richtung Makrophagen fördert, konnte nicht bestätigt werden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass Laktoferrin die Reifung der Monozyten zu dendritischen Zellen fördert, was durch Analysen auf die Expression der Reifungsmarker CD80, CD83, CD86 und HLA II (human leucocyte antigen class II) oder von Chemokinrezeptoren untersucht werden könnte. Die Eigenschaft von Laktoferrin die Reifung von dendritischen Zellen zu fördern konnte bereits gezeigt werden [SPADARO et al., 2008]. Diese Studie führte auch zu der Annahme, dass der p38, nicht aber der ERK1/2 Pathway an diesem Effekt beteiligt ist, was in der hier präsentierten Arbeit für die Möglichkeit der Differenzierung zu dendritischen Zellen spricht, da in Antwort auf Laktoferrin der p38 Pathway aktiviert wurde.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das eisenbindende Glykoprotein Laktoferrin sowie das pleiotrope Zytokin TGF- β 1 sind in immunmodulatorische Prozesse involviert und an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt. In den letzten Jahren konnte unsere Arbeitsgruppe teilweise vergleichbare Effekte der beiden multifunktionellen Proteine auf die Aktivierung von Signalwegen und auf die Expression ausgewählter Gene anhand verschiedener Zelllinien nachweisen. Der exakte Mechanismus, über welche Signalwege die laktoferrininduzierte Aktivierung von Zielgenen reguliert wird, blieb dabei weitgehend unerforscht. Aus diesen Arbeiten entstand die Annahme, dass Laktoferrin und TGF- β 1 in THP-1 Monozyten die PAI-1 mRNA Expression über den p38 oder ERK1/2 MAPK Pathway, smadunabhängig, stimulieren. Unter Anwendung spezifischer Inhibitoren der genannten Signalwege wurde es in dieser Arbeit möglich, die Kenntnis der Spezifität und der physiologischen Bedeutung zu erhellen. Laktoferrin und TGF- β 1 sind an der Regulation der Immunantwort beteiligt und interagieren mit Zellen des Immunsystems, was die physiologische Relevanz der monozytären humanen leukämischen Zelllinie THP-1 als Zellmodell aufzeigt.

TGF- β 1 induzierte sowohl die Aktivierung von p38 als auch von ERK1/2, während in Antwort auf Laktoferrin lediglich die Aktivierung von p38 erfolgte. Die Relevanz der Aktivierung von p38 konnte nicht bestimmt werden, da die Aktivität der downstream Kinase MAPKAP2 nicht detektierbar war. Die erhöhte Expression der PAI-1 mRNA, nach Stimulierung mit Laktoferrin und TGF- β 1, konnte durch Einsatz der MAPK Inhibitoren nicht verhindert werden. Somit ist es unwahrscheinlich, dass PAI-1 in monozytären THP-1 Zellen in Antwort auf Laktoferrin und TGF- β 1 über den MAPK Signalweg stimuliert wird. Durch anschließende Untersuchungen zur Akkumulation von Smad2 im Zellkern konnte gezeigt werden, dass die Laktoferrin und TGF- β 1 induzierte PAI-1 Expression durch SB-431542, als spezifischer Inhibitor von T β R-I, vollständig rückgängig gemacht wird. Aufgrund dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen

werden, dass sowohl Laktoferrin als auch TGF- β 1 die PAI-1 mRNA Expression in THP-1 Monozyten über den Smad2 Pathway stimulieren.

Bei Untersuchungen des Einflusses der beiden Stimuli auf das Wachstum der THP-1 Zellen, schienen Laktoferrin und TGF- β 1 zunächst das Wachstum der monozytären THP-1 Zellen zu hemmen. Jedoch wurde mikroskopisch eine Veränderung der Morphologie und die Induktion der Adhärenz beobachtet. TGF- β 1 zeigte eine vergleichbare Induktion der Adhärenz mit PMA, dem Standard-differenzierungsmittel, während die mit Laktoferrin behandelten Zellen in sehr viel geringerem Ausmaß adhärten. Anhand eines Zellproliferationsassays, zur Bestimmung der Gesamtanzahl von viablen, suspendierten und adhären THP-1 Zellen konnten keine wachstumshemmenden Effekte von Laktoferrin und TGF- β 1 beobachtet werden. Die Aktivität von Differenzierungsmarkern wie MMP-2 und MMP-9 wurde weder von Laktoferrin noch von TGF- β 1 beeinflusst, während Zellen die durch Stimulierung mit PMA differenzierten im Zymogramm eine erhöhte Aktivität von pro-MMP-9 zeigten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Laktoferrin und TGF- β 1 zwar die Adhärenz der Zellen fördern, nicht aber die vollständige Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen induzieren. Dazu wäre von Interesse, weitere Differenzierungsmarker zu analysieren um die Details der Steuerung der Differenzierung zu erhellen.

7 ABSTRACT

Lactoferrin, an iron-binding glycoprotein, as well as the pleiotropic cytokine TGF- β 1 is involved in the regulation of multitudinous physiological processes. In the recent years our laboratory could detect partially super imposable effects of the two multifunctional proteins on the activation of signaling pathways and the expression of selected target genes in different cell lines. The exact mechanism how lactoferrin induces gene expression largely rested unexplored. This work ties up a previous one where the assumption arised that lactoferrin and TGF- β 1 stimulate the PAI-1 mRNA expression in THP-1 monocytes, Smad-independent, via the p38 or ERK1/2 MAPK signaling pathway. To confirm this, western blot and PCR analysis presented in this work were carried out utilising specific inhibitors of these signaling pathways. Of physiological relevance is the human monocytic leukemic cell line THP-1 as cell model as Lactoferrin and TGF- β 1 are involved in the regulation of immune responses and interact with immune cells.

TGF- β 1 induced both, the activation of p38 and ERK1/2, whereas the activation of p38 only could be detected in response to lactoferrin. The relevance of the activation of p38 could not be determined, because the activity of the downstream kinase MAPKAP2 was not detectable. Increased expression of PAI-1 mRNA, after stimulation with TGF- β 1 and lactoferrin, could not be prevented by MAPK inhibitor treatment. Hence it is unlikely that in THP-1 monocytes, PAI-1 is stimulated in response to lactoferrin and TGF- β 1 via the MAPK signaling pathway. Subsequent analysis determining the accumulation of Smad2 in the nucleus showed that the lactoferrin and TGF- β 1 induced PAI-1 mRNA Expression was reversed completely with SB-431542, a specific inhibitor of T β R-I. Based on these results it can be concluded that in THP-1 monocytes both, lactoferrin and TGF- β 1, stimulate PAI-1 expression via the Smad2 pathway.

Examination of the influence of lactoferrin and TGF- β 1 on the growth of monocytic THP-1 cells initially led to the assumption that they induced an

inhibitory effect on cell growth. However morphology changes and induction of adherence was observed microscopically, this was confirmed by subsequent experiments. TGF- β 1 showed a similar induction of adhesion with PMA, whereas lactoferrin-treated cells adhered in a much lower extent. A cell proliferation assay, determining the number of viable suspension and adherent THP-1 cells, showed no growth-inhibitory effects of lactoferrin and TGF- β 1. Activity of MMP-2 and MMP-9 was neither affected by lactoferrin nor by TGF- β 1. Since differentiated cells treated with PMA featured increased activity of pro-MMP-9, it can be suggested that lactoferrin and TGF- β 1 promote adherence of THP-1 cells but do not induce the entire differentiation of monocytes into macrophages. The details of regulatory mechanisms of this partial differentiation have yet to be elucidated by further analysis of alternative differentiation markers.

V LITERATURVERZEICHNIS

- AKHURST R J and BALMAIN A. Genetic Events and the Role of Tgf β in Epithelial Tumour Progression. *The Journal of Pathology* 1999; 1 (187): 82-90.
- ALEXANDROW M G and MOSES H L. Transforming Growth Factor Beta and Cell Cycle Regulation. *Cancer Research* 1995; 7 (55): 1452-57.
- ANDERSON B F, BAKER H M, DODSON E J, NORRIS G E, RUMBALL S V, WATERS J M and BAKER E N. Structure of Human Lactoferrin at 3.2- $\text{\AA}$ Resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 7 (84): 1769-73.
- ANNES J P, MUNGER J S and RIFKIN D B. Making Sense of Latent TGF-Beta Activation. *J Cell Sci* 2003; 2 (116): 217-224.
- APPELMELK B J, AN Y Q, GEERTS M, THIJS B G, DE BOER H A, MACLAREN D M, DE GRAAFF J and NUIJENS J H. Lactoferrin Is a Lipid α -Binding Protein. *Infect. Immun.* 1994; 6 (62): 2628-32.
- ARTYM J, ZIMECKI M, PAPROCKA M and KRUZEL M L. Orally Administered Lactoferrin Restores Humoral Immune Response in Immunocompromised Mice. *Immunology Letters* 2003; 1 (89): 9-15.
- ASHCROFT G S. Bidirectional Regulation of Macrophage Function by Tgf-[Beta]. *Microbes and Infection* 1999; 15 (1): 1275-82.
- ASHORN R G, ESKOLA J, TUOHIMAA P J and KROHN K J. Effect of the Progesterone-Inducible Proteins Human Lactoferrin and Chicken Avidin on Lymphocyte Proliferation. *Human Reproduction* 1986; 3 (1): 149-151.
- ASSOIAN R K, KOMORIYA A, MEYERS C A, MILLER D M and SPORN M B. Transforming Growth Factor-Beta in Human Platelets. Identification of a Major Storage Site, Purification, and Characterization. *Journal of Biological Chemistry* 1983; 11 (258): 7155-60.
- ATTISANO L, CÁRCAMO J, VENTURA F, WEIS F M B, MASSAGUÉ J and WRANA J L. Identification of Human Activin and Tgf[Beta] Type I Receptors That Form Heteromeric Kinase Complexes with Type II Receptors. *Cell* 1993; 4 (75): 671-680.

- AUWERX J. The Human Leukemia Cell Line, Thp-1: A Multifaceted Model for the Study of Monocyte-Macrophage Differentiation. *Experientia* 1991; 1 (47): 22-31.
- BADRNYA S. Zytokinartige Wirkung von Laktoferrin in verschiedenen Differenzierungsstadien von Caco-2 und THP-1 Zellen. 2009.
- BAIN J, PLATER L, ELLIOTT M, SHPIRO N, HASTIE C J, MCLAUCHLAN H, KLEVERNIC I, ARTHUR J S, ALESSI D R and COHEN P. The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update. *The Biochemical journal* 2007; 3 (408): 297-315.
- BAKER E. Lactoferrin: A Multi-Tasking Protein Par Excellence. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 22 (62): 2529-30.
- BAKER E A, BERGIN F G and LEAPER D J. Plasminogen Activator System, Vascular Endothelial Growth Factor, and Colorectal Cancer Progression. *Molecular Pathology* 2000; 6 (53): 307-312.
- BAKER E N. Structure and Reactivity of Transferrins. *Advances in Inorganic Chemistry*, Academic Press 1994; Volume 41: 389-63.
- BAKER E N and BAKER H M. A Structural Framework for Understanding the Multifunctional Character of Lactoferrin. *Biochimie* 2009; 1 (91): 3-10.
- BALDWIN D A, JENNY E R and AISEN P. The Effect of Human Serum Transferrin and Milk Lactoferrin on Hydroxyl Radical Formation from Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 21 (259): 13391-94.
- BARMINA O Y, WALLING H W, FIACCO G J, FREIJE J M P, LÓPEZ-OTÍN C, JEFFREY J J and PARTRIDGE N C. Collagenase-3 Binds to a Specific Receptor and Requires the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein for Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 42 (274): 30087-93.
- BASSOLS A and MASSAGUÉ J. Transforming Growth Factor Beta Regulates the Expression and Structure of Extracellular Matrix Chondroitin/Dermatan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 6 (263): 3039-45.
- BATTEGAY E J, RAINES E W, SEIFERT R A, BOWEN-POPE D F and ROSS R. Tgf-Beta Induces Bimodal Proliferation of Connective Tissue Cells Via Complex Control of an Autocrine Pdgf Loop. *Cell* 1990; 3 (63): 515-24.

- BAVEYE S, ELASS E, MAZURIER J and LEGRAND D. Lactoferrin Inhibits the Binding of Lipopolysaccharides to -Selectin and Subsequent Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils. *FEBS Letters* 2000; 1 (469): 5-8.
- BAVEYE S, ELASS E, MAZURIER J L, SPIK G V and LEGRAND D. Lactoferrin: A Multifunctional Glycoprotein Involved in the Modulation of the Inflammatory Process. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1999; 3 (37): 281-86.
- BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K, WAKABAYASHI H, KAWASE K and TOMITA M. Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1992; 1-2 (1121): 130-36.
- BENNETT R M and KOKOCINSKI T. Lactoferrin Content of Peripheral Blood Cells. *British Journal of Haematology* 1978; 4 (39): 509-21.
- BLOBE G C, SCHIEMANN W P and LODISH H F. Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Disease. *New England Journal of Medicine* 2000; 18 (342): 1350-58.
- BOMBARA C and IGNOTZ R A. Tgf-Beta Inhibits Proliferation of and Promotes Differentiation of Human Promonocytic Leukemia Cells. *Journal of cellular physiology* 1992; 1 (153): 30-7.
- BONACCI G R, CÁCERES L C, SÁNCHEZ M C and CHIABRANDO G A. Activated [Alpha]2-Macroglobulin Induces Cell Proliferation and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Lrp-1 in the J774 Macrophage-Derived Cell Line. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 1 (460): 100-6.
- BOSMA P J, VAN DEN BERG E A, KOOISTRA T, SIEMIENIAK D R and SLIGHTOM J L. Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene. Promoter and Structural Gene Nucleotide Sequences. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 19 (263): 9129-41.
- BOUCHER P and HERZ J. Signaling through Lrp1: Protection from Atherosclerosis and Beyond. *Biochemical Pharmacology* 2011; 1 (81): 1-5.
- BRANDL N K. New Receptor-Ligand Interactions in Chondrocyte Metabolism. 2005.

- BRITIGAN B E, LEWIS T S, WALDSCHMIDT M, MCCORMICK M L and KRIEG A M. Lactoferrin Binds Cpg-Containing Oligonucleotides and Inhibits Their Immunostimulatory Effects on Human B Cells. *The Journal of Immunology* 2001; 5 (167): 2921-28.
- BROWN J D, DICHIARA M R, ANDERSON K R, GIMBRONE M A and TOPPER J N. Mekk-1, a Component of the Stress (Stress-Activated Protein Kinase/C-Jun N-Terminal Kinase) Pathway, Can Selectively Activate Smad2-Mediated Transcriptional Activation in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 13 (274): 8797-805.
- BULLEN J J, ROGERS H J and LEIGH L. Iron-Binding Proteins in Milk and Resistance to Escherichia Coli Infection in Infants. *British Medical Journal* 1972; 5792 (1): 69-75.
- BUTLER G S and OVERALL C M. Updated Biological Roles for Matrix Metalloproteinases and New "Intracellular" Substrates Revealed by Degradomics. *Biochemistry* 2009; 46 (48): 10830-45.
- CAO C, LAWRENCE D A, LI Y, VON ARNIM C A F, HERZ J, SU E J, MAKAROVA A, HYMAN B T, STRICKLAND D K and ZHANG L. Endocytic Receptor Lrp Together with Tpa and Pai-1 Coordinates Mac-1-Dependent Macrophage Migration. *EMBO J* 2006; 9 (25): 1860-70.
- CHANG H, SHYU K G, LIN S, TSAI S C, WANG B W, LIU Y C, SUNG Y L and LEE C C. The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Is Induced by Cell Adhesion through the Mek/Erk Pathway. *Journal of biomedical science* 2003; 6 Pt 2 (10): 738-45.
- CHEIFETZ S, BASSOLS A, STANLEY K, OHTA M, GREENBERGER J and MASSAGUÉ J. Heterodimeric Transforming Growth Factor Beta. Biological Properties and Interaction with Three Types of Cell Surface Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 22 (263): 10783-89.
- CHEN C-L, LIU I H, FLIESLER S J, HAN X, HUANG S S and HUANG J S. Cholesterol Suppresses Cellular Tgf-Beta Responsiveness: Implications in Atherogenesis. *J Cell Sci* 2007; 20 (120): 3509-21.
- CIAMBRONE G J and MCKEOWN-LONGO P J. Plasminogen Activator Inhibitor Type I Stabilizes Vitronectin-Dependent Adhesions in Ht-1080 Cells. *The Journal of Cell Biology* 1990; 5 (111): 2183-95.

- CLAASSEN G F and HANN S R. A Role for Transcriptional Repression of P21cip1 by C-Myc in Overcoming Transforming Growth Factor Beta-Induced Cell-Cycle Arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 17 (97): 9498-503.
- CONNELLY O M. Antiinflammatory Activities of Lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 2001; 90005 (20): 389-95.
- CORNISH J, CALLON K E, NAOT D, PALMANO K P, BANOVIC T, BAVA U, WATSON M, LIN J-M, TONG P C, CHEN Q, CHAN V A, REID H E, FAZZALARI N, BAKER H M, BAKER E N, HAGGARTY N W, GREY A B and REID I R. Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. *Endocrinology* 2004; 9 (145): 4366-74.
- CZEKAY R-P, AERTGEERTS K, CURRIDEN S A and LOSKUTOFF D J. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Detaches Cells from Extracellular Matrices by Inactivating Integrins. *The Journal of Cell Biology* 2003; 5 (160): 781-91.
- DAMIENS E, EL YAZIDI I, MAZURIER J, DUTHILLE I, SPIK G and BOILLY-MARER Y. Lactoferrin Inhibits G1 Cyclin-Dependent Kinases During Growth Arrest of Human Breast Carcinoma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 3 (74): 486-98.
- DAMIENS E, EL YAZIDI I, MAZURIER J, ELASS-ROCHARD E, DUTHILLE I, SPIK G and BOILLY-MARER Y. Role of Heparan Sulphate Proteoglycans in the Regulation of Human Lactoferrin Binding and Activity in the Mda-Mb-231 Breast Cancer Cell Line. *European journal of cell biology* 1998; 4 (77): 344-51.
- DANG C V. C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 1 (19): 1-11.
- DATTO M B, HU P P, KOWALIK T F, YINGLING J and WANG X F. The Viral Oncoprotein E1a Blocks Transforming Growth Factor Beta- Mediated Induction of P21/Waf1/Cip1 and P15/Ink4b. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 4 (17): 2030-37.
- DATTO M B, LI Y, PANUS J F, HOWE D J, XIONG Y and WANG X F. Transforming Growth Factor Beta Induces the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21 through a P53-Independent Mechanism. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 1995; 12 (92): 5545-49.

DECLERCK P J, DE MOL M, ALESSI M C, BAUDNER S, PÂQUES E P, PREISSNER K T, MÜLLER-BERGHAUS G and 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). *Journal of Biological Chemistry* 1988; 30 (263): 15454-61.

DENG G, CURRIDEN S A, HU G, CZEKAY R-P and LOSKUTOFF D J. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Cell Adhesion by Binding to the Somatomedin B Domain of Vitronectin. *Journal of Cellular Physiology* 2001; 1 (189): 23-33.

DENNLER S, HUET S and GAUTHIER J M. A Short Amino-Acid Sequence in Mh1 Domain Is Responsible for Functional Differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene* 1999; 8 (18): 1643-48.

DERYNCK R, JARRETT J A, CHEN E Y, EATON D H, BELL J R, ASSOIAN R K, ROBERTS A B, SPORN M B and GOEDDEL D V. Human Transforming Growth Factor-Beta Complementary DNA Sequence and Expression in Normal and Transformed Cells. *Nature* 1985; 6030 (316): 701-05.

DERYNCK R, LINDQUIST P B, LEE A, WEN D, TAMM J, GRAYCAR J L, RHEE L, MASON A J, MILLER D A and COFFEY R J. A New Type of Transforming Growth Factor-Beta, Tgf-Beta 3. *EMBO Journal* 1988; 12 (7): 3737-43.

DERYNCK R and ZHANG Y E. Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in Tgf-[Beta] Family Signalling. *Nature* 2003; 6958 (425): 577-84.

DHENNIN-DUTHILLE I, MASSON M, DAMIENS E, FILLEBEEN C, SPIK G and MAZURIER J. Lactoferrin Upregulates the Expression of Cd4 Antigen through the Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase in the Human Lymphoblastic T Jurkat Cell Line. *Journal of Cellular Biochemistry* 2000; 4 (79): 583-93.

DUBOIS C M, LAPRISE M-H L N, BLANCHETTE F, GENTRY L E and LEDUC R. Processing of Transforming Growth Factor 1 Precursor by Human

- Furin Convertase. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 18 (270): 10618-24.
- DUNCIA J V, SANTELLA J B, HIGLEY C A, PITTS W J, WITYAK J, FRIETZE W E, RANKIN F W, SUN J-H, EARL R A, TABAKA A C, TELEHA C A, BLOM K F, FAVATA M F, MANOS E J, DAULERIO A J, STRADLEY D A, HORIUCHI K, COPELAND R A, SCHERLE P A, TRZASKOS J M, MAGOLDA R L, TRAINOR G L, WEXLER R R, HOBBS F W and OLSON R E. Mek Inhibitors: The Chemistry and Biological Activity of U0126, Its Analogs, and Cyclization Products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1998; 20 (8): 2839-44.
- EBISAWA T, FUKUCHI M, MURAKAMI G, CHIBA T, TANAKA K, IMAMURA T and MIYAZONO K. Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor-[Beta] Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 16 (276): 12477-80.
- EDWARDS D R, MURPHY G, REYNOLDS J J, WHITHAM S E, DOCHERTY A J, ANGEL P and HEATH J K. Transforming Growth Factor Beta Modulates the Expression of Collagenase and Metalloproteinase Inhibitor. *The EMBO journal* 1987; 7 (6): 1899-904.
- EGELUND R, RODENBURG K W, ANDREASEN P A, RASMUSSEN M S, GULDBERG R E and PETERSEN T E. An Ester Bond Linking a Fragment of a Serine Proteinase to Its Serpin Inhibitor. *Biochemistry* 1998; 18 (37): 6375-79.
- EISENMAN R N. Deconstructing Myc. *Genes & Development* 2001; 16 (15): 2023-30.
- ELLISON R T, GIEHL T J and LAFORCE F M. Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin. *Infect. Immun.* 1988; 11 (56): 2774-81.
- ELLISON R T, III, LAFORCE F M, GIEHL T J, BOOSE D S and DUNN B E. Lactoferrin and Transferrin Damage of the Gram-Negative Outer Membrane Is Modulated by Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Gen Microbiol* 1990; 7 (136): 1437-46.
- EMONARD H, BELLON G, TROEBERG L, BERTON A, ROBINET A, HENRIET P, MARBAIX E, KIRKEGAARD K, PATTHY L S, EECKHOUT Y, NAGASE H, HORNEBECK W and COURTOY P J. Low Density

- Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Endocytic Clearance of Pro-Mmp-2â·Timp-2 Complex through a Thrombospondin-Independent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 52 (279): 54944-51.
- ENAT R, JEFFERSON D M, RUIZ-OPAZO N, GATMAITAN Z, LEINWAND L A and REID L M. Hepatocyte Proliferation in Vitro: Its Dependence on the Use of Serum-Free Hormonally Defined Medium and Substrata of Extracellular Matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 5 (81): 1411-15.
- ENGEL M E, MCDONNELL M A, LAW B K and MOSES H L. Interdependent Smad and Jnk Signaling in Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 52 (274): 37413-20.
- FACCHINI L M and PENN L Z. The Molecular Role of Myc in Growth and Transformation: Recent Discoveries Lead to New Insights. *The FASEB Journal* 1998; 9 (12): 633-51.
- FAVATA M F, HORIUCHI K Y, MANOS E J, DAULERIO A J, STRADLEY D A, FEESER W S, VAN DYK D E, PITTS W J, EARL R A, HOBBS F, COPELAND R A, MAGOLDA R L, SCHERLE P A and TRZASKOS J M. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 29 (273): 18623-32.
- FENG X-H and DERYNCK R. Specificity and Versatility in Tgf-Brta Signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005; 1 (21): 659-93.
- FISCHER R, DEBBABI H, DUBARRY M, BOYAKA P and TOMÉ D. Regulation of Physiological and Pathological Th1 and Th2 Responses by Lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology* 2006; (84): 303-11.
- FLAUMENHAFT R, ABE M, SATO Y, MIYAZONO K, HARPEL J, HELDIN C H and RIFKIN D B. Role of the Latent Tgf-Beta Binding Protein in the Activation of Latent Tgf-Beta by Co-Cultures of Endothelial and Smooth Muscle Cells. *The Journal of Cell Biology* 1993; 4 (120): 995-1002.
- FRANTZ B, KLATT T, PANG M, PARSONS J, ROLANDO A, WILLIAMS H, TOCCI M J, O'KEEF S J and O'NEILL E A. The Activation State of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Determines the Efficiency of Atp Competition for Pyridinylimidazole Inhibitor Binding. *Biochemistry* 1998; 39 (37): 13846-53.

- FRANZÉN P, TEN DIJKE P, ICHIJO H, YAMASHITA H, SCHULZ P, HELDIN C-H and MIYAZONO K. Cloning of a Tgf[Beta] Type I Receptor That Forms a Heteromeric Complex with the Tgf[Beta] Type II Receptor. *Cell* 1993; 4 (75): 681-92.
- FUJITA K-I, MATSUDA E, SEKINE K, IIGO M and TSUDA H. Lactoferrin Enhances Fas Expression and Apoptosis in the Colon Mucosa of Azoxymethane-Treated Rats. *Carcinogenesis* 2004; 10 (25): 1961-66.
- FURMANSKI P, LI Z P, FORTUNA M B, SWAMY C V and DAS M R. Multiple Molecular Forms of Human Lactoferrin. Identification of a Class of Lactoferrins That Possess Ribonuclease Activity and Lack Iron-Binding Capacity. *The Journal of Experimental Medicine* 1989; 2 (170): 415-29.
- GABISON E E, HOANG-XUAN T, MAUVIEL A and MENASHI S. Emmprin/Cd147, an Mmp Modulator in Cancer, Development and Tissue Repair. *Biochimie* 2005; 3-4 SPEC. ISS. (87): 361-68.
- GIFFORD J, HUNTER H and VOGEL H. Lactoferricin: A Lactoferrin-Derived Peptide with Antimicrobial, Antiviral, Antitumor and Immunological Properties. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 22 (62): 2588-98.
- GINSBURG D, ZEHEB R, YANG A Y, RAFFERTY U M, ANDREASEN P A, NIELSEN L, DANO K, LEBOR V and GELEHRTER T D. Cdna Cloning of Human Plasminogen Activator-Inhibitor from Endothelial Cells. *The Journal of clinical investigation* 1986; 6 (78): 1673-80.
- GOUMANS M J, VALDIMARSDOTTIR G, ITOH S, ROSENDAHL A, SIDERAS P and TEN DIJKE P. Balancing the Activation State of the Endothelium Via Two Distinct Tgf-[Beta] Type I Receptors. *EMBO Journal* 2002; 7 (21): 1743-53.
- GREY A, BANOVIC T, ZHU Q, WATSON M, CALLON K, PALMANO K, ROSS J, NAOT D, REID I R and CORNISH J. The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Is a Mitogenic Receptor for Lactoferrin in Osteoblastic Cells. *Mol Endocrinol* 2004; 9 (18): 2268-78.
- GUILLEN C, MCINNIS I B, VAUGHAN D M, KOMMAJOSYULA S, VAN BERKEL P H, LEUNG B P, AGUILA A and BROCK J H. Enhanced Th1 Response to Staphylococcus Aureus Infection in Human Lactoferrin-Transgenic Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2002; 8 (168): 3950-57.

- HAHN-DANTONA E, RUIZ J F, BORNSTEIN P and STRICKLAND D K. The Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (Mmp-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 18 (276): 15498-503.
- HAN G, LU S L, LI A G, HE W, CORLESS C L, KULESZ-MARTIN M and WANG X J. Distinct Mechanisms of Tgf-Beta1-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis During Skin Carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005; 7 (115): 1714-23.
- HANAFUSA H, NINOMIYA-TSUJI J, MASUYAMA N, NISHITA M, FUJISAWA J-I, SHIBUYA H, MATSUMOTO K and NISHIDA E. Involvement of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Transforming Growth Factor-[Beta]-Induced Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 38 (274): 27161-67.
- HANAHAN D and WEINBERG R A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 1 (100): 57-70.
- HANNON G J and BEACH D. Pl5ink4b Is a Potential Effector of Tgf-[Beta]-Induced Cell Cycle Arrest. *Nature* 1994; 6494 (371): 257-61.
- HASHIZUME S, KURODA K and MURAKAMI H. Identification of Lactoferrin as an Essential Growth Factor for Human Lymphocytic Cell Lines in Serum-Free Medium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1983; 4 (763): 377-82.
- HÅVERSEN L, OHLSSON B G, HAHN-ZORIC M, HANSON L Å and MATTSBY-BALTZER I. Lactoferrin Down-Regulates the Lps-Induced Cytokine Production in Monocytic Cells Via Nf-[Kappa]B. *Cellular Immunology* 2002; 2 (220): 83-95.
- HAYASHI H, ABDOLLAH S, QIU Y, CAI J, XU Y Y, GRINNELL B W, RICHARDSON M A, TOPPER J N, GIMBRONE M A, WRANA J L and FALB D. The Mad-Related Protein Smad7 Associates with the Tgfbeta Receptor and Functions as an Antagonist of Tgfbeta Signaling. *Cell* 1997; 7 (89): 1165-73.
- HEKMAN C M and LOSKUTOFF D J. Endothelial Cells Produce a Latent Inhibitor of Plasminogen Activators That Can Be Activated by Denaturants. *Journal of Biological Chemistry* 1985; 21 (260): 11581-87.

- HEKMAN C M and LOSKUTOFF D J. Bovine Plasminogen Activator Inhibitor 1: Specificity Determinations and Comparison of the Active, Latent, and Guanidine-Activated Forms. *Biochemistry* 1988; 8 (27): 2911-18.
- HENDRIXSON D R, QIU J, SHEWRY S C, FINK D L, PETTY S, BAKER E N, PLAUT A G and ST. GEME J W. Human Milk Lactoferrin Is a Serine Protease That Cleaves Haemophilus Surface Proteins at Arginine-Rich Sites. *Molecular Microbiology* 2003; 3 (47): 607-17.
- HERZ J, KOWAL R C, GOLDSTEIN J L and BROWN M S (1990). Proteolytic Processing of the 600 Kd Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Lrp) Occurs in a Trans-Golgi Compartment. *The EMBO Journal* 1990; 9: 1769-76.
- HERZ J and STRICKLAND D K. Lrp: A Multifunctional Scavenger and Signaling Receptor. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 6 (108): 779-84.
- HIDALGO M and ECKHARDT S G. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 3 (93): 178-93.
- HIRANO K, MIKI Y, HIRAI Y, SATO R, ITOH T, HAYASHI A, YAMANAKA M, EDA S and BEPPU M. A Multifunctional Shuttling Protein Nucleolin Is a Macrophage Receptor for Apoptotic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 47 (280): 39284-93.
- HIROSAWA M, NAKAHARA M, OTOSAKA R, IMOTO A, OKAZAKI T and TAKAHASHI S. The P38 Pathway Inhibitor Sb202190 Activates Mek/Mapk to Stimulate the Growth of Leukemia Cells. *Leukemia research* 2009; 5 (33): 693-99.
- HOMMES D W, PEPPELENBOSCH M P and VAN DEVENTER S J H. Mitogen Activated Protein (Map) Kinase Signal Transduction Pathways and Novel Anti-Inflammatory Targets. *Gut* 2003; 1 (52): 144-51.
- HOVANESSIAN A G, PUVION-DUTILLEUL F, NISOLE S, SVAB J, PERRET E, DENG J-S and KRUST B. The Cell-Surface-Expressed Nucleolin Is Associated with the Actin Cytoskeleton. *Experimental Cell Research* 2000; 2 (261): 312-28.
- HUBER K, CHRIST G, WOJTA J and GULBA D. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Cardiovascular Disease: Status Report 2001. *Thrombosis Research* 2001; Supplement 1 (103): 7-19.

- HUBER R and CARRELL R W. Implications of the Three-Dimensional Structure of Alpha 1-Antitrypsin for Structure and Function of Serpins. *Biochemistry* 1989; 23 (28): 8951-66.
- HUH H Y, PEARCE S F, YESNER L M, SCHINDLER J L and SILVERSTEIN R L. Regulated Expression of Cd36 During Monocyte-to-Macrophage Differentiation: Potential Role of Cd36 in Foam Cell Formation. *Blood* 1996; 5 (87): 2020-28.
- HUSE M, MUIR T W, XU L, CHEN Y-G, KURIYAN J and MASSAGUÉ J. The Tgf[Beta] Receptor Activation Process: An Inhibitor- to Substrate-Binding Switch. *Molecular Cell* 2001; 3 (8): 671-82.
- HYNES R O and YAMADA K M. Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* 1982; 2 (95): 369-77.
- IGNOTZ R A and MASSAGUÉ J. Transforming Growth Factor-Beta Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 9 (261): 4337-45.
- INMAN G J, NICOLÁS F J, CALLAHAN J F, HARLING J D, GASTER L M, REITH A D, LAPING N J and HILL C S. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor-[Beta] Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (Alk) Receptors Alk4, Alk5, and Alk7. *Molecular Pharmacology* 2002a; 1 (62): 65-74.
- INMAN G J, NICOLÁS F J and HILL C S. Nucleocytoplasmic Shuttling of Smads 2, 3, and 4 Permits Sensing of Tgf-[Beta] Receptor Activity. *Molecular Cell* 2002b; 2 (10): 283-94.
- JAVELAUD D and MAUVIEL A. Crosstalk Mechanisms between the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Smad Signaling Downstream of Tgf-[Beta]: Implications for Carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 37 (24): 5742-50.
- JOHANSON B. Isolation of an Iron-Containing Red Protein from Human Milk. *Acta Chem. Scand.* 1960; 14: 510-12.
- JOHNSON G L and LAPADAT R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by Erk, Jnk, and P38 Protein Kinases. *Science* 2002; 5600 (298): 1911-12.

- KANG Y, CHEN C-R and MASSAGUÉ J. A Self-Enabling Tgf[Beta] Response Coupled to Stress Signaling: Smad Engages Stress Response Factor Atf3 for Id1 Repression in Epithelial Cells. *Molecular Cell* 2003; 4 (11): 915-26.
- KAVSAK P, RASMUSSEN R K, CAUSING C G, BONNI S, ZHU H, THOMSEN G H and WRANA J L. Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase That Targets the Tgf[Beta] Receptor for Degradation. *Molecular Cell* 2000; 6 (6): 1365-75.
- KHERA S and CHANG N S. Tiaf1 Participates in the Transforming Growth Factor Beta1-Mediated Growth Regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; (995): 11-21.
- KIBBEY M C, JOHNSON B, PETRYSHYN R, JUCKER M and KLEINMAN H K. A 110-Kd Nuclear Shuttling Protein, Nucleolin, Binds to the Neurite-Promoting Ikvav Site of Laminin-1. *Journal of Neuroscience Research* 1995; 3 (42): 314-22.
- KIM E K and CHOI E-J. Pathological Roles of Mapk Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2010; 4 (1802): 396-405.
- KOLI K, LOHI J, HAUTANEN A and KESKI-OJA J. Enhancement of Vitronectin Expression in Human Hepg2 Hepatoma Cells by Transforming Growth Factor-Beta 1. *European journal of biochemistry / FEBS* 1991; 2 (199): 337-45.
- KRETZSCHMAR M, DOODY J and MASSAGUÉ J. Opposing Bmp and Egf Signalling Pathways Converge on the Tgf-[Beta] Family Mediator Smad1. *Nature* 1997; 6651 (389): 618-22.
- KRETZSCHMAR M, DOODY J, TIMOKHINA I and MASSAGUÉ J. A Mechanism of Repression of Tgf[Beta]/ Smad Signaling by Oncogenic Ras. *Genes & Development* 1999; 7 (13): 804-16.
- KRUTHOF E K. Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Expression by Inflammatory Mediators and Statins. *Thrombosis and haemostasis* 2008; 6 (100): 969-75.
- KUHARA T, IIGO M, ITOH T, USHIDA Y, SEKINE K, TERADA N, OKAMURA H and TSUDA H. Orally Administered Lactoferrin Exerts an Antimetastatic

Effect and Enhances Production of Il-18 in the Intestinal Epithelium.

Nutrition and Cancer 2000; 2 (38): 192-99.

KUTZ S M, HORDINES J, MCKEOWN-LONGO P J and HIGGINS P J. Tgf-
{Beta}1-Induced Pai-1 Gene Expression Requires Mek Activity and Cell-
to-Substrate Adhesion. J Cell Sci 2001; 21 (114): 3905-14.

KYRIAKIS J M and AVRUCH J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase
Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation.
Physiological Reviews 2001; 2 (81): 807-69.

LAIHO M and KESKI-OJA J. Growth Factors in the Regulation of Pericellular
Proteolysis: A Review. Cancer Research 1989; 10 (49): 2533-53.

LAIHO M, SAKSELA O, ANDREASEN P A and KESKI-OJA J. Enhanced
Production and Extracellular Deposition of the Endothelial-Type
Plasminogen Activator Inhibitor in Cultured Human Lung Fibroblasts by
Transforming Growth Factor-Beta. The Journal of Cell Biology 1986; 6
(103): 2403-10.

LAMBERS J W, CAMMENG M, KÖNIG B W, MERTENS K, PANNEKOEK H
and VAN MOURIK J A. Activation of Human Endothelial Cell-Type
Plasminogen Activator Inhibitor (Pai-1) by Negatively Charged
Phospholipids. Journal of Biological Chemistry 1987; 36 (262): 17492-96.

LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M and MAZURIER J. Interactions of
Lactoferrin with Cells Involved in Immune Function. Biochem Cell Biol
2006; 3 (84): 282-90.

LEGRAND D, VAN BERKEL P H, SALMON V, VAN VEEN H A, SLOMIANNY
M C, NUIJENS J H and SPIK G. The N-Terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of
Human Lactoferrin Interact with Sulphated Molecules but Not with the
Receptor Present on Jurkat Human Lymphoblastic T-Cells. Biochem. J.
1997; 3 (327): 841-46.

LEGRAND D, VIGIÉ K, SAID E A, ELASS E, MASSON M, SLOMIANNY M-C,
CARPENTIER M, BRIAND J-P, MAZURIER J and HOVANESSIAN A G.
Surface Nucleolin Participates in Both the Binding and Endocytosis of
Lactoferrin in Target Cells. European Journal of Biochemistry 2004; 2
(271): 303-17.

LETTERIO J J and ROBERTS A B. Regulation of Immune Responses by Tgf-
Beta. Annual Review of Immunology 1998; 1 (16): 137-61.

- LEVAY P F and VILJOEN M. Lactoferrin: A General Review. *Haematologica* 1995; 3 (80): 252-67.
- LEVIN E G and SANTELL L. Conversion of the Active to Latent Plasminogen Activator Inhibitor from Human Endothelial Cells. *Blood* 1987; 4 (70): 1090-98.
- LI M O, WAN Y Y, SANJABI S, ROBERTSON A-K L and FLAVELL R A. Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 2006; 1 (24): 99-146.
- LIJNEN H R. Pleiotropic Functions of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 1 (3): 35-45.
- LINDAHL T L, SIGURDARDOTTIR O and WIMAN B. Stability of Plasminogen Activator Inhibitor 1 (Pai-1). *Thrombosis and Haemostasis* 1989; 2 (62): 748-51.
- LO R S and MASSAGUE J. Ubiquitin-Dependent Degradation of Tgf-[Bgr]-Activated Smad2. *Nat Cell Biol* 1999; 8 (1): 472-78.
- MAACKS S, YUAN H-Z and WOOD W G. Development and Evaluation of Luminescence-Based Sandwich Assay for Plasma Lactoferrin as a Marker for Sepsis and Bacterial Infections in Paediatric Medicine. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 1989; 4 (3): 221-26.
- MANN D M, ROMM E and MIGLIORINI M. Delineation of the Glycosaminoglycan-Binding Site in the Human Inflammatory Response Protein Lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 38 (269): 23661-67.
- MASSAGUE J. How Cells Read Tgf-Beta Signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 3 (1): 169-78.
- MASSAGUÉ J. The Transforming Growth Factor-Beta Family. *Annual Review of Cell Biology* 1990; 1 (6): 597-641.
- MASSAGUÉ J. Tgf-B Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* 1998; 1 (67): 753-91.
- MASSAGUÉ J, BLAIN S W and LO R S. Tgf-B Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell* 2000; 2 (103): 295-309.
- MASSAGUÉ J and GOMIS R R. The Logic of TGF-Beta Signaling. *FEBS Letters* 2006; 12 (580): 2811-20.

- MASSON P L, HEREMANS J F, PRIGNOT J J and WAUTERS G.
Immunohistochemical Localization and Bacteriostatic Properties of an
Iron-Binding Protein from Bronchial Mucus. *Thorax* 1966; 6 (21): 538-44.
- MASSON P L, HEREMANS J F and SCHONNE E. Lactoferrin, an Iron-Binding
Protein in Neutrophilic Leukocytes. *The Journal of Experimental
Medicine* 1969; 3 (130): 643-58.
- MASSOVA I, KOTRA L P, FRIDMAN R and MOBASHERY S. Matrix
Metalloproteinases: Structures, Evolution, and Diversification. *The
FASEB Journal* 1998; 12 (12): 1075-95.
- MAZURIER J, LEGRAND D, HU W L, MONTREUIL J and SPIK G. Expression
of Human Lactotransferrin Receptors in Phytohemagglutinin-Stimulated
Human Peripheral Blood Lymphocytes. Isolation of the Receptors by
Antiligand-Affinity Chromatography. *European journal of biochemistry /
FEBS* 1989; 2 (179): 481-87.
- MAZURIER J and SPIK G. Comparative Study of the Iron-Binding Properties of
Human Transferrins: I. Complete and Sequential Iron Saturation and
Desaturation of the Lactotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta
(BBA) - General Subjects* 1980; 2 (629): 399-408.
- METZ-BOUTIGUE M-H, JOLLÈS J, MAZURIER J, SCHOENTGEN F,
LEGRAND D, SPIK G, MONTREUIL J and JOLLÈS P. Human
Lactotransferrin: Amino Acid Sequence and Structural Comparisons with
Other Transferrins. *European Journal of Biochemistry* 1984; 3 (145):
659-76.
- MIYAZONO K. Positive and Negative Regulation of Tgf-Beta Signaling. *J Cell
Sci* 2000; 7 (113): 1101-9.
- MIYAZONO K, OLOFSSON A, COLOSETTI P and HELDIN C H. A Role of the
Latent Tgf-Beta 1-Binding Protein in the Assembly and Secretion of Tgf-
Beta 1. *The EMBO journal* 1991; 5 (10): 1091-101.
- MU X-C, STAIANO-COICO L and HIGGINS P J. Increased Transcription and
Modified Growth State-Dependent Expression of the Plasminogen
Activator Inhibitor Type-1 Gene Characterize the Senescent Phenotype
in Human Diploid Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 1998; 1
(174): 90-98.

- NAGASE H and WOESSNER J F. Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 31 (274): 21491-94.
- NEELS J G, VAN DEN BERG B M M, LOOKENE A, OLIVECRONA G, PANNEKOEK H and VAN ZONNEVELD A-J. The Second and Fourth Cluster of Class a Cysteine-Rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Share Ligand-Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 44 (274): 31305-11.
- NEWMAN M J. Inhibition of Carcinoma and Melanoma Cell Growth by Type 1 Transforming Growth Factor Beta Is Dependent on the Presence of Polyunsaturated Fatty Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 14 (87): 5543-47.
- NICOLAS F J and HILL C S. Attenuation of the Tgf-Beta-Smad Signaling Pathway in Pancreatic Tumor Cells Confers Resistance to Tgf-Beta-Induced Growth Arrest. *Oncogene* 2003; 24 (22): 3698-711.
- NODA M, YOON K, PRINCE C W, BUTLER W T and RODAN G A. Transcriptional Regulation of Osteopontin Production in Rat Osteosarcoma Cells by Type Beta Transforming Growth Factor. *The Journal of biological chemistry* 1988; 27 (263): 13916-21.
- NORTON J D. Id Helix-Loop-Helix Proteins in Cell Growth, Differentiation and Tumorigenesis. *J Cell Sci* 2000; 22 (113): 3897-905.
- O'CONNELL P J, MCKENZIE A, FISICARO N, ROCKMAN S P, PEARSE M J and D'APICE A J. Endoglin: A 180-Kd Endothelial Cell and Macrophage Restricted Differentiation Molecule. *Clinical and experimental immunology* 1992; 1 (90): 154-59.
- OFT M, HEIDER K-H and BEUG H. Tgf[Beta] Signaling Is Necessary for Carcinoma Cell Invasiveness and Metastasis. *Current Biology* 1998; 23 (8): 1243-52.
- OH S-M, HAHM D H, KIM I-H and CHOI S-Y. Human Neutrophil Lactoferrin Trans-Activates the Matrix Metalloproteinase 1 Gene through Stress-Activated Mapk Signaling Modules. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 45 (276): 42575-79.
- OH S-M, PYO C-W, KIM Y and CHOI S-Y. Neutrophil Lactoferrin Upregulates the Human P53 Gene through Induction of Nf-[Kappa]B Activation Cascade. *Oncogene* 2004; 50 (23): 8282-91.

- OKADOME T, YAMASHITA H, FRANZÉN P, MORÉN A, HELDIN C H and MIYAZONO K. Distinct Roles of the Intracellular Domains of Transforming Growth Factor-Beta Type I and Type II Receptors in Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269 (269): 30753-56.
- OSEAS R, YANG H H, BAEHNER R L and BOXER L A. Lactoferrin: A Promoter of Polymorphonuclear Leukocyte Adhesiveness. *Blood* 1981; 57 (57): 939-45.
- OVERALL C M, WRANA J L and SODEK J. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of 72-Kda Gelatinase/Type IV Collagenase by Transforming Growth Factor-Beta 1 in Human Fibroblasts. Comparisons with Collagenase and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266 (266): 14064-71.
- PADUA D and MASSAGUE J. Roles of Tgf[Beta] in Metastasis. *Cell Res* 2009; 19 (19): 89-102.
- PARDALI K, KURISAKI A, MORÉN A, TEN DIJKE P, KARDASSIS D and MOUSTAKAS A. Role of Smad Proteins and Transcription Factor Sp1 in P21waf1/Cip1 Regulation by Transforming Growth Factor-Beta. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (275): 29244-56.
- PASTERNAK B and ASPENBERG P. Metalloproteinases and Their Inhibitorsdiagnostic and Therapeutic Opportunities in Orthopedics. *Acta Orthopaedica* 2009; 78 (80): 693-703.
- PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU B-E, KARANDIKAR M, BERMAN K and COBB M H. Mitogen-Activated Protein (Map) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr Rev* 2001; 22 (22): 153-83.
- PELTON R W, SAXENA B, JONES M, MOSES H L and GOLD L I. Immunohistochemical Localization of Tgf Beta 1, Tgf Beta 2, and Tgf Beta 3 in the Mouse Embryo: Expression Patterns Suggest Multiple Roles During Embryonic Development. *The Journal of Cell Biology* 1991; 115 (115): 1091-105.
- PERERA M, TSANG C S, DISTEL R J, LACY J N, OHNO-MACHADO L, RICCHIUTI V, SAMARANAYAKE L P, SMEJKAL G B, SMITH M G, TRACHTENBERG A J and KUO W P. Tgf-Beta1 Interactome: Metastasis and Beyond. *Cancer Genomics - Proteomics* 2010; 7 (7): 217-29.

- PESSAH M, MARAIS J, PRUNIER C L, FERRAND N, LALLEMAND F O, MAUVIEL A and ATFI A. C-Jun Associates with the Oncoprotein Ski and Suppresses Smad2 Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 32 (277): 29094-100.
- PRÖPPER K. Physiologische Relevanz der Laktoferrin-induzierten Signaltransduktion in THP-1 zellen. 2008.
- PUDDU P, VALENTI P and GESSANI S. Immunomodulatory Effects of Lactoferrin on Antigen Presenting Cells. *Biochimie* 2009; 1 (91): 11-18.
- RAVICHANDRAN V, JENSEN P N and MAJOR E O. Mek1/2 Inhibitors Block Basal and Transforming Growth Factor {Beta}1-Stimulated Jc Virus Multiplication. *J. Virol.* 2007; 12 (81): 6412-18.
- REIBMAN J, MEIXLER S, LEE T C, GOLD L I, CRONSTEIN B N, HAINES K A, KOLASINSKI S L and WEISSMANN G. Transforming Growth Factor Beta 1, a Potent Chemoattractant for Human Neutrophils, Bypasses Classic Signal-Transduction Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 15 (88): 6805-9.
- REISSMANN E, JORNVALL H, BLOKZIJL A, ANDERSSON O, CHANG C, MINCHIOTTI G, PERSICO M G, IBANEZ C F and BRIVANLOU A H. The Orphan Receptor Alk7 and the Activin Receptor Alk4 Mediate Signaling by Nodal Proteins During Vertebrate Development. *Genes & development* 2001; 15 (15): 2010-22.
- REYNISDÓTTIR I, POLYAK K, IAVARONE A and MASSAGUÉ J. Kip/Cip and Ink4 Cdk Inhibitors Cooperate to Induce Cell Cycle Arrest in Response to Tgf-Beta. *Genes & Development* 1995; 15 (9): 1831-45.
- RICH J N, ZHANG M, DATTO M B, BIGNER D D and WANG X-F. Transforming Growth Factor-Beta-Mediated P15ink4b induction and Growth Inhibition in Astrocytes Is Smad3-Dependent and a Pathway Prominently Altered in Human Glioma Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 49 (274): 35053-58.
- RICHIE E R, HILLIARD J K, GILMORE R and GILLESPIE D J. Human Milk-Derived Lactoferrin Inhibits Mitogen and Alloantigen Induced Human Lymphocyte Proliferation. *Journal of Reproductive Immunology* 1987; 2 (12): 137-48.

- ROSS S and HILL C S. How the Smads Regulate Transcription. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2008; 3 (40): 383-408.
- ROUSSEL M F, CLEVELAND J L, SHURTLEFF S A and SHERR C J. Myc Rescue of a Mutant Csf-1 Receptor Impaired in Mitogenic Signalling. Nature 1991; 6342 (353): 361-63.
- RYAN M P and HIGGINS P J. Growth State-Regulated Expression of P52(Pai-1) in Normal Rat Kidney Cells. Journal of cellular physiology 1993; 2 (155): 376-84.
- RYAN M P and HIGGINS P J. Control of P52(Pai-1) Gene Expression in Normal and Transformed Rat Kidney Cells: Relationship between P52(Pai-1) Induction and Actin Cytoarchitecture. Advances in experimental medicine and biology 1994; (358): 215-30.
- SAMARAKOON R and HIGGINS P J. Integration of Non-Smad and Smad Signaling in Tgf-Beta1-Induced Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. Thrombosis and haemostasis 2008; 6 (100): 976-83.
- SANO Y, HARADA J, TASHIRO S, GOTOH-MANDEVILLE R, MAEKAWA T and ISHII S. Atf-2 Is a Common Nuclear Target of Smad and Tak1 Pathways in Transforming Growth Factor-Beta Signaling. Journal of Biological Chemistry 1999; 13 (274): 8949-57.
- SCHAEFFER H J and WEBER M J. Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. Mol. Cell. Biol. 1999; 4 (19): 2435-44.
- SCHÄFER C and WILLIAMS J A. Stress Kinases and Heat Shock Proteins in the Pancreas: Possible Roles in Normal Function and Disease. Journal of gastroenterology 2000; 1 (35): 1-9.
- SCHELCH S. Signaltransduktion und Genexpression in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 unter dem Einfluss von TGF- β und Laktoferrin. 2008.
- SCHMIERER B and HILL C S. TGF-Beta-Smad Signal Transduction: Molecular Specificity and Functional Flexibility. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 12 (8): 970-82.

- SCHUSTER N and KRIEGLSTEIN K. Mechanisms of Tgf- β -Mediated Apoptosis. *Cell and Tissue Research* 2002; 1 (307): 1-14.
- SHERR C J. Cancer Cell Cycles. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 273 (5674): 1672-77.
- SHI Y and MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF-Beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 2003; 6 (113): 685-700.
- SHIMIZU K, MATSUZAWA H, OKADA K, TAZUME S, DOSAKO S, KAWASAKI Y, HASHIMOTO K and KOGA Y. Lactoferrin-Mediated Protection of the Host from Murine Cytomegalovirus Infection by a T-Cell-Dependent Augmentation of Natural Killer Cell Activity. *Archives of Virology* 1996; 10 (141): 1875-89.
- SIEGEL P M and MASSAGUE J. Cytostatic and Apoptotic Actions of Tgf-[Beta] in Homeostasis and Cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 11 (3): 807-20.
- SINGH P K, PARSEK M R, GREENBERG E P and WELSH M J. A Component of Innate Immunity Prevents Bacterial Biofilm Development. *Nature* 2002; 417 (6988): 552-55.
- SORIMACHI K, AKIMOTO K, HATTORI Y, IEIRI T and NIWA A. Activation of Macrophages by Lactoferrin: Secretion of Tnf- α , Il-8 and No. *IUBMB Life* 1997; 1 (43): 79-87.
- SPADARO M, CAORSI C, CERUTI P, VARADHACHARY A, FORNI G, PERICLE F and GIOVARELLI M. Lactoferrin, a Major Defense Protein of Innate Immunity, Is a Novel Maturation Factor for Human Dendritic Cells. *The FASEB Journal* 2008; 8 (22): 2747-57.
- SPORN M B and ROBERTS A B. Transforming Growth Factor-Beta: Recent Progress and New Challenges. *The Journal of Cell Biology* 1992; 5 (119): 1017-21.
- SRIVASTAVA M and POLLARD H B. Molecular Dissection of Nucleolin's Role in Growth and Cell Proliferation: New Insights. *The FASEB Journal* 1999; 14 (13): 1911-22.
- SUZUKI Y A and LÖNNERDAL B. Characterization of Mammalian Receptors for Lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology* 2002; (80): 75-80.
- TAKAYAMA Y and MIZUMACHI K. Inhibitory Effect of Lactoferrin on Hypertrophic Differentiation of Atdc5 Mouse Chondroprogenitor Cells. *BioMetals* 2010; 3 (23): 477-84.

- TAKAYAMA Y, TAKAHASHI H, MIZUMACHI K and TAKEZAWA T. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Lrp) Is Required for Lactoferrin-Enhanced Collagen Gel Contractile Activity of Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (278): 22112-18.
- TAYLOR A W. Review of the Activation of Tgf-Beta in Immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 1 (85): 29-33.
- TEN DIJKE P and ARTHUR H M. Extracellular Control of Tgf[Beta] Signalling in Vascular Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 11 (8): 857-69.
- TENG C T, BEARD C and GLADWELL W. Differential Expression and Estrogen Response of Lactoferrin Gene in the Female Reproductive Tract of Mouse, Rat, and Hamster. *Biology of Reproduction* 2002; 5 (67): 1439-49.
- THALACKER F W and 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. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262 (262): 2283-90.
- THIELE A, WASNER M, MULLER C, ENGELAND K and HAUSCHILDT S. Regulation and Possible Function of Beta-Catenin in Human Monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2001; 167 (167): 6786-93.
- TSUCHIYA S, KOBAYASHI Y, GOTO Y, OKUMURA H, NAKAE S, KONNO T and TADA K. Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer research* 1982; 42 (42): 1530-36.
- TSUCHIYA S, YAMABE M, YAMAGUCHI Y, KOBAYASHI Y, KONNO T and TADA K. Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (Thp-1). *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1980; 26 (26): 171-76.
- TSUKAZAKI T, CHIANG T A, DAVISON A F, ATTISANO L and WRANA J L. Sara, a Fyve Domain Protein That Recruits Smad2 to the Tgf[Beta] Receptor. *Cell* 1998; 95 (95): 779-91.
- TURLEY J M, FALK L A, RUSCETTI F W, KASPER J J, FRANCOMANO T, FU T, BANG O S and BIRCHENALL-ROBERTS M C. Transforming Growth

- Factor Beta 1 Functions in Monocytic Differentiation of Hematopoietic Cells through Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Cell Growth & Differentiation* 1996; 11 (7): 1535-44.
- VAN DER GEER P. Phosphorylation of Lrp1: Regulation of Transport and Signal Transduction. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002; 4 (12): 160-65.
- VAN DER STRATE B W A, BELJAARS L, MOLEMA G, HARMSSEN M C and MEIJER D K F. Antiviral Activities of Lactoferrin. *Antiviral Research* 2001; 3 (52): 225-39.
- VISSE R and NAGASE H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003; 8 (92): 827-39.
- VIVIEN D, ATTISANO L, WRANA J L and MASSAGUÉ J. Signaling Activity of Homologous and Heterologous Transforming Growth Factor- β Receptor Kinase Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (270): 7134-41.
- WAHL S M, ALLEN J B, WEEKS B S, WONG H L and KLOTMAN P E. Transforming Growth Factor β Enhances Integrin Expression and Type IV Collagenase Secretion in Human Monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90 (90): 4577-81.
- WAHL S M, HUNT D A, WAKEFIELD L M, MCCARTNEY-FRANCIS N, WAHL L M, ROBERTS A B and SPORN M B. Transforming Growth Factor Type β Induces Monocyte Chemotaxis and Growth Factor Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84 (84): 5788-92.
- WAKABAYASHI H. Lactoferricin Derived from Milk Protein Lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design* 2003; (9): 1277-87.
- WANG W-P, IIGO M, SATO J, SEKINE K, ADACHI I and TSUDA H. Activation of Intestinal Mucosal Immunity in Tumor-Bearing Mice by Lactoferrin. *Cancer Science* 2000; 91 (91): 1022-27.
- WARD P, PAZ E and CONNEELY O. Multifunctional Roles of Lactoferrin: A Critical Overview. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62 (62): 2540-48.

- WARD P P and CONNEELY O M. Lactoferrin: Role in Iron Homeostasis and Host Defense against Microbial Infection. *BioMetals* 2004; 3 (17): 203-8.
- WARNER B J, BLAIN S W, SEOANE J and MASSAGUE J. Myc Downregulation by Transforming Growth Factor Beta Required for Activation of the P15ink4b G1 Arrest Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 9 (19): 5913-22.
- WATANABE Y, INABA T, SHIMANO H, GOTODA T, YAMAMOTO K, MOKUNO H, SATO H, YAZAKI Y and YAMADA N. Induction of Ldl Receptor-Related Protein During the Differentiation of Monocyte-Macrophages. Possible Involvement in the Atherosclerotic Process. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association* 1994; 6 (14): 1000-6.
- WEINBERG R A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* 1995; 3 (81): 323-30.
- WESTERMARCK J, HOLMSTRÖM T, AHONEN M, ERIKSSON J E and KÄHÄRI V-M. Enhancement of Fibroblast Collagenase-1 (Mmp-1) Gene Expression by Tumor Promoter Okadaic Acid Is Mediated by Stress-Activated Protein Kinases Jun N-Terminal Kinase and P38. *Matrix Biology* 1998; 8-9 (17): 547-57.
- WIERCINSKA E, NABER H, PARDALI E, VAN DER PLUIJM G, VAN DAM H and TEN DIJKE P. The Tgf-B/Smad Pathway Induces Breast Cancer Cell Invasion through the up-Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 in a Spheroid Invasion Model System. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; [Epub ahead of print].
- WIMAN B, ALMQUIST Å, SIGURDARDOTTIR O and LINDAHL T. Plasminogen Activator Inhibitor 1 (Pai) Is Bound to Vitronectin in Plasma. *FEBS Letters* 1988; 1 (242): 125-28.
- WIPFF P-J and HINZ B. Integrins and the Activation of Latent Transforming Growth Factor [Beta]1 - an Intimate Relationship. *European Journal of Cell Biology* 2008; 8-9 (87): 601-15.
- WOODWARD R N, FINN A V and DICHEK D A. Identification of Intracellular Pathways through Which Tgf-Beta1 Upregulates Pai-1 Expression in Endothelial Cells. *Atherosclerosis* 2006; 1 (186): 92-100.

- WRANA J L and ATTISANO L. The Smad Pathway. Cytokine and Growth Factor Reviews 2000; 1-2 (11): 5-13.
- WRANA J L, ATTISANO L, WIESER R, VENTURA F and MASSAGUE J. Mechanism of Activation of the Tgf-[Beta] Receptor. Nature 1994; 6488 (370): 341-47.
- XIAO Y, MONITTO C L, MINHAS K M and SIDRANSKY D. Lactoferrin Down-Regulates G1 Cyclin-Dependent Kinases During Growth Arrest of Head and Neck Cancer Cells. Clinical Cancer Research 2004; 24 (10): 8683-86.
- XIE B, LAOUAR A and HUBERMAN E. Fibronectin-Mediated Cell Adhesion Is Required for Induction of 92-Kda Type Iv Collagenase/Gelatinase (Mmp-9) Gene Expression During Macrophage Differentiation. The Signaling Role of Protein Kinase C-Beta. The Journal of biological chemistry 1998a; 19 (273): 11576-82.
- XIE B, LAOUAR A and HUBERMAN E. Autocrine Regulation of Macrophage Differentiation and 92-Kda Gelatinase Production by Tumor Necrosis Factor-Alpha Via Alpha5 Beta1 Integrin in HI-60 Cells. The Journal of biological chemistry 1998b; 19 (273): 11583-88.
- YAMAGUCHI K, SHIRAKABE K, SHIBUYA H, IRIE K, OISHI I, UENO N, TANIGUCHI T, NISHIDA E and MATSUMOTO K. Identification of a Member of the Mapkkk Family as a Potential Mediator of Tgf-Beta Signal Transduction. Science (New York, N.Y.) 1995; 5244 (270): 2008-11.
- YANG Z, STRICKLAND D K and BORNSTEIN P. Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-Related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2. Journal of Biological Chemistry 2001; 11 (276): 8403-8.
- YOUNG P R, MCLAUGHLIN M M, KUMAR S, KASSIS S, DOYLE M L, MCNULTY D, GALLAGHER T F, FISHER S, MCDONNELL P C, CARR S A, HUDDLESTON M J, SEIBEL G, PORTER T G, LIVI G P, ADAMS J L and LEE J C. Pyridinyl Imidazole Inhibitors of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Bind in the Atp Site. Journal of Biological Chemistry 1997; 18 (272): 12116-21.
- YUE J and MULDER K M. Requirement of Ras/Mapk Pathway Activation by Transforming Growth Factor Beta for Transforming Growth Factor Beta 1

Production in a Smad-Dependent Pathway. The Journal of biological chemistry 2000; 40 (275): 30765-73.

ZEMANN N, KLEIN P, WETZEL E, HUETTINGER F and HUETTINGER M.

Lactoferrin Induces Growth Arrest and Nuclear Accumulation of Smad-2 in Hela Cells. Biochimie 2010; 7 (92): 880-84.

ZHANG S, FEI T, ZHANG L, ZHANG R, CHEN F, NING Y, HAN Y, FENG X-H, MENG A and CHEN Y-G. Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor {Beta} Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. Mol. Cell. Biol. 2007; 12 (27): 4488-99.

ZIMECKI M, MAZURIER J, MACHNICKI M, WIECZOREK Z, MONTREUIL J and SPIK G. Immunostimulatory Activity of Lactotransferrin and Maturation of Cd4- Cd8- Murine Thymocytes. Immunology Letters 1991; 1 (30): 119-23.

ZIMECKI M, MAZURIER J, SPIK G and KAPP J A. Human Lactoferrin Induces Phenotypic and Functional Changes in Murine Splenic B Cells. Immunology 1995; 1 (86): 122-27.

LEBENS LAUF

ELLEN MARIA WETZEL

Adresse: Springergasse 23/5, 1020 Wien

Telefon: 0699 191 307 82

E-Mail: ellen2@gmx.at

Geburtsdatum und -ort: 29 Juni 1983, Bregenz

Staatsangehörigkeit: A



AUSBILDUNG

März 2005 – Juni 2011

Studium der Ernährungswissenschaften

Schwerpunkt Ernährung und Umwelt

Universität Wien

August 2004 – Jänner 2005

Kindergartenhelferin

Happy Child Company Wien

Oktober 2003 – Februar 2005

Studium der Internationalen Entwicklung

Universität Wien

Februar 2003 – August 2003

Au Pair, Paris

August 2002 – Jänner 2003

Europäischer Freiwilligendienst, Montcombroux les Mines

2000 – 2002

BORG Dornbirn

1997 – 2000

HAK Bregenz

1993 – 1997

Hauptschule Hörbranz

1989 – 1993

Volksschule Hohenweiler

BERUFSERFAHRUNG

17. Jänner – 4. Februar 2011

Block 9 - Krankheit - Manifestation und Wahrnehmung, allgemeine
Arzneimitteltherapie

Tutorin

1. – 15. Juni 2010; 8. – 24. November 2010

Biochemische Übungen für Ernährungswissenschaftler

Tutorin

5. – 28. Juli 2010

Mitarbeiterin auf der Sennalpe Buralpe, Oberstaufen

7. – 14. Oktober 2009

Block 13 - Ernährung und Verdauung

Tutorin

18. Mai 2009 – 5. Februar 2010

Institut für medizinische Chemie

Zentrum für Pathobiochemie und Genetik

Medizinische Universität Wien

Diplomandin

2. – 27. Februar 2009

Institut für medizinische Chemie

Zentrum für Pathobiochemie und Genetik

Medizinische Universität Wien

Praktikantin

7. Juli – 3. August 2008

Institut für Umwelt und Lebensmittelsicherheit

Land Vorarlberg

Praktikantin

30. Juli – 31. August 2007

Hermann Pfanner Getränke GesmbH

Mikrobiologisches Labor

Praktikantin

SPRACHKENNTNISSE

Englisch und Französisch fließend in Wort und Schrift

IT SKILLS

MS Office, Prism, Photoshop, Internet

INTERESSEN & HOBBIES

Botanik; Literatur, Kunst, Film

Lomi Lomi Nui, Yoga, Wandern, Klettern, Bharatanatyam

Wien, Mai 2011