



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

**„Zytokinartige Wirkung von Laktoferrin in Caco-2 Zellen und THP-1 Monozyten:
Rekombinantes humanes vs. bovines Laktoferrin“**

Verfasserin

Karin Hojdar Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

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

DANKSAGUNG:

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um auf diesem Weg „Danke“ zu sagen!

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Hüttinger bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Masterarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu machen und mir immer gerne mit Rat und Tat zur Seite stand. DANKE.

Weiter möchte ich mich bei Nina, der „Frau vom Zemann“, bedanken. Sie war mir in dieser Zeit nicht nur in praktischen und theoretischen Fragen eine überaus große Hilfe, sondern auch eine richtig gute Freundin. Darüber hinaus möchte ich mich für die tollen Gespräche, lustigen Stunden und die coolen Buttons bedanken. Als zukünftige Mama wird sie großartig sein. DANKE.

Neben diesen beiden haben jedoch auch noch andere Personen wie „die Hilde“ und „die Moni“ mir die Zeit im Labor versüßt, kulinarisch wie emotional. DANKE.

Außerhalb des Labors habe ich vor allem meiner Familie zu danken. Meinen Eltern, Wolfgang und Maria, meinem Bruder Stefan, seiner Freundin Ingrid und meiner langjährigen Freundin und fast schon Schwester Raphaela. Ihre Unterstützung war mir eine große Hilfe. DANKE.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt meinen Studienkolleginnen und Freundinnen, vor allem Bianca, Marie, Sandra und Kirsten, die mir das Studium erleichtert haben und meine Freizeit mit einer Fülle an freudigen Momenten gefüllt haben. DANKE.

Abschließend möchte ich all den Menschen danken, die mein Leben geprägt und mir den Weg in die richtige Richtung gezeigt haben. Den Gallingern, den OC-Lern der JKU, den Nycomedianern aus Linz, den Chemiestudenten der JKU und vielen mehr. DANKE.

Ich widme diese Arbeit Julia Mikula, die am 8.4.2009 mit gerade mal 22 Jahren viel zu früh von uns gegangen ist und der es leider nicht vergönnt war, das Studium der Ernährungswissenschaften zu vollenden.

I	INHALTSVERZEICHNIS	
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III	TABELLENVERZEICHNIS	IX
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	3
2.1	Laktoferrin (LF)	3
2.2	Strukturunterschiede: rekombinantes humanes Laktoferrin (rhLF) vs. bovines Laktoferrin (bLF).....	7
2.2.1	Aminosäuresequenz.....	7
2.2.2	Glykosylierung.....	8
2.3	Aufnahme und Transport von LF.....	9
2.4	Signaltransduktion und Stimulierung der Genexpression durch LF.....	11
2.4.1	Mitogen activated protein kinase- Pathway (MAPK-Pathway)	12
2.4.2	TGF- β - Rezeptor assoziierte cytoplasmatische Genregulatorproteine (Smads)	16
2.5	Umbau der Extrazellulärmatrix einer Zelle	20
2.5.1	Das Plasminogensystem.....	20
2.5.2	Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	21
2.5.3	ICAM-1.....	23

3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Zellkultur anlegen.....	27
3.2	Zellproliferationstests	35
3.3	Gelatine-Zymogramm	38
3.4	Proteinbestimmung (Photometrisch)	43
3.5	Western Blot.....	45
3.6	Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion (rtPCR).....	53
4	ERGEBNISSE.....	63
4.1	Ergebnisse der Caco-2 Zellversuche.....	65
4.1.1	Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF	65
4.1.2	Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF	67
4.1.3	Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in differenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF	68
4.1.4	Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in differenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF	71
4.1.5	Einfluss von rhLF auf die Proliferationsrate von differenzierten Caco-2 Zellen in Vergleich zu bLF	73
4.2	Ergebnisse der THP-1 Zellversuche	75
4.2.1	Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF.....	75

4.2.2	Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF.....	79
4.2.3	Zymogramm Ergebnisse.....	85
4.2.4	Signalproteinaktivierung nach Inhibierung des p38 MAPK pathways durch SB202190 in THP-1 Monozyten	86
4.2.5	Beteiligung des p38 MAPK pathways an der LF- induzierten Stimulierung von MMP-1, -9 und ICAM-1.....	90
4.2.6	Einfluss von rhLF auf die Adhäsionsfähigkeit von THP-1 Monozyten im Vergleich zu einer Kontrollprobe.....	92
4.2.7	Einfluss von rhLF auf die Proliferationsrate von THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF	92
4.2.8	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	94
5	DISKUSSION.....	95
5.1	Entwicklung des kindlichen Darms: rhLF vs. bLF	95
5.1.1	Einfluss auf die Proliferation	95
5.1.2	Einfluss auf den immunmodulierenden Effekt	96
5.2	Krebsentstehung und Metastasierung: rhLF vs. bLF	99
5.2.1	Proliferationssteigerung/ -hemmung von Krebszellen.....	99
5.2.2	Differenzierung der Krebszellen.....	101
5.3	Zusammenhang zwischen Signalaktivierung und Expressionssteigerung	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	107
7	ABSTRACT.....	109
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	XVII

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Laktoferrin Struktur [BAKER & BAKER, 2009].....	3
Abb. 2: Oral zugeführtes bLF und der Darm [TOMITA et al., 2009].....	5
Abb. 3: Mögliche Funktionen von LF [Brock et al., 1995].	6
Abb. 4: Sequenz der Disulfidschleife von (a) humanem und (b) bovinem Laktoferricin [FARNAUD und EVANS, 2003].	7
Abb. 5: Verteilung der möglichen N-gebundenen Glykosylierungsstellen bei hLF und bLF[BAKER & BAKER, 2009].....	8
Abb. 6: Bindungsstellen des humane LF [LEGRAND et al., 2005].	9
Abb. 7: Bindungsmöglichkeit der LRP Liganden [HERZ et al., 2001].....	10
Abb. 8: Signalkaskade des MAPK-Pathways [ROUX & BLENIS et al., 2004].....	13
Abb. 9: Crosstalk zwischen p38 und ERK1/2 [SHARMA et al., 2003].....	16
Abb. 10: Crosstalk zwischen Smad- und MAPK-Pathway [MASSAGUE et al., 2000].	18
Abb. 11: Vereinfachte Darstellung der Regulationsmechanismen im Abbauprozess der Matrix [RUTSCHOW et al., 2006].	23
Abb. 12: Diapedese von Polymorphonukleären Leukozyten [RHAMAN et al., 2009]. ...	23
Abb. 13: Möglichkeiten zur ICAM-1 vermittelten Signalweiterleitung in Endothelzellen während der Leukozytenadhäsion [RAHMAN et al., 2009].	25
Abb. 14: Reduktion von Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT)	36
Abb. 15: Proteinleiter [in kDa] inklusive der Position der zu bestimmenden Proteine..	50
Abb. 16: Schema der Anordnung der einzelnen Bestandteile der Transferkassette.	51
Abb. 17: Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undiff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF mittels Western Blot (Zeitverlauf)	66

Abb. 18: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in undiff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF (Zeitverlauf).....	67
Abb. 19: Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF mittels Western Blot (Zeitverlauf)	69
Abb. 20: Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF mittels Western Blot (Konzentrationsverlauf).....	71
Abb. 21: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF (Zeitverlauf).....	72
Abb. 22: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF (Konzentrationsverlauf)	73
Abb.23: Einfluss von rhLF auf die Proliferation von undiff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bLF.....	74
Abb. 24: Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF mittels Western Blot (Zeitverlauf).....	77
Abb. 25: Einfluss von rhLF auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF (Konzentrationsverlauf).....	78
Abb. 26: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF (Zeitverlauf I).....	79
Abb. 27: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF. (Zeitverlauf II).....	82
Abb. 28: Einfluss von rhLF auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF (Konzentrationsverlauf)	84
Abb. 29: Einfluss von rhLF auf die Enzymaktivität von Pro-MMP-9 in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF	86

Abb. 30: Kinase Aktivität von p-p38 (schwarze Balken), ERK (strichlierte Balken) und JNK (hellgraue Balken) nach 10-minütiger Inkubation mit SB202190 (0 bis 30000 μ M) und 20ng/ml LPS in THP-1 Monozyten [Manthey et.al, 1998].	87
Abb. 31: Signalproteinaktivierung nach Inhibierung des p-p38 Pathways durch 2 μ M SB202190 in THP-1 Monozyten bei 4 stündiger Inkubation mit jeweils 50 μ g/ml rhLF und bLF mittels Western Blot	89
Abb. 32: Expression ausgewählter Gene nach Inhibierung der p-p38 abhängigen MAPKAPK-2 Aktivierung durch SB202190 in THP-1 Monozyten nach 4 stündiger Inkubation mit jeweils 50 μ g/ml rhLF und bLF	91
Abb. 33: Mikroskopische Darstellung von THP-1 Monozyten (Phasenkontrast) nach eintägiger Inkubation mit (a) 1x PBS (Kontrollprobe), (b) 50 μ g/ml rhLF sowie (c) eine 10-fache Vergrößerung eines THP-1 Aggregates.....	92
Abb. 34: Einfluss von rhLF auf die Proliferation von THP-1 Monozyten im Vergleich zu bLF	94

III TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Physikalische Charakteristiken von hLF und rhLF [LÖNNERDAL, 2002].....	7
Tab. 2: Pipettierschema I zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels.....	40
Tab. 3: Pipettierschema II zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels.	48
Tab. 4: Herstellung der prim. AK- Lösungen	52
Tab. 5: Nukleotidsequenzen der forward and revert Primer	56
Tab. 6: Pipettierschema für den Mastermix der Umschreibung,	58
Tab. 7: Pipettierschema für den Mastermix des PCR- Ansatzes.....	59
Tab.8: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe	65
Tab.9: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in undiff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF.....	65
Tab.10: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.....	67
Tab.11: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF.....	67
Tab. 12: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	68
Tab. 13: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF.....	68

Tab. 14: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen nach 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	70
Tab. 15: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	71
Tab. 16: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF.....	72
Tab. 17: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	72
Tab. 18: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5- und 50µg/ml) auf die Proliferationsrate undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe (Bestimmung mittels MTT-Test).....	73
Tab. 19: Einfluss von bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5- und 50µg/ml) auf die Proliferationsrate undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe (Bestimmung mittels MTT-Test).....	73
Tab. 20: Vergleich der Proliferation der Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation mit LF (in Bezug auf die Konzentration): rhLF vs. bLF (Bestimmung mittels MTT-Test). 74	
Tab. 21: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	76
Tab. 22: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in THP-1 Monozyten: rhLF vs. bLF	76

Tab. 23: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten nach 1-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	78
Tab. 24: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	81
Tab. 25: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in THP-1 Monozyten: rhLF vs. bLF.....	81
Tab. 26: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.	83
Tab. 27: Einfluss von rhLF sowie bLF auf die Pro-MMP-9 Aktivität in THP-1 Monozyten nach 3-tägiger Inkubation mit LF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml).	85
Tab. 28: Vergleich der Aktivität von Pro-MMP-9 in THP-1 Monozyten nach 3-tägiger Inkubation mit LF: rhLF vs. bLF (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml).....	85
Tab. 29: Einfluss von p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190 auf die Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF sowie bLF im Vergleich zur Kontrollprobe.	88
Tab. 30: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190.....	88
Tab. 31: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml bLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190.....	88

Tab. 32: Einfluss von p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190 auf die Expression ausgewählter Gene nach 4 stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF sowie bLF im Vergleich zur Kontrollprobe.....	90
Tab. 33: Vergleich der Expression ausgewählter Gene nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190...	91
Tab. 34: Vergleich der Expression ausgewählter Gene nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml bLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190	91
Tab. 35: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml) auf die Proliferationsrate THP-1 Monozyten nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.....	93
Tab. 36: Einfluss von bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml) auf die Proliferationsrate THP-1 Monozyten nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.....	93
Tab. 37: der Proliferation der Caco-2 Zellen nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation mit LF (in Bezug auf die Konzentration): rhLF vs. bLF (Bestimmung mittels MTT-Test)	93

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a2M	Alpha-2 macroglobuline
Ala	Alanin
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bLF	Bovines Laktoferrin
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BSA	Bovines Serum Albumin
Caco-2	Human epithelial colorectal adenocarcinoma cells
cDNA	Complementary DNA
c-Myc	Cellular Myelocytomatose-Onkogene
Co-Smad	Common-partner Smad
CREB	cAMP response element-binding protein
CTP	Cytidintriphosphat
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EMMPRIN	Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer
ERK	Extracellular regulated kinases
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal Calv Serum
G- Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GS Domäne	Domäne mit Glycin/Serinresten
GTP	Guanosindiphosphat
HeLa	Henrietta Lacks epitheliale Zervixkarzinomzellen
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
INF	Interferon
I-Smad	Inhibitory- Smad
I κ B	Inhibitory kappaB
JNK	c-Jun-amino-terminale-Kinase
kDa	kiloDalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LDL	Low Density Lipoprotein
LF	Laktoferrin
LFcin	Laktoferricin
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL- Receptor-Related Protein
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEF2C	Myocyte-specific enhancer factor 2C
MH	Mad Homology
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA

MT-MMPs	Membrane-type MMPs
MTT	Methylthiazoltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear Factor-kappaB
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN-STREP	Penicillin-Streptomycin
PMA	Phorbol12-Myristate-13-Acetate
PMN	polymorphonukleäre Leukozyten
RAW 264.7	Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line
Rel	Transcription factor p65
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R-Smad	Receptor -regulated Smad
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
rtPCR	reverse transcription Polymerase Chain Reaction
SAPK	stress activated protein kinase
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
Ser	Serin

SOS	Son Of Sevenless
SRC	Proonkogen der Tyrosinkinase (cellular sarcoma)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-Buffered Saline -Tris-gepufferte Salzlösung
TEM	transendotheliale Migration
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
Thr	Threonin
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Trp	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
UV-Licht	ultraviolettes Licht
Val	Valin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs	versus
WB	Westernblot
XC	Xylencyanol

1 EINLEITUNG

Laktoferrin (LF), ein rötlich gefärbtes Transferrin- ähnliches Glykoprotein, wurde erstmals 1939 von Sorensen und Sorensen aus Kuhmilch isoliert [SORENSEN & SORENSEN, 1939]. Studien zu den antimikrobiellen Effekten durch Arnold et al. (1977), zu der immunmodulatorischen Aktivität durch Broxmeyer et al. (1978) sowie Struktur- aufklärende Experimente durch Spik et al. (1982) zählen zu den Pionierarbeiten der Erforschung von LF [ARNOLD et al., 1977; BROXMEYER et al., 1978; SPIK et al., 1982; BAKER & BAKER, 2009].

Laktoferrin wird von den Epithelialzellen als apo-Form sekretiert und kann deshalb in den meisten exokrinen Flüssigkeiten wie dem Speichel, der Magensäure, dem Vaginalsekret, der Pankreas- und Gallenflüssigkeit, den Tränen und vor allem in der Muttermilch nachgewiesen werden [MONTREUIL et al., 1960]. Die Konzentration von LF in der Muttermilch variiert von 1g/l (reife Milch) bis 7g/l (Kolostrum) [HOUGHTON et al., 1985]. Zusätzlich wird LF während des Übergangs von Promyelozyten zu Myelozyten synthetisiert und findet sich somit in den sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten wieder [MASSON et al., 1969]. Während einer Entzündungsreaktion kann LF aus den sek. Granula freigesetzt werden, was zu einem massiven Anstieg von LF im Plasma von einem Normalwert von 0,4-2mg/l auf bis zu 200mg/l bei Sepsis führen kann [BENNETT et al., 1978; MAAKS et al., 1989]. Der Plasmawert spiegelt jedoch nur ein Minimum der LF- Konzentration wider, da am Entzündungsort selbst LF sofort an Glykosaminoglykane der Proteoglykane von Zelloberflächen bindet [ZIERE et al., 1996; MANN et al., 1994; LEGRAND et al., 1997].

Zusätzlich zu den oben erwähnten Effekten wird Laktoferrin eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen zugesprochen [WARD et al., 2005]. Dabei wird LF nachgesagt, die Proliferation und Differenzierung normaler Zellen zu stimulieren [HAGIWARA et al., 1995; YANAIHARA et al., 2000] und die der malignen Zellen zu inhibieren [BEZAULT et al., 1994; WANG et al., 2000; WOLF et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit wird an Untersuchungen angeschlossen, die die Wirkung von bLF auf Chondrozyten, THP-1 Monozyten, HeLa-, Mef-, Mink- und Caco-2 Zellen untersuchten. Dabei konzentrierte sich die Beobachtung auf die Aktivierung von p38 MAPK, ERK1/2 und Smad-2 Signalen, die Stimulierung ausgewählter Zielgene und die Proliferationssteigerung durch bLF. Die hier vorgelegten Experimente widmen sich der Frage, ob ein Unterschied zwischen rhLF und bLF in Bezug auf die oben erwähnten Signale (Analyse mittels Westernblot), die Expression von Extrazellulärmatrixmodellierenden Proteinen (Analyse mittels rtPCR) und dem Wachstumsverhalten bei Caco-2 Zellen (Bestimmung mittels MTT-Test) sowie THP-1 Monozyten (Zellzahlbestimmung mittels Casy) besteht.

Das hier verwendete rekombinante humane Laktoferrin (rhLF) aus transgenem Reis gleicht dem humanem Laktoferrin (hLF) in der N-terminalen Aminosäuresequenz, dem isoelektrischen Punkt, der Bindungskapazität von Eisen, der Rezeptorbindungsfähigkeit an Caco-2 Zellen, der antimikrobiellen Aktivität gegen humane Pathogene sowie dem Widerstand gegen die Proteasedigestion. Einzig die posttranslationelle Glykosylierung führt zu einem pflanzentypischen Ergebnis [NANDI et al., 2002].

Die Ergebnisse sollen die Entscheidung für die effektivere LF Spezies als immunmodulierender Faktor zur Anreicherung von Formulanahrung sowie als proliferationshemmende Substanz bei der Bekämpfung bestimmter Tumorarten erleichtern und einen Hinweis liefern welche molekularen Strukturen für verschiedene Wirkungen verantwortlich sind.

2 LITERATURÜBERBLICK

2.1 Laktoferrin (LF)

Sorensen und Sorensen gelang es im Jahr 1939 erstmals ein rot gefärbtes Protein in boviner Milch nachzuweisen, das ebenfalls, wie das lachs- gefärbte Protein durch Johansson aus humaner Milch, geringe Mengen an Eisen enthält [GROVES et al., 1960]. Im Jahr 1960 erhielten beide Proteine (das aus humaner und das aus boviner Milch) auf Grund der für Transferrine typischen Eigenschaft, Eisen binden zu können, den Namen „transferrin-like glycoprotein“, welche wir heute als Laktoferrine (LF) kennen [TOMITA et al., 2009; BAKER & BAKER, 2009].

Laktoferrin (Abb. 1) ist ein 80kDa schweres, aus 703 Aminosäuren bestehendes, Eisenbindendes Glykoprotein, das eine hohe strukturelle Homologie in verschiedenen Spezien aufweist [GONZALES-CHAVES et al., 2009; LEVAY & VILJOEN, 1995]. Die Polypeptidkette ist in 2 symmetrische Lappen (N- und C- Lappen) gefaltet, die sich zu 33-41% gleichen. Sie sind über eine Gelenkstruktur, bestehend aus einer 10 bis 15 Aminosäuren langen α - Helix, zwischen den Aminosäuren 333 und 345 verbunden und verleihen somit LF eine gewisse Flexibilität [BAKER & BAKER, 2009; GONZALES-CHAVES et al., 2009].

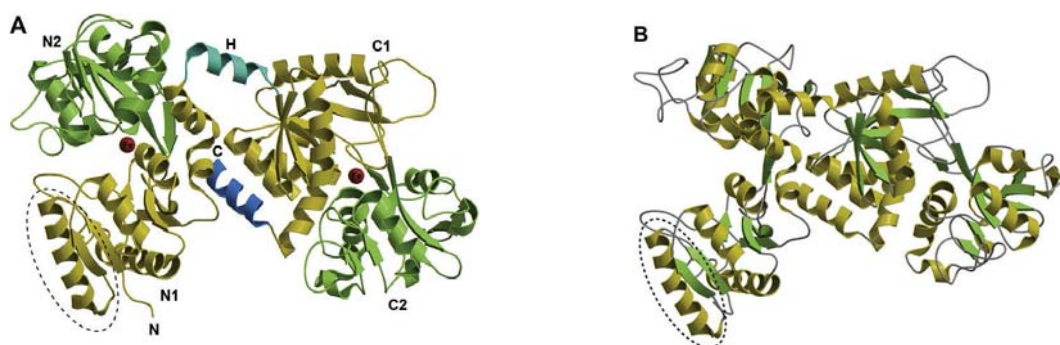


Abb. 1: Laktoferrin (A) mit gebundenem Eisen, in rot eingezeichnet, und (B) ohne gebundenem Eisen. Links erkennt man den N-Lappen, rechts den C-Lappen. Die α - Helices (C-terminal sowie die Verbindung der Lappen) sind in blau abgebildet. Die Position der antimikrobiellen Einheit ist mittels strichliertem Kreis eingezeichnet [BAKER & BAKER, 2009].

Die Polypeptidkette trägt 2 Kohlenhydratgruppen, die über eine Asparaginyln-Acetylglucosamin Bindung mit dem Protein verbunden sind [JOLLES et al., 1976]. Der N- Lappen wie auch der C- Lappen werden abermals in 2 Domänen eingeteilt (Domäne I und II), die sich anhand von α - Helix und β - Faltstruktur unterscheiden. Jeder dieser Lappen kann, durch Synergie mit einem Carbonat- Ion, ein Metall- Atom (Bsp.: Fe^{2+} -, Fe^{3+} -, Cu^{2+} -, Zn^{2+} - und Mn^{2+} - Ionen) binden [BAKER & BAKER, 2009; GONZALES-CHAVES et al., 2009].

Die Stabilität von LF zeigt sich bei Beobachtung der Magenpassage. Die Versuche von Freiburghaus et al. ergaben, dass 60% des oral zugeführten bovinen LF intakt in den Dünndarm übergeführt werden. Bei genauer Analyse des Mageninhaltes zeigte sich ein Gehalt von nur 4,5% Laktoferricin B (LFcin B), einem typischen Hydrolyseprodukt von bovinem LF [FREIBURGHAUS et al., 2009]. Die Absorption von Laktoferrin ins Blut wird widersprüchlich diskutiert. Während Wakabayashi et al. berichten, dass Daten darauf hindeuten, dass keine Absorption von verdautem bLF ins Blut stattfindet [Wakabayashi et al., 2004], konnte von Hutchens et al. eindeutig gezeigt werden, dass hLF der Muttermilch durch den Säugling nicht nur absorbiert wird sondern auch, dass dieses fast ausschließlich in intakter Form im Urin wiederzufinden war [HUTCHENS et al., 1991].

Nach Aufnahme von bLF durch die Nahrung und teilweiser Verdauung in Magen und Darm können bLF und dessen Spaltprodukte anschließend an Rezeptoren der Enterozyten und Immunzellen (dendritischen Zellen und Lymphozyten) des intestinalen Epitheliums binden (Abb. 2) [TOMITA et al., 2009]. Mit der Rezeptorbindung geht eine Aufnahme von bLF bzw. dessen Peptide und/ oder die Auslösung von intrazellulären Signalkaskaden zur Stimulierung der Transkription bestimmter Gene (z.Bsp. NOD-2, INF- β und IL-12p40 im Dünndarm von Mäusen) einher [Wakabayashi et al., 2006]. Die Immunzellen sind durch den Kontakt mit bLF in der Lage, humorale Faktoren wie Zytokine (z.Bsp. IL-18, IL-10, INF- γ) zu sekretieren [KUHARA et al., 2000; Takakura et al., 2006], die dann durch Zirkulation zur erkrankten Stelle gelangen. Neben der Sekretion von Zytokinen migrieren die stimulierten Immunzellen selbst zur betroffenen Region. Ein Zusammenspiel aus humoralen

Faktoren und Immunzellen folgt, welches Infektions- und Entzündungssymptome verbessert und einer Karzinogenese vorbeugen soll [WAKABAYASHI et al., 2006; TERAGUCHI et al., 2004].

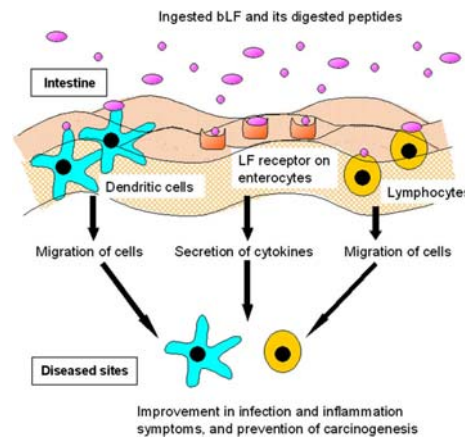


Abb. 2: Mechanismus des protektiven Effekts von oral zugeführtem bLF auf den Darm. bLF sowie dessen Abbauprodukt Laktoferricin binden an Rezeptoren der Darm- Enterozyten und -Immunzellen (dendritische Zellen und Lymphozyten) und führen somit zu einer Fülle an immunmodulierenden Effekten [TOMITA et al., 2009].

Die Konzentrationen von LF im menschlichen Körper und dessen Flüssigkeiten unterscheiden sich gewebespezifisch. Im Plasma kommt LF in sehr geringer ($\sim 1\mu\text{g/ml}$), im Kolostrum, der Muttermilch und im Seminalplasma ($0,4\text{-}1,9\text{mg/ml}$) jedoch in wesentlich höheren Konzentrationen vor. Abgesehen von dem Spitzenreiter Kolostrum ($5\text{-}7\text{mg/ml}$) und Muttermilch ($1\text{-}2\text{mg/ml}$) lassen sich auch in Nabelschnurblut ($\sim 25\mu\text{g/ml}$), Vaginalsekret ($\leq 0,2\text{mg/ml}$) und Tränenflüssigkeit ($2,2\text{mg/ml}$) hohe Konzentrationen feststellen. Der Review von Levay und Viljoen gibt jedoch zu bedenken, dass die gemessenen Level an LF variieren können, was durch folgende Ursachen erklärt werden kann: (a) der verwendeten Analysemethode, (b) der Aufbereitung der Probe, (c) dem Eisen- Status des LF und (d) der Lagerdauer der Probe [LEVAY & VILJOEN, 1995]. Muttermilch enthält durchschnittlich $1\text{-}2\text{mg/ml}$ LF. Durch die Fähigkeit auch bei stark sauren pH-Werten ($\text{pH} < 3$) sein gebundenes Eisen beibehalten zu können, wird LF zu einem wichtigen Eisen- Transporter [NANDI et al., 2002; SUZUKI et al., 2002]. Die Konzentration von LF in der Muttermilch ist dem Alter des Säuglings angepasst. Die höchste Konzentration an LF wird in der Anfangsmilch, dem Kolostrum, gemessen. Danach sinkt der LF- Gehalt der Milch stetig. Das Verhältnis von Eisen-

gesättigtem LF (10%; genannt: holo-Form) zu Eisen- ungesättigten Isoformen (90%; genannt: Apo-Form) bleibt in der Muttermilch jedoch stabil [BUCCIGROSSI et al., 2007].

Neben der Muttermilch kommt LF, wie schon zuvor erwähnt, in den sekundären- (spezifischen)- Granula der neutrophilen Granulozyten mit 17- 150µg/ 10⁷ Zellen vor (umgerechnet: ~10mg/ml bzw. ~0,13mM, unter der Annahme eines Zellvolumens von 1,5*10⁻¹²l und einer Konzentration von 1,5*10⁻¹¹g/Zelle). Neutrophile Granulozyten finden sich vermehrt am Ort der Entzündung und können bei Entzündungsreaktionen mit einer Freilassung von LF aus den sek. Granula antworten [DERIY et al., 2000; LEVAY & VILJOEN, 1995].

Die Freilassung führt zu einem massiven Anstieg von LF im Plasma von einem Normalwert von 0,4-2µg/ml auf bis zu 200µg/ml bei Sepsis (umgerechnet: ~0,0025mM) [BENNETT et al., 1978; MAAKS et al., 1989]. Der Plasmawert spiegelt jedoch nur die Spitze des Eisbergs wider, da am Entzündungsort selbst LF sofort an Glykosaminoglykane der Proteoglykane von Zelloberflächen bindet [ZIERE et al., 1996; MANN et al., 1994; LEGRAND et al., 1997].

Die Vielfalt der Wirkungen von LF kann auf (a) die unterschiedlichen Isoformen, (b) den Grad der Glykosylierung, (c) die Tertiärstruktur (holo- oder apo- LF) und (d) den Grad der Oligomerisation zurückgeführt werden [GONZALES-CHAVES et al., 2009]. Die Multifunktionalität von LF im menschlichen Körper hat Brock 1995 in einer Graphik zusammengefasst (Abb. 3).

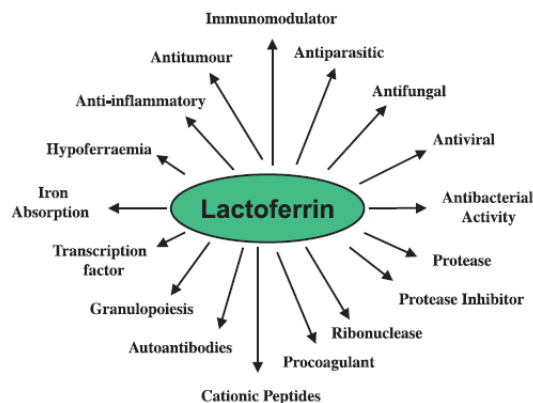


Abb.3: Mögliche Funktionen von LF [Brock et al., 1995].

2.2 Strukturunterschiede: rekombinantes humanes Laktoferrin (rhLF) vs. bovines Laktoferrin (bLF)

2.2.1 Aminosäuresequenz

Von den 9 bisher untersuchten Laktoferrinen (Mensch, Maus, Kuh, Pferd, Schwein, Ziege, Schaf, Kamel und Büffel) weisen die meisten eine sehr hohe Homologie (65- fast 100%) in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf. Der größte Unterschied wird zwischen humanem LF und dem LF der Maus festgestellt, die sich lediglich zu 70% gleichen [BAKER, 1994]. Die N-terminale Sequenz von rhLF ist jedoch dem des hLF ident (Tab. 1) [LÖNNERDAL et al., 2002].

Tab. 1: Physikalische Charakteristiken von hLF und rhLF (aus Reis) [LÖNNERDAL, 2002].

Quelle	Größe (kDa)	N-terminale Sequenz	pI	Glykosylierung	Zuckergehalt (%)
hLF	80,6	GlyArgArgArgArgSerValGlnTrpCysAla	8,2	Ja	5,5
rhLF	78,5	GlyArgArgArgArgSerValGlnTrp()Ala	8,2	Ja	2,9

Beobachtungen des Laktoferrin-Verdauungsproduktes, Laktoferricin (LFcin), verschiedener Spezien zeigen Unterschiede in Bezug auf die Aminosäuresequenz. Zwischen dem Pepsin- Verdauprodukt des LF aus der Muttermilch (Laktoferricin H) und dem aus der Kuhmilch (Laktoferricin B) besteht ein beachtlicher Unterschied in Bezug auf die Aminosäuresequenz der N-terminalen Region (Abb. 4) [FARNAUD & EVANS, 2003].

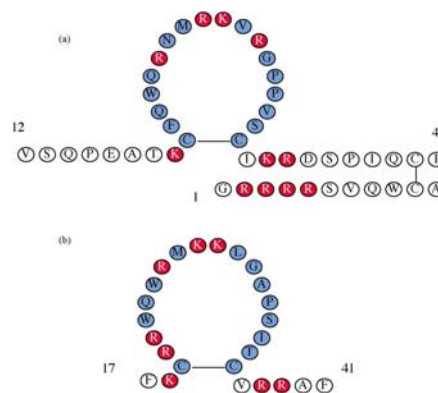


Abb. 4: Sequenz der Disulfidschleife von (a) humanem und (b) bovinem Laktoferricin. Positive Ladung wird in Rot, andere in Blau dargestellt [FARNAUD & EVANS, 2003].

Zwei Grundcharakteristika haben jedoch alle Laktoferrine gemein: der basische Charakter des Proteins [BAKER & BAKER, 2009] und die zweifache intramolekulare Sequenzwiederholung, die auf ein evolutionäres Ereignis der Genverdoppelung hindeutet [METZ-BOUTIGUE et al., 1984].

2.2.2 Glykosylierung

Obgleich jedes bisher untersuchte LF glykosyliert vorliegt, weist LF einen Spezies-spezifischen Unterschied in Bezug auf Anzahl und Ort der Glykosylierung auf. Das LF der Maus hat eine potenzielle N-Glykosylierung (Asn476), humanes LF drei (Asn137, Asn478 und Asn623) und das LF der Kuh, der Ziege sowie des Schafes jeweils fünf (233, 281, 368, 476 und 545). Trotz spärlicher Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass von diesen Glykosylierungsstellen nicht alle auch tatsächlich genutzt werden. Normalerweise werden bei humanem LF tatsächlich zwei Stellen (Asn137 und Asn478) [HARIDAS et. al, 1995] und bei bovinem LF vier Stellen (Asn233, Asn368, Asn476 und Asn545) [MOORE et. al, 1997] glykosyliert (Abb.5).

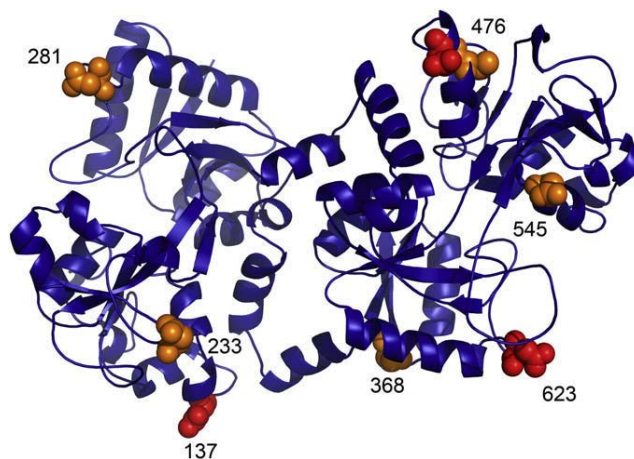


Abb. 5: Verteilung der möglichen N-gebundenen Glykosylierungsstellen. Rot: Mögliche Glykosylierung bei humanem LF. Orange: Mögliche Glykosylierung bei bovinem LF [BAKER & BAKER, 2009].

Rekombinantes humanes Laktoferrin (rhLF) aus Reis verhält sich bei Versuchen der dynamischen Differenzkalorimetrie dem humanen Laktoferrin sehr ähnlich, was auf eine vergleichbare Struktur deutet. Weitere Studien konnten jedoch eine unterschiedliche Glykosylierung der, aus verschiedenen Quellen stammenden, Laktoferrine darlegen. So weist LF aus Säugermilch typische Glykane wie α -2,6-

Neuraminsäure, β -1,4-Galaktose und α -1,6-Fukose auf, während LF aus Reis die Pflanzen-typischen Glykane wie α -1,3-Fukose und β -1,2-Xylose zeigt [SPIK et al., 1982; FUJIYAMA et al., 2004]. Ein MALDI-MS Experiment von Lønnerdal (2002) zeigte einen Unterschied im Molekulargewicht zwischen 78,5kDa für rhLF und 80,6kDa für hLF (Tab. 1), der sich ebenfalls durch die unterschiedliche Glykosylierung erklären lässt. Nachforschungen deckten auf, dass sich in rhLF Xylose befindet, jedoch Sialinsäure fehlt, was für posttranslationelle Modifikation in Pflanzen typisch ist [LÖNNERDAL et al., 2002].

2.3 Aufnahme und Transport von LF

Die kationische Natur von Laktoferrin ermöglicht dessen Bindung an anionische Moleküle. Dies führt dazu, dass 80% aller LF Bindungen mit sulfatierten Proteoglykanen stattfinden. Auch wenn deren Bindung mit einer K_a von 10^6 M bescheiden ausfällt, findet sich dennoch eine dicht besiedelte Bindung von LF an Zelloberflächen [LEGRAND et al., 1997; DAMIENS et al., 1998].

Die Bindung von LF an Glykosaminoglykane der Zelloberflächen scheint für den inflammatorischen Prozess wichtig zu sein. hLF verfügt über zwei basische Abschnitte $_1$ GRRRS $_6$ und $_{28}$ RKVR $_{31}$ [MANN et al., 1994], die für die Bindung an sulfatierte Stellen eines Proteoglykans wichtig sind (Abb. 6) [LEGRAND et al., 2005].

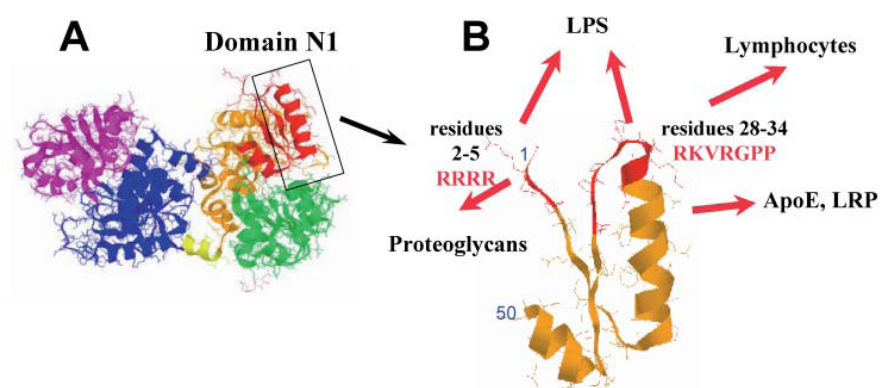


Abb. 6: Bindungsstellen des humanen LF. (A) Position der N1 Domäne. (B) Bindungsstellen für LPS, Proteoglykane, apoE, LRP und Lymphozyt- Rezeptor [LEGRAND et al., 2005].

Abgesehen von Proteoglykanen ist LF in der Lage an Zellrezeptoren zu binden. Die Fähigkeit von LF als Ligand zu operieren steht mit dessen Fähigkeit zur Signaltransduktion, Endozytose und Translokation in den Nukleus in Verbindung [LEGRAND et al., 2004].

Laktoterrin bindet beispielsweise an Nukleolin. Dieses Protein arbeitet normalerweise mit Proteoglykanen, sich in Teilung befindlichen Zellen, zusammen und kann bei LF-Bindung für dessen Endozytose und Zellkerntranslokation sorgen [LEGRAND et al., 2004]. Auf aktivierten Lymphozyten, Plättchen und Brustdrüsenzellen konnte ein 105kDa schwerer Rezeptor identifiziert werden, der Nukleolin ähnelt, jedoch in Bezug auf die Bindungsstellen am Rezeptor Unterschiede aufweist [MAZURIER et al., 1989; LEVEUGLE et al., 1993; DAMIENS et al., 1998].

Ein weiterer sehr wichtiger LF Rezeptor an Zelloberflächen ist das low-density lipoproteinreceptor-related protein (LRP). LRP (Abb. 7) zeigte sich in der Vergangenheit als wichtiger Endozytose Rezeptor für LF, als mitogener LF- Rezeptor in Osteoblasten [GREY, 2004] und als Oberflächenrezeptor in Immunzellen [LEGRAND et al., 2005].

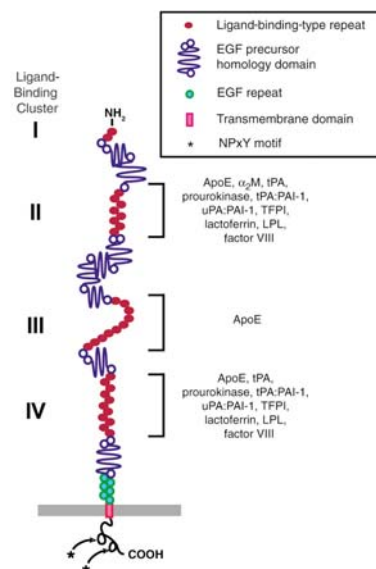


Abb. 7: Bindungsmöglichkeit der LRP Liganden an verschiedene Abschnitte von LRP. Rote Kreise: Cysteinreiche Wiederholungen von Liganden-Bindungsstellen (in 4 Abschnitten des LRPs: 2, 8, 10 und 11). Jedem Abschnitt folgen 1-4 homologe EGF Domänen (blaue Kreise) und YWTD Domänen (Wellenlinien). Im cytoplasmatischen Bereich des LRP befinden sich NPXY Motive (Sternchen). Cluster-I bindet keine, Cluster-II und -IV die meisten der heute bekannten Liganden von LRP [HERZ et al., 2001].

Neben den oben erwähnten Funktionen wirkt LRP auf bestimmte Serin Proteasen und Metalloproteinasen und erweist sich dadurch als wichtiger Regulator der extrazellulären proteolytischen Aktivität. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) und tissue-type plasminogen activator (tPA) sind Serin Proteasen, die Plasminogen aktivieren und somit eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Tumordinvasion und der Zellmigration, in normaler wie pathologischer Situation, spielen [JOHNSEN et al., 1998].

Neben Nukleolin und LRP sei abschließend noch ein 34kDa Protein erwähnt, das unter reduzierenden Bedingungen auf Zelloberflächen des Intestinaltrakts als weiterer LF-Rezeptor entdeckt wurde [LÖNNERDAL et al., 2004; LÖNNERDAL et al., 2002].

2.4 Signaltransduktion und Stimulierung der Genexpression durch LF

Das Verhalten einer Zelle kann durch eine Vielzahl extrazellulärer Signalmoleküle verändert werden. Externe Signale können allgemein durch Signalkaskaden verstärkt, verteilt und auch molekular übersetzt werden [ABLERTS et al., 2005].

Laktoferrin wirkt ähnlich einem Zytokin als extrazelluläres Signal, das durch passende Rezeptorbindung anschließend intrazelluläre Signalproteine aktivieren und somit die Expression bestimmter Gene beeinflussen kann. Abhängig von der Zelllinie vermag LF Signaltransduktionswege wie den NF- κ B Pathway [OH et al., 2004; HAVERSEN et al., 2002], den MAP Kinase Pathway [YANHONG et al., 2008; OH et al., 2001] und den Smad-2 Pathway [BRANDL et al., 2010] zu aktivieren. Im Fall des MAP Kinase Pathways wurde neben der Stimulierung der extracellulär signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), ebenfalls die Stimulierung der stressinduzierten Kinase p38 beobachtet [BRANDL et al., 2010].

Die MAP Kinase Pathways (ERK1/2 sowie p38) werden mit essentiellen zellregulatorischen Prozessen wie der Beeinflussung der Genexpression, der Mitose, der Motilität und der Differenzierung der Zelle sowie dem Zellwachstum und -tod in

Verbindung gebracht [ROUX & BLENIS et al., 2004]. TGF- β Signale, die über Smad-2 vermittelt werden, führen zu ähnlichen Effekten wie die ERK1/2 oder p38 Signale [TEN DIJKE et al., 2002]. Der Aktivierung des NF- κ B Pathways wird vor allem im Bereich des Immunsystems eine bedeutende Rolle zugeschrieben [GHOSH et al., 1998; LI und VERMA, 2002].

2.4.1 Mitogen activated protein kinase- Pathway (MAPK-Pathway)

MAP-Kinasen zählen zu den Mitgliedern diskreter Signalkaskaden, deren Schwerpunkt auf der Weiterleitung extrazellulärer Signale liegt und die in der Lage sind, fundamentale zelluläre Prozesse zu regulieren. Die 4 Subgruppen des MAPK- Pathways umfassen (1) extracellular signal-regulated kinases (ERKs), (2) c-jun N-terminal or stress-activated protein kinases (JNK/SAPK), (3) ERK5/big MAP kinase1 (BMK1) und (4) die p38 Gruppe der Proteinkinasen [COBB et al., 1991; SUGDEN et al., 1997].

MAPKs können durch ein breites Spektrum an Stimuli aktiviert werden (Abb. 8). Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 läuft meist über Wachstumsfaktoren und Phorbolster, während die Aktivierung von p38 und JNK Kinasen durch Stresseinwirkung wie osmotischem Schock hervorgerufen wird [PEARSON et al., 2001].

MAPKKKs sind Serin/ Threonin Kinasen, die meist durch Phosphorylierung oder/ und als Ergebnis der Interaktion kleiner GTP-bindenden Proteine der Ras/ Raf- Familie mit extrazellulären Stimuli aktiviert werden. Die MAPKKK Aktivierung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von MAPKK. Weiters ist MAPKK in der Lage, MAPK mittels beidseitiger Phosphorylierung der zur Aktivierungsschleife der Subdomäne VIII gehörenden Threonin- and Tyrosin- Enden zu aktivieren [DAN et al., 2001; KOLCH et al., 2000].

MAPKs zeigen ein weites Funktionsspektrum, welches durch Phosphorylierung bestimmter Substrate wie Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelettproteine zustande kommt. MAPKs katalysieren außerdem die

Phosphorylierung und Aktivierung bestimmter Proteinkinasen, die MAPK-aktivierte Protein Kinase (MKs) genannt werden [ROUX & BLENIS et al., 2004].

Alle MAPKs beinhalten eine TXY (Thr-X-Tyr) - Gruppierung in deren Aktivierungsschleife. Die Phosphorylierung beider Aminosäuren, Threonin und Tyrosin, ist für die Aktivierung notwendig. Beispielsweise weist die ERK Familie ein TEY (Thr-Glu-Tyr) Aktivierungsmotiv auf [COBB et al., 1995].

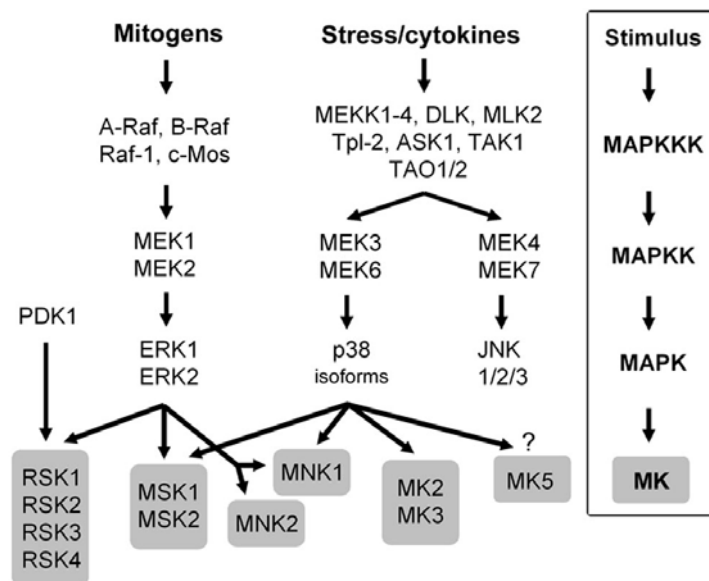


Abb. 8: Signalkaskade des MAPK-Pathways [ROUX & BLENIS et al., 2004].

2.4.1.1 Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)

ERK1/2, bekannt als Teil der klassischen mitogenen Kinase Kaskade, besteht aus den MAPKKKs A-Raf, B-Raf, Raf-1, den MAPKKs MEK1 und MEK2 und den MAPKs ERK1 und ERK2 (Abb. 8). ERK1 und -2 weisen eine Aminosäureübereinstimmung von 83% auf und kommen in verschiedenen Konzentrationen in Zellen unterschiedlichen Gewebes vor [CHEN et al., 2001].

Die Aktivierung des ERK1/2 läuft ausgehend von der Stimulierung eines Rezeptors über SOS (son of sevenless) und Ras (ein kleines GTP-bindendes Protein; Aktivierung durch GTP). Der Rezeptor zählt meist zu den Tyrosinkinase- (RTK) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren [CAMPBELL et al., 1998; WOOD et al., 1992]. Dieser

Nukleotidtausch erlaubt Ras mit darunterliegenden Effektoren wie der Serin/Threonin Kinase Raf zu interagieren [GEYER et al., 1997]. Aktiviertes Raf bindet an MEK1 und MEK2 und führt zu deren Phosphorylierung. Die aktivierten Signale sind abschließend in der Lage ERK1 und ERK2 zu phosphorylieren [HALLBERG et al., 1994].

Aktiviertes ERK1/2 kann darauf folgend viele verschiedene Substrate in den unterschiedlichsten Zellkompartimenten phosphorylieren. Dazu zählen Membranproteine (z.Bsp. CD120a, Sky und Calnexin), nukleäre Substrate (z.Bsp. SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc und STAT3), Proteine des Zytoskeletts (z.Bsp. Neurofilamente und Paxillin) sowie bestimmte MKs [CHEN et al., 2001].

Eine Schlüsselfunktion von ERK1 und ERK2 ist die Regulation der Zellproliferation, weshalb eine antikanzerogene Wirkung bei Inhibierung dieser Signale diskutiert wird [KOHNO, 2003].

2.4.1.2 p38 MAPK

Ein weiterer MAPK-Pathway verläuft über p38, welches man auch unter den Begriffen CSBP (cytokine suppressive antiinflammatory drugs binding protein), mHog1, RK und SAPK (stress- activated protein kinase)kennt [KYRIAKIS et al., 2001].

Der p38 MAPK- Pathway besteht aus mehreren MAPKKs, MEKK1- 4, MLK2 und -3, DLK ASK1, Tpl2 und Tak1 sowie den MAPKKs, MEK3 und MEK6 (bzw. MKK3 und -6), und den 4 p38 Isoformen, α -, β -, γ - und δ -p38 [KYRIAKIS et al., 2001]. Während α - und β -p38 Gene in allen Geweben exprimiert werden, werden γ -p38 (auch ERK6 oder SAPK3 genannt) und δ -p38 Gene (auch SAPK4 genannt) hingegen nur in ausgewählten Geweben mit unterschiedlicher Konzentration exprimiert. γ -p38 wird ausschließlich im Skelettmuskel, δ -p38 in Lunge, Niere, Hoden, Pankreas sowie Dünndarm exprimiert [ONO & HAN et al., 2000].

MEK3 und MEK6 können durch eine Vielzahl von MAPKKs aktiviert werden, die wiederum durch physikalische oder chemische Stresseinwirkung wie oxidativen Stress,

UV Reizung, Hypoxie, Ischämie, osmotischer Stress und Cytokine (IL-1 und TNF- α inkludiert) aktiviert werden [CHEN et al., 2001].

MEK3 und MEK6 zeigen eine hohe Spezifität für p38 und sind nicht in der Lage ERK1/2 oder JNK zu aktivieren [BRANCHO et al., 2003]. Darüberhinaus ist es MEK6 jedoch möglich alle p38 Isoformen zu aktivieren, MEK3 hingegen nur α - und β - p38 [ENSLEN et al., 2000]. Phosphoryliertes p38 kann wiederum weitere Faktoren wie Elk-1, CHOP, ATF-2, CREB und MEF2C aktivieren [HAZZALIN & MAHADEVAN, 2002]. CREB und ATF-2 können anschließend an CRE Stellen (TGACGTCA) der Promotorregionen von Zielgenen binden und die Genexpression beeinflussen [SMEAL et al., 1994].

Die p38- Gruppe wird heute mit Entzündungsreaktionen, der Zellproliferation und –differenzierung sowie dem Zellzyklus und –tod in Verbindung gebracht [NEW et al., 1998]. Im Fall der Immunreaktion wird p38 eine tragende Rolle bei der Entscheidung für eine inflammatorische Reaktion zugeschrieben. p38 wird in Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen durch inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und bakterieller Lipopolysaccharide aktiviert [ONO et al., 2000].

2.4.1.3 Crosstalk zwischen p38 und ERK1/2

Die Bezeichnung „Crosstalk“ beschreibt das Zusammenspiel mehrerer Signaltransduktionswege. So führt ein Reiz oft über mehr als nur einen bestimmten Signalweg zum Ziel bzw. kann bei Blockade eines Signals ein anderes stattdessen aktiviert werden.

Zwischen p38 und ERK1/2 soll ein Crosstalk bestehen. Den Beweis dafür lieferte ein Experiment von Xiao et. al (2002). Durch Blockade der ERK Aktivierung mittels PD 98059, einem spezifischen Inhibitor des upstream Signals MEK1/2, konnte eine Steigerung der LPS- stimulierten p38 Phosphorylierung in RAW 264.7 Zellen gezeigt werden. RAW 264.7 sind leukämische Mäuse- Monozyten/ Makrophagen. Die Inhibierung des p38 MAPK Signals mittels SB 203580 wiederum resultierte in einer Steigerung der ERK und JNK Phosphorylierung [Xiao et al., 2002].

Unter Verwendung derselben Inhibitoren, PD 98059 und SB 203580, konnte in einem Experiment von SHARMA et. al (2003) abermals ein "Crosstalk" zwischen p38 und ERK1/2 während epithelialer Wundheilung beobachtet werden (Abb. 9). Dabei konnte eine Beziehung zwischen der Migration der epithelialen Corneazellen und p38 Aktivierung sowie der Proliferation dieser Zellen und der ERK1/2 Aktivierung festgestellt werden. Wurden beide Signalwege inhibiert, führte dies zu einem sofortigen Stopp der Wundheilung [SHARMA et al., 2003].

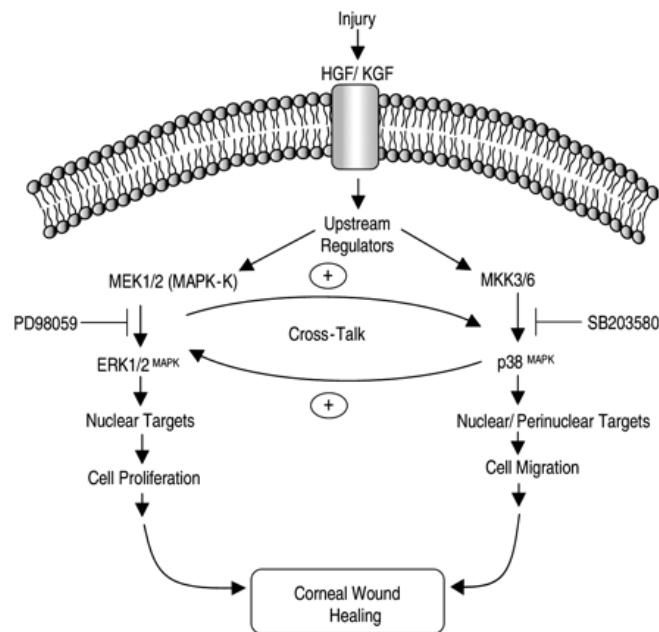


Abb. 9: Crosstalk zwischen p38 und ERK1/2 während der Wundheilung von epithelialen Corneazellen. Die Verletzung setzt Wachstumsfaktoren (HGF und KGF) frei, die an passende Rezeptoren binden und den Crosstalk zwischen ERK1/2 und p38 induzieren und koordinieren [SHARMA et al., 2003].

2.4.2 TGF- β - Rezeptor assoziierte cytoplasmatische Genregulatorproteine (Smads)

Zu der TGF- β Superfamilie gehören multifunktionelle Polypeptide (z.Bsp. TGF- β , Aktivin und Bone morphogenic Proteins, BMPs), die vor allem zelluläre Prozesse in der Frühphase der Entwicklung steuern. Ihre biologische Funktion wird mittels Bindung an einen transmembranären Serin/Threonin Kinase Rezeptor, Typ I und Typ II Rezeptor genannt, erzielt [ROBERTS et al., 1993; MASSAGUE et al., 1990]. Die Bindung des dimeren Liganden an den TGF- β - Rezeptor führt zur Bildung eines hetero-tetrameren Rezeptorkomplexes. In diesem Komplex transphosphoryliert der zuvor konstitutiv

autophosphorylierte Typ II Rezeptor die GS Domäne des Typ I Rezeptors [MOUSTAKAS et al., 2002].

Der Typ I Rezeptor ist anschließend in der Lage eine Subklasse der Smads, die Rezeptor-assoziierten Smads (R-Smads; Smad2 und Smad3) zu phosphorylieren. R-Smads binden mit Hilfe ihrer C- terminalen Phosphoserin- Domäne, dem Mad-homology 2 (MH2), an die GS- Domäne der L45 Schleife des Rezeptors [MOUSTAKAS et al., 2002]. Das verantwortliche Protein für die Interaktion zwischen R-Smad und dem Rezeptor nach TGF- β Aktivierung wird SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) genannt [TSUKAZAKI et al., 1998]. Die Phosphorylierung von R-Smads führt zu einem Affinitätsanstieg der R-Smads zu Co-Smads und zu einem Affinitätsverlust zu SARA [MASSAGUE et al., 2000].

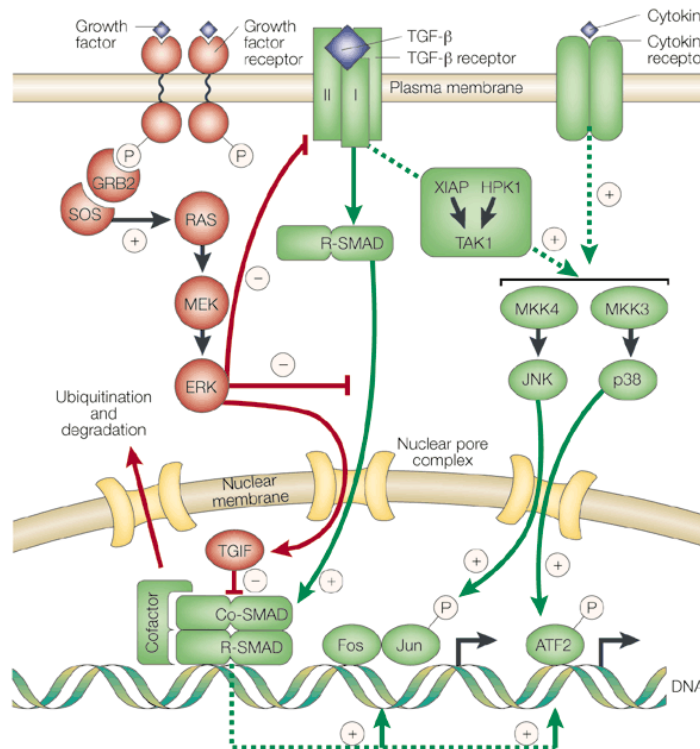
Die phosphorylierten R-Smads formen mit der zweiten Klasse der Smads, den Co-Smads (Smad4 in Säugern; Smad4 und Smad10 in Xenopus), Heteromere [LESUEUR et al., 1999; HOWELL et al., 1999]. Die Stöchiometrie dieser Komplexe sieht folgendermaßen aus: Smad4 und zwei Smad3 Monomere formen ein Heterotrimer und Smad4 und ein Smad2 Monomer formen ein Heterodimer [MOUSTAKAS et al., 2002]. Der R-Smad/ Co-Smad Komplex wird abschließend in den Nukleus transloziert und erlangt somit die Möglichkeit die Genexpression zu beeinflussen [WRANA et al., 2000]. Die Beeinflussung der Genexpression kann dabei entweder direkt durch die Smad Komplexe oder indirekt mit Hilfe von DNA-bindenden Proteinen wie FAST1, FAST2 und Fos/Jun ablaufen [CHEN et al., 1996]. Die Bindung der DNA verläuft über die N-terminale MH1 Domäne der R-Smads [HILL et al., 1999]. Im Gegensatz zu MAD, Smad3 und Smad4 ist Smad2 nicht in der Lage direkt an DNA-Sequenzen zu binden. Dies zeigt, dass trotz hoher Strukturidentität zwischen Smad2 und Smad3 die Funktion dieser beiden Signalproteine unterschiedlich ausfällt. Lediglich die Insertion einer 30bp-langen Sequenz kurz vor der DNA bindenden Haarnadelstruktur in der N-Domäne von Smad2 führt zu diesem Unterschied [SHI et al., 1998; YAGI et al., 1999].

Antagonistisch zu den oben erwähnten Smads arbeiten die inhibitorischen Smads (I-Smads, Smad6 und Smad7), indem sie durch Interaktion am Rezeptor die

Phosphorylierung der R-Smads verhindern können. Zusätzlich können sie die Bildung des R-Smad/ Smad4 Komplexes stören. Die Wirkung der I-Smads kann als negative Feedback Regulation angesehen werden, da Mitglieder der TGF- β Superfamilie selbst die Transkription der I-Smads induzieren können [WRANA et al., 2000].

2.4.2.1 Crosstalk zwischen Smad- und MAPK-Pathway

Die Weiterleitung von TGF- β - Reizen wird nicht ausschließlich über die Smad Kaskade durchgeführt. Aus einer Vielzahl an Versuchen ergab sich, dass ein komplexes Netzwerk von Crosstalks zwischen Smad Signalen und anderen Signaltransduktionswegen besteht, welche die große Bandbreite der Wirkung von TGF- β erklären [JAVELAUD & MAUVIEL, 2005]. In Säugerzellen vermögen drei MAPK-Pathways den Smad- Pathway zu beeinflussen. Zu diesen drei Signalwegen gehören der (a) Ras-MEK-ERK Pathway, (b) MMK4/JNK und (c) MKK3/p38 Pathway (Abb. 10) [MASSAGUE et al., 2000].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 10: Crosstalk zwischen Smad- und MAPK-Pathway [MASSAGUE et al., 2000].

Smads können demnach über die TGF- β Rezeptor Kinase selbst oder auch über MAPKs phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung der R-Smads mittels MAPKs scheint ihre transkriptionelle Funktion und die Kapazität der Translokation in den Nukleus zu regulieren [MASSAGUE & CHEN, 2000].

Smad2 kann ebenfalls durch MAPKKK1 (MEKK1), einem Aktivator des SAPK/JNK-Pathways, aktiviert werden. Dabei führt die Phosphorylierung von Smad2 mittels MEKK1 zu einer Steigerung der Smad2- Smad4 Interaktion, der Akkumulation im Nukleus und der Assoziation von Smad2 mit dem Transkriptionskoaktivator CBP (CREB-bindendes Protein) [BROWN et al., 1999].

Durch onkogenes Ras sowie die aktivierte MAPKK1, MEK1, kann nicht nur ERK aktiviert, sondern auch die Phosphorylierung der Bindungsstelle von TGF- β aktiviertem Smad2 und Smad3 induziert werden. Dadurch wird die TGF- β induzierte Akkumulation von Smad2 und Smad3 in den Nukleus und die Smad-abhängige Transkription unterdrückt [KRETZSCHMAR et al., 1999].

Durch Tyrosin Kinase Rezeptor Aktivierung (z.Bsp: TGF- β Typ I Rezeptor, Aktivin Typ IB Rezeptor, BMP Typ I Rezeptor) kann es zu zusätzlichen inhibitorischen Effekten gegenüber dem Smad- Signal kommen, da die Expression der Inhibitor-Smads, Smad6 und Smad7, induziert wird [AFRAKHTE et al., 1998].

Gelingt es dem heterodimeren Smad Komplex jedoch in den Zellkern zu translozieren, kann dieser mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren interagieren, die wiederum selbst durch diverse Signaltransduktionswege reguliert werden. Beispielsweise führen Reize wie UV Strahlung, Stress und mitogene Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung des MAPK-Pathways. Der MAPK-Pathway wiederum führt zur Aktivierung von Jun Kinase und somit zur Aktivierung von c-Jun. Die TGF- β induzierte Transkription von Promotoren mit TGF- β abhängigen AP-1- und Smad- Bindungsstellen wird durch die Aktivierung des c-Jun-c-Fos- Komplexes mittels MAPK/JNK Kaskade reguliert. Die Promotoren spiegeln möglicherweise das Ziel der Konvergenz der beiden Signaltransduktionswege wider [ZHANG & DERYNCKRYNCK, 1999].

2.5 Umbau der Extrazellulärmatrix einer Zelle

Die Extrazellulärmatrix (EZM) schafft für Zellverbände ein Gerüst, welches durch seine komplexe und dynamische Struktur, bestehend aus Proteinen (Kollagen, Elastin, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane), direkt mit Zellen interagieren kann. Zusätzlich bietet die EZM vielen biologisch aktiven Molekülen wie Zytokinen, pro-angiogenen Faktoren (VEGF, TGF- β) und Wachstumsfaktoren ein Reservoir. Die Remodellierung der EZM einer Zelle stellt eine sehr wichtige Phase während verschiedenster physiologischer Prozesse, wie der Morphogenese/Entwicklung und Reparatur bestimmter Gewebe, aber auch der pathologischen Veränderungen (Bsp: kardiovaskulären Erkrankungen) dar [EGEBLAD et al., 2002; STERNLICHT et al., 2001]. Für den Umbau der EZM und der daraus resultierenden Funktionalisierung der Zelle sind eine Vielzahl EZM- modellierender Faktoren wie beispielsweise das Plasminogensystem (2.4.3.1), die Matrixmetalloproteinasen (2.4.3.2) und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 verantwortlich (2.4.3.3).

2.5.1 Das Plasminogensystem

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) und tissue- type plasminogen activator (tPA) zählen zu den Serinproteasen, die für die Aktivierung von Plasminogen verantwortlich sind. Sie spielen bei der Wundheilung, Tumorinvasion und der Zellmigration eine wichtige Rolle [JOHNSEN et al., 1998]. Plasminogen Aktivatoren finden sich vor allem in normalen, jungen und proliferationsfähigen Zellen. Sie werden auf transkriptioneller sowie posttranskriptioneller Ebene reguliert und als Proenzym in den Extrazellulärraum abgegeben, um anschließend unter bestimmten Bedingungen in ihre aktive Form umgewandelt zu werden [WEST et al., 1996]. Durch Interaktion des überwiegend zellassozierten uPAs mit passendem Rezeptor, uPAR, wird eine proteolytische Kaskade ausgelöst, die zur Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin führt, welches dadurch in der Lage ist Matrixmetalloproteinasen zu aktivieren [HERZ et al., 1992].

Neben den Aktivatoren werden von den Zellen auch Inhibitoren wie PAI-1 (in Fibroblasten und Endothelzellen), PAI-2 (in Plazenta und Makrophagen), PAI-3 (in Urin) und die Protease Nexin sekretiert. Die letzten Beiden werden zwar mit Serin-Proteaseinhibierung, aber nicht mit Plasminogen Aktivator Inhibierung in Verbindung gebracht [CHMIELEWSKA et al., 1983].

Der Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ist ein 50kDa schweres Glykoprotein, das in zwei Formen vorkommt, wobei die aktive Form als Komplex mit Vitronektin erscheint [VAN MOURIK et al., 1984; WIMAN et al., 1988]. Der mRNA Level von PAI-1 wird über eine Vielzahl an Zytokinen (Bsp: Insulin, IL-1 und LPS) reguliert [EMEIS und KOOISTRA, 1986; ALESSI et al., 1988; RICCIO et al., 1988]. PAI-1 kann mittels stabiler Komplexbildung mit uPA den proteolytischen Pathway regulieren. Der Komplex wird zusammen mit uPAR internalisiert und abgebaut. Dieser Prozess wird über LRP oder auch andere Mitglieder der LDL- Rezeptorfamilie mediiert [HERZ et al., 1992; NYKJAER et al., 1992].

2.5.2 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Der Abbau von Kollagen ist ein wichtiger Vorgang bei der Remodellierung der Extrazellulärmatrix (EZM) einer Zelle und wird vor allem durch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Serin- Proteinasen bewältigt. Zur Familie der MMPs zählen 20 Zink- abhängige Enzyme, die unter normalen Bedingungen in Fibroblasten und Myozyten und während einer Entzündungsreaktion in Makrophagen und Lymphozyten exprimiert werden [WOESSNER & NAGASE, 2000].

MMPs können entweder als Proenzym in den Extrazellulärraum abgegeben werden oder membrangebunden vorkommen. Die katalytische Domäne am extrazellulären C-Terminus der MMPs ist für die Substratspezifität und die spezifische Bindungsfähigkeit an EZM Proteine verantwortlich [WOESSNER & NAGASE, 2000; WOESSNER et al., 1998].

Mit Hilfe der Substratspezifität lassen sich die sekretierten MMPs in drei unterschiedliche Gruppen einteilen: (a) Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13), (b) Gelatinasen (MMP-2 und -9) und (c) dem Stromelysin- ähnlichen MMP-3 [RUTSCHOW et al., 2006]. Kollagenasen zersetzen Kollagenfibrillen in lösliche Fragmente [JEFFREY et al., 1998]. Die Spaltung dieser Fragmente wird dann mittels Gelatinasen fortgesetzt [THOMAS et al., 1998; COKER et al., 1998]. Das Stromelysin-ähnliche MMP-3 zersetzt nicht nur eine Vielzahl an Verbindungen der EZM sondern kann darüberhinaus auch inaktive Pro-MMPs in ihre aktive Form überführen [NAGAOKA et al., 2000; TAO et al., 2004].

Die Gruppe der membrangebundenen MMPs (Membran Typ- MMP, MT-MMP) ist ebenfalls an der Remodellierung der Matrix beteiligt. Einerseits an der Interaktion von fibrillärem Kollagen mit Komponenten der Basalmembran und andererseits an der Aktivierung der Pro-MMPs als direkter Aktivator [MIYAMORI et al., 2000].

Neben den EZM Verbindungen zählen auch nicht-Matrix Proteine wie Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle zu den Zielsubstraten [DIEKMANN et al., 1994; FOWLKES et al., 1994; KRIDEL et al., 2001], wodurch sich weitere Funktionen der MMPs erklären lassen. MMPs spielen beispielsweise bei der Wachstumsregulation, der Induktion verschiedener Pathways und der Angiogenese eine Rolle [EGEBLAD et al., 2002].

Wie stark die EZM von MMPs abgebaut wird, hängt von einem streng kontrollierten Netzwerk ab (Abb. 11). (A) Kontrolle der Transkription über Zytokine oder Wachstumsfaktoren. (B) Aktivierung der Pro-Enzyme mittels Serinproteasen (Plasmin System), MT-MMPs oder Stromelysine. (C) Inhibierung der aktivierten MMPs mit Hilfe von α_2 -Makroglobulin bzw. den Gewebe-spezifischen MMP-Inhibitoren (tissue inhibitors of MMPs 1-4; TIMP1-4) [BREW et al., 2000; RUTSCHOW et al., 2006].

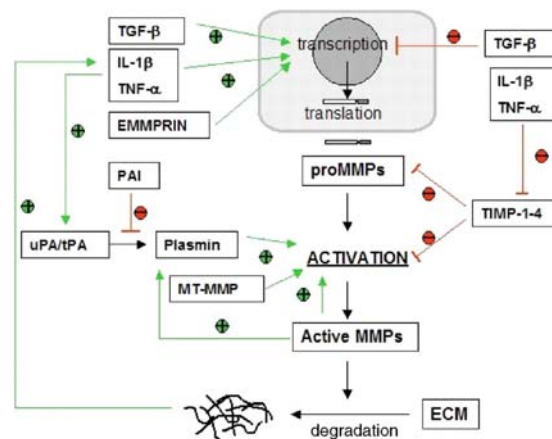


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung der Regulationsmechanismen im Abbauprozess der Matrix [RUTSCHOW et al., 2006].

2.5.3 ICAM-1

Für die transendotheliale Migration (TEM) bzw. Diapedese von polymorphonukleären Leukozyten (PMN) durch die endotheliale Barriere zum Entzündungsherd, sind Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche der Endothelzellen sowie passenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Leukozyten unerlässlich (Abb. 12) [RHAMAN et al., 2009].

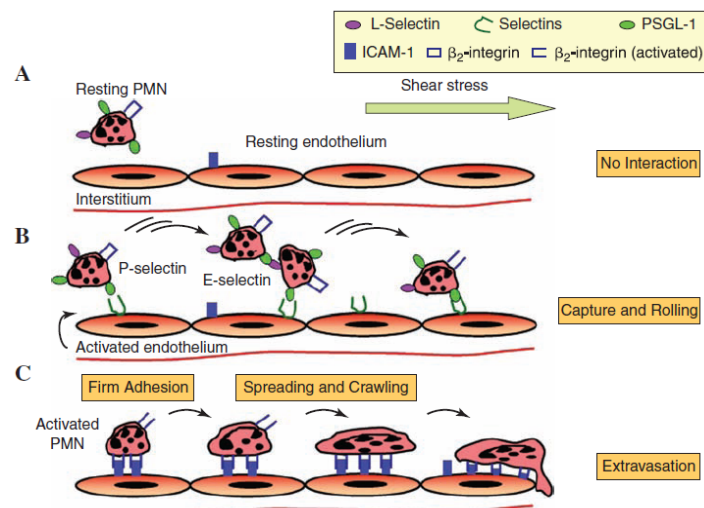


Abb. 12: Diapedese von Polymorphonukleären Leukozyten (PMN). (A) die PMN exprimieren Selektine, die jedoch nicht auf dem Endothel exprimiert sind, weshalb eine Interaktion ausbleibt. (B) Die Stimulation des Endothels mittels proinflammatorischen Mediatoren führt zur Expression von Selektinen. Eine Interaktion, in Form einer rollenden Bewegung der Leukozyten entlang des Endothels, findet statt, die wiederum zur Aktivierung von β -2 Integrin führt. (C) Interaktion zwischen β -2 Integrin und ICAM-1 löst einen Stillstand des Rollens aus und ermöglicht die TEM der PMN [RHAMAN et al., 2009].

Zuerst rollen PMN entlang der Gefäßwand. Der Kontakt, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle wie 1-Selektin (CD62L), E-Selektin (CD62E), P-Selektin (CD62P) und Ligand-1 (PSGL-1), dauert weniger als 25ms an, weshalb eine rollende Bewegung der PMN beobachtet wird [JONES et al., 1993; KANSAS et al., 1996; LAWRENCE et al., 1993; SIMON & GOLDSMITH, 2002]. Am Ort der Entzündung kommt es durch gesteigerte Bereitstellung des interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) auf der Zelloberfläche des entzündeten Endothels [ALBELDA et al., 1994] und der Aktivierung der passenden Rezeptoren, β -2 Integrin, LFa-1 (α L β 2, CD11a/CD18) und Mac-1 (α M β 2, CD11b/CD18), auf der Zelloberfläche der Leukozyten zum Stillstand der rollenden Bewegung [DIACOVO et al., 1996; DIAMOND et al., 1990; MARLIN & SPRINGER, 1987].

Die Bindung von ICAM-1 an β -2 Integrin führt zur stabilen Adhäsion, die den Leukozyten die Möglichkeit bietet, durch das Endothel zum Herd der Entzündung zu migrieren. Der Weg der Leukozyten durch das Endothel erfolgt nicht nur para- sondern auch transzellulär. Während das Selektin- vermittelte Rollen und die ICAM-1 vermittelte Adhäsion während der TEM der Leukozyten als wissenschaftlich anerkannt gelten, bleibt die Frage, warum und ob Leukozyten para- oder transzellulär einwandern, größtenteils unbeantwortet [FURIE & MCHUGH, 1989; GOPALAN et al., 2000]. Für die transzelluläre Diapedese scheinen verschiedene Faktoren verantwortlich zu sein. Als mögliche Faktoren werden der Leukozytentyp, die Summe der Signale sowie das Stadium der Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel diskutiert [PETRI & BIXEL, 2006]. Vor allem die Dichte und die Verteilung von ICAM-1 auf der Zelloberfläche entscheiden, welchen Weg die TEM der Leukozyten nimmt [YANG et al., 2005].

Das Glykoprotein ICAM-1 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Es ist 505 Aminosäuren lang und weist ein Molekulargewicht von 76- 114kDa auf, welches von der Gewebe- spezifischen Glykosylierung abhängig ist. Die Expression von ICAM-1 wird durch eine Vielzahl von Signalen vermittelt. [SPRINGER et al., 1990; STAUNTON et al., 1988]). (A) ROS, die zuvor durch extra- sowie intrazelluläre Liganden-Rezeptor-

Interaktionen gebildet wurden, scheinen wichtige Signalfunktionen im Mechanismus der ICAM-1 Expression in Endothelzellen zu haben. (B) PKC spielt bei der Promotion der ICAM-1 Expression eine wichtige Rolle. (C) PI3 Kinase und sein downstream Zielmolekül Akt sind in der Lage, die ICAM-1 Expression zu regulieren. (D) GTPasen zeigen ebenfalls, dass sie einen kritischen Einflussfaktor für die ICAM-1 Expression darstellen. (E) Über den Einfluss von MAPK Signalen wird noch diskutiert. Manche Studien zeigen einen Einfluss von p38 MAPK, JNK und ERK1/2. Wenn die Stimulierung über MAPK Signale verläuft, geschieht dies meist unter Mitwirken von NF- κ B [RAHMAN et al., 2009].

Durch Ligation neu exprimiertem und in der Zellmembran verankertem ICAM-1 ist diese wiederum in der Lage eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen zu aktivieren (Abb. 13). Zu diesen zählen: (A) RhoA, (B) ERK, und (C) JNK Aktivierung sowie (D) ROS Generierung und Src Aktivierung [RAHMAN et al., 2009].

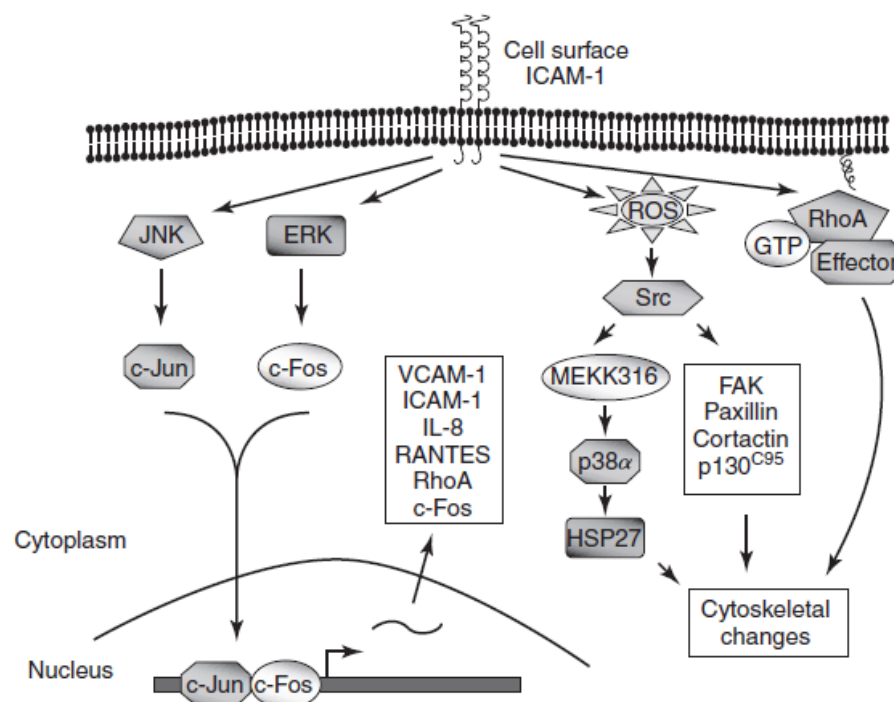


Abb. 13: Möglichkeiten zur ICAM-1 vermittelten Signalweiterleitung in Endothelzellen während der Leukozytenadhäsion [RAHMAN et al., 2009].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur anlegen

3.1.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

3.1.1.1 Für die Kultivierung der Zellen:

Laminar Flow Hood Biosafe 2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Mikroskop	Zeiss Axiovert 135
Cell Counter + Analyser System Model TT (Casy®1)	Schärfe Systeme GmbH
Wasserbad Thermo- Boy	MGW Lauda
Trockenschrank	Binder
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen:	
• 6- Well- Platten (Wachstumsfläche: 9,6cm/Well)	Greiner
• 12- Well- Platten (Wachstumsfläche: 3,8cm/W.)	Greiner
• 96- Well- Platten (Wachstumsfläche: 0,32cm/W.)	Greiner
Sterilfilter (0,2µm Porendurchmesser)	Sartorius
Megafuge 1.0R	Heraeus
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)	Biochrom AG
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	BioWhittaker®, Lonza
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
L-Glutamin (2mM; 200mM in 0,85% NaCl Lösung)	PAA; BioWhittaker®, Lonza
Penicillin- Streptomycin [PEN- STREP (100U/ml; 10.000U/ml)]	PAA; BioWhittaker®, Lonza
Ethanol 70%	MERCK
Trypsin/ EDTA	PAA

Bovines Serum Albumin (BSA)	Amresco
Bovines Laktoferrin (bLF)	Morinaga Milk Industry
Rekombinantes Humanes Laktoferrin (rhLF)	Sigma Aldrich
Phosphate- Buffered Saline [1*PBS (steril filtriert)]	
Phorbol 12- Myristate- 13- Acetate (PMA)	Sigma

3.1.1.2 Für das Lysieren der Zellen:

Zentrifuge Eppendorf 5417R

5xPBS, pH= 7,4; 1000ml:

- 40g NaCl Roth
- 14,5g Na₂HPO₄ · 12 H₂O MERCK
- 1g KH₂PO₄ MERCK
- 1g KCl MERCK
- 1M NaOH zur Einstellung des pH- Wertes MERCK
- Aqua dest. (auffüllen bis zur 1l Marke)

peqGOLD TriFast™ PEQLAB

Lysis Buffer, pH= 7,2; 100ml:

- 876,6mg Tris- (hydroxymethyl)- aminoethan Roth
- 876,6mg NaCl Roth
- 74,4mg EDTA MERCK
- 0,5ml 0,5 % Nonidet- P USB
- HCl (37%) zur Einstellung des pH- Wertes MERCK
- Aqua dest. (auffüllen bis zur 100ml Marke)

Protease Inhibitor Cocktail Sigma

3.1.2 Methode

Die Zellkultur findet vor allem in der Grundlagenforschung Verwendung. Zusätzlich zu Zellprozessen, wie Proliferation, Migration und Differenzierung, lassen sich zugrunde liegende Effekte, wie Genexpressionen, zugehörige Signaltransduktionswege oder auch Immunreaktionen beobachten.

Ausgehend von einer Primärkultur (Stammkultur oder Stock genannt), bestehend aus tierischen oder humanen Zellen, entnommen aus verschiedensten Geweben, wie Haut, Niere, Leber usw., werden Zellkulturen angelegt. Neben der Primärkultur kann auch mit einer immortalisierten (unsterblichen) Zelllinie gearbeitet werden, wobei eine Zelllinie unbegrenz fortpflanzungsfähige Zellen einer Gewebeart darstellt.

Für die folgenden Experimente werden sowohl adhärente, d.h. auf der Oberfläche wachsende, Zellen (humane, epitheliale, colorektale, Adenokarzinom- Zellen- 2; Caco-2 Zellen) sowie im Nährmedium schwimmende Suspensionszellen (humane, leukämische Monozyten; THP-1 Monozyten) eingesetzt. Neben ausreichender Nahrung, dem passenden pH-Wert, einer 5%igen CO₂- Atmosphäre, einer Bruttemperatur von 37°C und einer antibakteriellen Umgebung verlangen Suspensions- sowie adhärente Zellen nach ausreichender Wachstumsmöglichkeit, weshalb spätestens beim Erreichen der Konfluenz passagiert werden muss. Um die Zellen von der Oberfläche zu lösen und neu zu kultivieren (passagieren) setzt man die Protease Trypsin ein.

Die Zellkulturen werden mit den zu untersuchenden Substanzen (in den folgenden Versuchen: bovines- sowie rekombinantes humes Laktoferrin) für eine bestimmte Zeit im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Je nach Methode werden die Zellen dann entweder in ihrem Verhalten beobachtet (Beobachtung der Zelladhäsion unter dem Mikroskop) oder für die darauf folgende Bestimmung lysiert (Bestimmung der Signaltransduktion mittels Westernblot; Bestimmung der Genexpression mittels rtPCR).

3.1.3 Durchführung

3.1.3.1 Kultivierung von Caco-2 Zellen

Herstellung des Mediums für die Caco-2 Zellkultur

Um gebrauchsfertiges Medium zu erhalten werden 500ml des Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 50ml fetalen Kälber Serum (engl.: fetal calv serum; FCS), 5ml 200mM L-Glutamin und 5ml 10.000U/ml Penicillin-Streptomycin (PEN-STREP) versetzt. Das FCS wie auch das L-Glutamin soll den Zellen als Nahrung dienen, das PEN-STREP hingegen soll unerwünschtes Bakterienwachstum hemmen. Das Medium wird bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Herstellung des Mediums für die THP-1 Zellkultur

Zur Herstellung des RPMI 1640 (RPMI: Roswell Park Memorial Institute) werden 104,3g des Mediapulvers unter Rühren in 9l Aqua dest. gelöst, der pH-Wert mit 37%iger HCl auf 7,25 eingestellt und danach mit Aqua dest. auf 10l aufgefüllt. Durch das Pumpen über einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2µm wird das Medium sterilisiert und kann anschließend in 450ml Portionen in sterile 500ml Glasflaschen abgefüllt werden. Auch dem RPMI 1640 Medium werden 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100U/ml Penicillin sowie 0,1mg/ml Streptomycin in gleichen Mengen wie dem DMEM zugesetzt. Das Medium wird bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37°C am Wasserbad erwärmt.

Kultivieren der Zellen

Wenn Zellkulturen als Versuchsmodell dienen ist immer darauf zu achten, dass unter bestmöglichen sterilen Bedingungen gearbeitet wird. Dies bedeutet Arbeiten unter der Laminar Flow und mit Einweghandschuhen sowie Verwendung von sterilen Glaspipetten, Zellkulturflaschen und Platten.

Generell werden sowohl Caco-2 als auch THP-1 Monozyten bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre in Kultur gehalten.

Die in 0,5ml unkomplimentiertem Medium und 0,5ml CRYO (CRYO= komplimentiertes Medium: FCS: DMSO = 5:3:2) gelagerten Caco-2 Zellen werden aus dem Gefrierschrank genommen (kurzfristige Lagerung: -80°C; längerfristige Lagerung: Flüssigstickstoff) und in steriler Umgebung in 5ml komplimentiertem DMEM aufgenommen und die 25ml Zellkulturflasche abschließend in den Brutschrank gestellt. Wenn die Caco-2 Zellen nach etwa 5 Tagen das konfluente Stadium erreicht haben, werden die Zellen passagiert.

THP-1 Monozyten werden in 20-30 ml RPMI in sterilen Zellkulturflaschen (75cm²) gezüchtet. Um die gewünschte Zellzahl von mind. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml zu erreichen, müssen die Zellen mehrere Tage im Brutschrank verweilen und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt werden. Die Zellzahl kann mit Hilfe des „Cell Counter and Analyser System Model TT“ (Casy®1) bestimmt werden, indem 50µl der Zell-Suspension zu 10ml Casy-Ton pipettiert werden und nach gleichmäßiger Vermischung luftblasenfrei vermessen werden.

Bevor mit den Zellen weitergearbeitet wird, muss deren Morphologie unter dem Mikroskop begutachtet werden.

Passagieren der Caco-2 Zellen

Komplimentiertes Dulbecco`s Modified Eagle Medium (K-DMEM) und Trypsin werden am Wasserbad bei 40°C aufgewärmt. Das Medium wird behutsam aus der zu passagierenden Zellkulturflasche (25cm² Bodenfläche) abgesaugt, 1,5ml Trypsin zugeben und etwa 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Überschüssiges Trypsin wird abgesaugt, die Zellen durch anschließendes Klopfen vom Boden der Flasche gelöst und in 5ml K-DMEM aufgenommen. Wird diese Passage nun auf z.Bsp. 4 Kulturflaschen (25 cm² Bodenfläche) aufgeteilt, müssen 15ml K-DMEM in einem Falcon vorgelegt werden, mit den zuvor vorbereiteten 5ml Caco-2 in K-DMEM vermischt und auf 4 Flaschen à 5ml aufgeteilt werden.

Aussetzen der Zellen

Wenn die Caco-2 Zellen eine 80%ige Konfluenz erreicht haben bzw. die THP-1 Monozyten eine Zellzahl von $1,2-1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ ml erreicht haben werden die Zellen ausgesetzt.

Unter Verwendung von 1,5ml Trypsin werden die Caco-2 Zellen vom Boden einer Zellkulturflasche gelöst (siehe Passagieren der Caco-2 Zellen), in 5ml K-DMEM aufgenommen, mit 10ml K-DMEM vermischt und gleichmäßig auf zwei 6-Well-Platten (1ml pro Well), zur Herstellung von undifferenzierten Caco-2 Zellen, bzw. auf eine 12-Well-Platte (2ml pro Well), zur Herstellung von differenzierten Caco-2 Zellen, aufgeteilt. Die Zellen lässt man im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ auf 60% Konfluenz (subkonfluente, undifferenzierte Zellen) bzw. 3 Wochen nach Erreichen der Konfluenz (differenzierte Zellen) wachsen, bevor man sie mit bovinem- und rekombinantem humanen Laktoferrin inkubiert.

THP-1 Monozyten werden bei einer Zelldichte von $1,2-1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ ml (für Westerblot und rtPCR Proben) bzw. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml (für Wachstumstests) in eine 12-Well-Platte (2ml pro Well für Westerblot und rtPCR Proben; 1ml pro Well für Wachstumstest) ausgesetzt und nach 1h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Inkubieren der Zellen

Durch Einsetzen des entsprechenden Volumens der Stocklösung im Zellkulturüberstand werden die Laktoferrin-Stocklösungen (rötlich, da Eisen hältig; bLF sowie rhLF: 20mg/ml) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Zellen werden anschließend für bestimmte Zeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dient 1x PBS!

Lysieren der Caco-2 Zellen für Westernblot (WB) und rt- Polymerasekettenreaktion (rtPCR)

Die Platten werden nach der Inkubation sofort auf Eis gestellt. Jedes Well wird 2x mit 2ml 1x PBS gewaschen, gut trocken gesaugt und wie folgt verarbeitet:

Für Westernblot: Die Zellen werden 10min mit Lysis Buffer: Proteaseinhibitor= 100:1 (200µl im Fall von differenzierten, bzw. 100µl, im Fall von undifferenzierten Zellen) inkubiert. Mit Hilfe eines Schabers werden die Zellen vom Boden gelöst und in ein Eppi überführt. Das Eppi wird in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, anschließend auf Eis aufgetaut und die Zellreste bei 4°C für 15 min bei 13.500rpm zu einem Pellet zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Für rtPCR: Die Zellen werden 5min mit 500µl TriFAST (TriFAST- Abfälle gesondert entsorgen, da giftig) inkubiert und anschließend in ein Eppi überführt. Im Fall von differenzierten Zellen wird zusätzlich 25min bei 4°C und 12.000g zentrifugiert, um mögliche, die Weiterverarbeitung behindernde, Rückstände zu entfernen. Der Überstand wird abschließend in ein neues Eppi überführt und dieses bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Lysieren der THP-1 Monozyten für Westernblot (WB) und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Platten werden aus dem Brutschrank entnommen und sofort auf Eis gestellt. Der Inhalt jedes Wells wird in je ein Eppi überführt, die Zellen durch vorsichtiges Zentrifugieren von der Lösung getrennt (5min bei 4°C und 1.200g) und 2x mit 2ml 1x PBS gewaschen (5min bei 4°C und 1200g), gut trocken gesaugt und wie folgt verarbeitet:

Für Westernblot: Die Zellen werden 10min mit 80µl Lysis Buffer: Proteaseinhibitor= 100:1 inkubiert, das Eppi in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, anschließend auf Eis aufgetaut und die Zellreste bei 4°C für 15 min bei 19.400g zu einem Pellet zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Für rtPCR: Die Zellen werden 5min mit 500µl TriFAST (TriFAST- Abfälle gesondert entsorgen, da giftig) inkubiert und anschließend in ein Eppi überführt und dieses bei 4°C für 15 min bei 12.000g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.2 Zellproliferationstests

3.2.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Laminar Flow Hood Biosafe 2	Ehret
Brutschrank Queue	Sanova
Mikroskop	Zeiss Axiovert 135
Cell Counter + Analyser System Model TT (Casy®1)	Schärfe Systeme GmbH
Wasserbad Thermo- Boy	MGW Lauda
Trockenschrank	Binder
Microplate Reader Model 550	Bio- Rad
8 Kanalpipette	Eppendorf Research
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen:	
<ul style="list-style-type: none"> • 12- Well- Platten (Wachstumsfläche: 3,8cm/ Well) • 96- Well- Platten (Wachstumsfläche: 0,32cm/ W.) 	Greiner Greiner
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)	Biochrom AG
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	BioWhittaker®, Lonza
Bovines Laktoferrin (bLF)	Morinaga Milk Industry
Rekombinantes Humanes Laktoferrin (rhLF)	Sigma
Phosphate- Buffered Saline [1*PBS (steril filtriert)]	
Sterilfilter (0,2µm Porendurchmesser)	Sartorius
Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK

3.2.2 Methode

Um die Proliferation von Zellen zu bestimmen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Proliferation der THP-1 Monozyten wird mit Hilfe des „Cell Counter and Analyser System Model TT“ (Casy®1), die der Caco-2 Zellen mittels MTT- Tests bestimmt. Bei

dem MTT- Test wird der Umsatz von Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazankomplex (Abb. 14) gemessen.

Die Reduktion von MTT findet im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt, wobei v.a. Nicotinamidadenindinucleotid (NADH), zu geringerem Ausmaß auch Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) und zu noch geringen Ausmaß Succinat in den Mitochondrien als Elektronen- Donor fungieren.

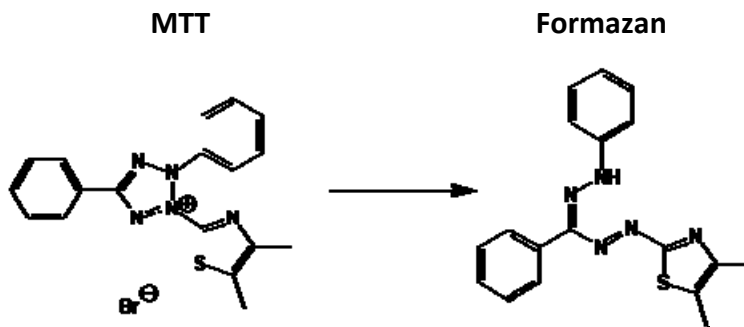


Abb. 14: Reduktion von Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazankomplex.

3.2.3 Durchführung

MTT Test (Caco-2 Zellen)

Die Caco-2 Zellen werden in Schlangenlinien und der Reihenfolge: links nach rechts, oben nach unten, auf einer 96-Well-Platte vereinzelt ausgesetzt (100µl/Well) und für einen Tag im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Anschließend werden die Wells (subkonfluent: 20- 40%) mit den Laktoferrin-Lösungen (bLF, rhLF) gewünschter Konzentration (0,5µg/ml, 5µg/ml, 50µg/ml und 500µg/ml) sowie 1x PBS (als Kontrollprobe) in der Reihenfolge: oben nach unten und links nach rechts, versetzt und für 24h bzw. 72h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Da es sich bei Caco-2 um adhärenente Zellen handelt kann die Lösung durch einfache Kippbewegungen aus der Platte entfernt werden. Die Platte wird nun zweimal mit 1x PBS (200µl/ Well) unter Hilfenahme einer 8- Kanalpipette gewaschen und anschließend mit einer 10%igen Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT)- Lösung (200µl/ Well; MTT:

unkomplimentiertem DMEM= 1:10) versetzt um nochmals für 1h im Brutschrank zu verweilen. Währenddessen wird das MTT zu einem Formazankomplex reduziert (Abb. 14), welcher sich als violette Kristallisation im Inneren der Caco-2 Zellen äußert.

Nach Begutachtung unter dem Mikroskop wird die Lösung abermals durch Kipp- und schwache Klopfbewegungen der Platte entzogen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 1x PBS (200µl/ Well) unter Zuhilfenahme einer 8- Kanalpipette gewaschen und dann mit Dimethylsulfoxid (DMSO; 50µl/ Well; Achtung: toxisch) lysiert.

Abschließend wird die Extinktion der einzelnen Lösungen und des Blindwertes (DMSO) bei 570nm gemessen, die Ergebnisse in eine „Excel- Datei“ übertragen, die relative Wachstumsrate im Bezug zur Kontrolle errechnet und graphisch mit Hilfe des Programms „Prism 3.0“ dargestellt.

Zellzahlbestimmung mit dem Casy®1 (THP-1 Monozyten)

Die THP-1 Monozyten werden in Schlangenlinien und der Reihenfolge: oben nach unten und links nach rechts, auf einer 12-Well-Platte vereinzelt ausgesetzt ($0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml; 1ml/ Well). Anschließend werden die Wells mit den Laktoferrin-Lösungen (bLF, rhLF) gewünschter Konzentration (0,5µg/ml, 5µg/ml, 50µg/ml und 500µg/ml) sowie 1x PBS (als Kontrollprobe) in der Reihenfolge: links nach rechts oben nach unten, versetzt und für insgesamt 72h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellzahl wird vor und nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Hilfe des „Cell Counter and Analyser System Model TT“ (Casy®1) bestimmt, die Ergebnisse in eine „Excel- Datei“ übertragen, die relative Wachstumsrate im Bezug zur Kontrolle errechnet und graphisch mit Hilfe des Programms „Prism 3.0“ dargestellt.

Um Proben für Gelatine-Zymogramme zu erhalten, werden nach erfolgter 72h Inkubation mit den Laktoferrin-Lösungen die Inhalte der Wells in Eppis überführt, bei 4°C und 1.200g für 10min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppi überführt und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.3 Gelatine-Zymogramm

3.3.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

***10% Sodiumdodecylsulfate (10% SDS- Lösung, 100 ml):**

***10% Ammoniumpersulfate (10% APS)**

***3M Tris- HCl, pH= 8,45, 0,3% SDS, 500ml**

***4x Sample Buffer (ohne Mercaptoethanol)**

***10x Tris-Glycin Buffer**

***30% Acrylamid/Bis (29:1)**

TEMED

GERBU

Isopropanol 30%

MERCK

Ethanol 70%

MERCK

Glasplatten 0,75mm

Bio-Rad

10-Well-Kämme 0,75mm

Bio-Rad

Mini-PROTEANR II Apparatur

Bio-Rad

Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN_R

Bio-Rad

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder

Fermentas

0,5%ige Gelatine- Lösung, 100ml:

- 0,5g Gelatine
- in 100ml Aqua dest. lösen

Sigma

10%ige Fetales Kälberserum- Lösung (FCS), 100ml:

- 10g FCS
- in 100ml Aqua dest. lösen

0,2%ige Coomassie Stock- Lösung, 200ml:

- 1 Tablette Coomassie R350 stain
- 80ml Aqua dest.
- 120ml Methanol
- Bei 4°C lagern

MERCK

0,1%ige Färbelösung, 100ml:

- 50ml 0,2%ige Coomassie Lösung
- 10ml Essigsäure MERCK
- 40ml Aqua dest.
- bei 4°C lagern

Entfärbelösung, 1000ml:

- 700ml Aqua dest.
- 200ml Methanol MERCK
- 100ml Essigsäure MERCK
- Lagern bei 4°C

Washing Buffer, 500ml:

- 3g TRIS MERCK
- 12,5ml Triton
- in 500ml Aqua dest. lösen
- mit HCl 37%ig auf pH=7,5 MERCK
- bei 4°C lagern

Inkubationsbuffer, 1000ml:

- 6g TRIS MERCK
- 11,6g CaCl₂ MERCK
- 1,47g NaCl MERCK
- in 1000ml Aqua dest. lösen
- mit HCl 37%ig auf pH=7,5 MERCK

Light Boy

Color-Control

Chemilmager™ 4400

Biozym

AlphaEaseFC- Chemilmager™ 4400

Alpha Innotec

*Herstellung dieser Lösung siehe 3.6. Westernblot

3.3.2 Methode

Um die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) bestimmen zu können, bedient man sich einer Methode bei der die Enzymaktivität durch

Substratabbau nachgewiesen wird, dem sog. Zymogramm. Aktivierte MMPs sowie Pro-MMPs (Konformationsänderung durch SDS) sind in der Lage, das im Trenngel enthaltene Substrat (Gelatine) abzubauen. Je höher die Aktivität der Enzyme, desto mehr Substrat wird verwertet und desto weniger kann Coomassie Brilliant Blau sich an vorzugsweise basische Aminosäuren binden. Im fertigen Gel bleiben die Proteinbanden also ungefärbt, während das restliche Gel dunkelblau erscheint. Die Unterscheidung zwischen der Pro- und der aktivierten Form erfolgt anhand der Größe.

3.3.3 Durchführung

Gele bereitstellen

Das Gel für die Proteinauftrennung besteht aus einem 8%igen Sammel- und einem 4%igen Trenngel (Tab.2). Das Trenngel wird laut Pipettierschema (s.u.) in einem 15ml Falcon hergestellt (inkl. Gelatine aus Substrat) und gut gevortext. Danach wird es etwa 5cm hoch in einen 0,75mm Spalt zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen und mit 30%igem iso- Propanol überschichtet.

Tab. 2: Pipettierschema zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels.

	<u>8%iges Trenngel :</u>	<u>4%iges Sammelgel:</u>
Aqua dest.	3,6ml	1,54ml
Tris-Cl/pH 8,45/0,3% SDS	3ml	0,62ml
Acrylamid (Achtung: krebserregend)	2,4ml	0,34ml
APS	45µl	20µl
TEMED	4,5µl	2µl
Gelatine (als Substrat)	90µl	

Die Polymerisation des Acrylamids wird durch Ammoniumpersulfat (APS), als Radikalgenerierer, und TEMED, als Katalysator, in Gang gesetzt und macht dieses somit ungefährlich. In flüssigem Zustand ist Acrylamid jedoch stark krebserregend, weshalb beim Pipettieren Vorsicht geboten ist.

Nach 30min Stehzeit ist das Trenngel polymerisiert und kann nun vom iso- Propanol befreit werden. Anschließend wird es gut mit Aqua dest. gewaschen, mit Filterpapier

gereinigt, mit dem Sammelgel (s.o.) überschichtet und mit dem geeigneten Kamm versehen. Nach einer 30-minütigen Wartezeit ist das Gel fertig und kann in eine ELFO Kammer, mit Kammseite nach Innen, eingesetzt werden.

Proben vorbereiten

Da die Überstände der THP-1 Wachstumstestproben auf die Zellzahl normiert auf das Gel aufgetragen werden, müssen diese zuerst mittels Verdünnung auf ein äquivalentes Niveau gebracht werden. Die Daten des Proliferationstests dienen dabei als Berechnungsgrundlage, das 1x PBS als Verdünnungsmedium. Zelllysate einer Serie werden nun mit 1x PBS der niedrigsten Konzentration dieser Serie angepasst. Danach werden die Proben mit 4-fach Samplebuffer (Herstellung s.o.; ähnlich dem Westernblot, nur ohne Mercaptoethanol) so versetzt, dass dieser in der fertigen Probe nun 1-fach vorliegt.

Proben auf das Gel auftragen

Die Kammer wird mit 1x Tris-Glycin Buffer (Herstellung durch 10-fach Verdünnung aus 10x Tris-Glycin Buffer; s.o.) befüllt, die Gele von den Kämmen vorsichtig befreit und die einzelnen Geltaschen mit Hilfe einer Spritze, mit 1x Tris-Glycin behutsam gespült. Die gevortexten Proben werden nun in die Geltaschen luftblasenfrei pipettiert (maximales Füllvolumen der Geltaschen: 10er Kämmen= 25µl; 15er Kämmen= 15µl), wobei die 1. Geltasche ausgelassen wird, da diese für 3µl der Proteinleiter vorgesehen ist. Zusätzlich zu den Proben wird als Blindwert Medium (DMEM + 10% FCS) aufgetragen.

ELFO durchführen

Die Proteine werden bei 180V und einer Außentemperatur von 4°C für 1,5h elektrophoretisch getrennt.

Inkubation

Nach 3 fachem Waschen des Gels mit dem Zymogramm-Washing-Buffer wird dieses gut mit Aqua dest. gespült und danach für 17-18h (über Nacht) im Inkubationbuffer

(enthält Calcium, welches für die Aktivität der MMPs notwendig ist) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Färbung

Nach vollendeter Inkubation wird der Buffer entfernt, das Gel mit Aqua dest. gespült und mit 0,1%iger Coomassie-Lösung (Färbelösung; engl. staining solution) für 1h am Belly Dancer (Stufe 3) blau gefärbt. Nach Begutachtung der Färbung am Light Boy wird das Färbemedium in die Originalflasche zurückgeleert (Wiederverwendung möglich) und das Gel nun am Belly Dancer so lange in der Entfärbelösung (engl.: destaining solution) geschwenkt bis sich die Banden entfärbt haben. Das Ergebnis wird nun abermals am Light Boy überprüft und anschließend mit Hilfe des ChemilmagerTM 4400 digital fotografiert.

3.4 Proteinbestimmung (Photometrisch)

3.4.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

Microplate Reader Model 550	Bio- Rad
8 Kanalpipette	Eppendorf 300 Research
96- Well- Platte	Greiner
Parafilm	Manesha
Belly Dancer	Stovall Lifesciences
Prism 3.02	GraphPad
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
<ul style="list-style-type: none"> • BCA Protein Solution A; B • Standard: Bovines Serum Albumin (BSA; 2 mg/ml) 	

3.4.2 Methode

Bei der Proteinbestimmung handelt es sich, wie der Name schon verrät, um die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate mittels Photometrie.

3.4.3 Durchführung:

Da es sich um eine photometrische Methode handelt, bedient man sich einer Standardgerade als Bezugspunkt. Ausgehend von einer BSA- Lösung mit der Konzentration von 2mg BSA/ ml werden insgesamt 8 Standardlösungen, 6 davon über eine 2er Verdünnung mit dest. Wasser, hergestellt, wobei der höchste Level aus der Ausgangslösung und der niedrigste aus reinem dest. Wasser besteht (L1: 2-, L2: 1-, L3: 0,5-, L4: 0,25-, L5: 0,125-, L6: 0,0675-, L7: 0,03375- und L8: 0mg BSA/ml).

Die zu bestimmenden Proben werden 1:5 mit dest. Wasser verdünnt. Anschließend werden 10µl sowohl der Standardlösungen als auch der zu bestimmenden Proben in 3-fach Bestimmung auf eine 96-Well Platte aufgetragen und mit 200µl eines Gemisches aus Protein Solution A: Protein Solution B= 50: 1 vereinigt. Die Platte wird mit Parafilm

bedeckt für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Farbreaktion durchzuführen.

Nachdem die Platte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird die Extinktion bei 570nm gemessen und die Konzentration anschließend über die Geradengleichung der Standardgerade zurück gerechnet.

3.5 Western Blot

3.5.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

3.5.1.1 Für Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE):

Mini-PROTEAN II Apparatur	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN_R	Bio-Rad
10% Sodiumdodecylsulfate (10% SDS- Lösung, 100ml):	
<ul style="list-style-type: none"> • 10g SDS ultra pure • Aqua dest. (auffüllen bis zur 100ml Marke) • bei Raumtemperatur lagern 	Roth
10% Ammoniumpersulfate (10% APS)	
<ul style="list-style-type: none"> • 0,1g Ammoniumpersulfat • in 1ml Aqua dest. lösen • Lagerung der 50µl Aliquote bei -20°C 	Pharmacia Biotech
3 M Tris- HCl, pH= 8,45, 0,3% SDS, 500ml	
<ul style="list-style-type: none"> • 182g Tris- (hydroxymethyl)- aminoethan; Tris Base • in 400ml Aqua dest. lösen • HCl 37% zur pH-Wert Einstellung • 1,5g SDS ultra pure • Aqua dest. (auffüllen bis zur 500ml Marke) 	Roth MERCK Roth
4x Sample Buffer, 1ml:	
<ul style="list-style-type: none"> • 500µl Glycerol (87%) • 240µl 0,5 M Tris- HCl (pH= 6,8) • 210µl Aqua dest. • 0,8g SDS • 50µl 2- Mercaptoethanol • Spatelspitze Bromphenolblau 	MERCK Roth MERCK MERCK

10x Tris-Glycin Buffer; 1000ml:

- 30g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris Base) Roth
- 144g Glycin Roth
- 100ml 10% SDS-Lösung
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei Raumtemperatur

30% Acrylamid/Bis (29:1):

- 29g Acrylamid Sigma
- 1g Bis Sigma
- in 100ml Aqua dest. lösen

TEMED GERBU

Isopropanol 30% MERCK

Ethanol 70% MERCK

Glasplatten 0,75mm Bio-Rad

10-Well-Kämme 0,75mm Bio-Rad

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Fermentas

3.5.1.2 Für Transferblot und Weiterverarbeitung:

Pure Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) Trans-Blot[®] Biorad

Mini-Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell Biorad

Belly Dancer Stovall Lifesciences

Transfer Buffer; 1000 ml:

- 100ml 10 x Tris-Glycin Buffer
- 200ml Methanol MERCK
- 1 ml 10% SDS-Lösung
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4°C

Ponceau S; 1000ml:

- 10g Ponceau S MERCK
- 300g Trichloressigsäure MERCK
- 300g Sulfosalicylsäure
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei Raumtemperatur

10x TBS Buffer; pH 7,4, 1000 ml:

- 24,2g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan; Tris Base Roth
- 84,8g NaCl Roth
- mit Aqua dest. auffüllen
- HCl (37%) zur Einstellung des pH-Wertes MERCK
- Lagerung bei 4 °C

Washing Buffer; 1000ml:

- 100ml 10 x TBS
- 1ml Tween20 MERCK
- mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4°C

Blocking Buffer:

- 2,5g Magermilchpulver Fixmilch INSTANT
- in 50ml Washing Buffer gelöst

Primar-Antikörper-Lösung:

- 10ml Washing Buffer
- 0,3g BSA Amresco
- Spatelspitze Natriumazid NaN_3
- Lagerung bei 4°C

Sekundär-Antikörper-Lösung:

- Goat Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP Conjugate Bio-Rad
- Goat anti-mouse-IgG (H+L)-HRP Conjugate Bio-Rad
- 1:100000 in Blocking Buffer kurz vor Gebrauch lösen

SuperSignal[®] West Femto; West Dura	Pierce
IMAGER, Fusiouon FX7	PEQLAB
Prism 3.02	GraphPad

3.5.2 Methode

Der Westernblot erhielt seinen Namen als Pendant zum Southernblot, mit dem man DNA-Fragmente, und dem Northernblot, mit dem man RNA-Fragmente sichtbar machen kann. Mit dem Westernblot ist es nun möglich Proteine zu visualisieren.

In den folgenden Versuchen wird untersucht, ob ein bestimmter Signaltransduktionsweg aktiviert wurde, indem die zu diesem Weg zugehörigen Signalproteine betrachtet werden. Ob nun eine Aktivitätserhöhung durch Laktoferrininkubation stattgefunden hat, lässt sich mittels Vergleich mit einer Kontrollprobe ohne Laktoferrininkubation klären.

3.5.3 Durchführung:

3.5.3.1 Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE):

Bereitstellung der Gele

Das Gel für die Proteinauftrennung besteht aus einem 10%igen Sammel- und einem 4%igen Trenngel (Tab. 3). Das Trenngel wird laut Pipettierschema (s.u.) in einem 15ml Falcon hergestellt und gut gevortext. Danach wird dieses etwa 5cm hoch in einen 0,75mm Spalt zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen und mit 30%igem iso- Propanol überschichtet.

Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels.

	<u>10%iges Trenngel :</u>	<u>4%iges Sammelgel :</u>
Aqua dest.	2ml	1,54ml
Tris-Cl/pH 8,45/0,3% SDS	2ml	0,62ml
Acrylamid (Achtung : krebserregend)	2ml	0,34ml
APS	30µl	20µl
TEMED	3µl	2µl

Die Polymerisation des Acrylamids wird durch Ammoniumpersulfat (APS), als Radikalgenerierer, und TEMED, als Katalysator, in Gang gesetzt und macht dieses somit ungefährlich. Im flüssigen Zustand jedoch ist Acrylamid stark krebserregend, weshalb beim Pipettieren Vorsicht geboten ist.

Nach 30min Stehzeit ist das Trenngel polymerisiert und kann nun von iso- Propanol befreit und gut mit Aqua dest. gewaschen werden. Anschließend wird es mit Filterpapier gereinigt, mit dem Sammelgel (s.o.) überschichtet und mit dem geeigneten Kamm versehen. Nach einer erneuten Wartezeit von 30min ist das Gel fertig und kann in eine ELFO Kammer, mit Kammseite nach Innen, eingesetzt werden.

Vorbereitung der Proben

Da die Zellysateproben in gleicher Proteinkonzentration auf das Gel aufgetragen werden, müssen diese zuerst mittels Verdünnung auf äquivalentes Niveau gebracht werden. Die Daten der Proteinbestimmung dienen hierbei als Berechnungsgrundlage, das 1x PBS als Verdünnungsmedium. Zellysate einer Serie werden nun mit 1x PBS der niedrigsten Konzentration dieser Serie angepasst. Danach werden die Proben mit 4-fach Samplebuffer (Erstellung s.o.) so versetzt, dass dieser in der fertigen Probe nun 1-fach vorliegt.

Auftragen der Proben auf das Gel

Die Kammer wird mit 1x Tris-Glycin Buffer (Herstellung durch 10-fach Verdünnung aus 10x Tris-Glycin Buffer; s.o.) befüllt, die Gele von den Kämmen vorsichtig befreit und die einzelnen Geltaschen mit Hilfe einer Spritze mit 1x Tris-Glycin behutsam gespült. Die gevortexten Proben werden nun in die Geltaschen luftblasenfrei pipettiert (maximales Füllvolumen der Geltaschen: 10er Kämmen= 25µl; 15er Kämmen= 15µl), wobei die 1. Geltasche ausgelassen wird, da diese für 3µl der Proteinleiter vorgesehen ist.

Durchführung der ELFO

Die Proteine werden bei 180V und einer Außentemperatur von 4°C für 1,5h elektrophoretisch aufgetrennt.

Erstellung des Blots

Bevor die ELFO beendet wird, werden die nötigen Materialien für den Transferblot vorbereitet. Für jedes Gel benötigt man eine Spange, versehen mit zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren und einem Streifen Nitrocellulose passender Größe. Alle verwendeten Materialien werden vor Gebrauch in Transferbuffer getränkt.

Die ELFO-Kammer wird geöffnet, die Gele entnommen und eine Glasplatte abgehoben. Nun kürzt man das Gel mit einer Rasierklinge auf die gewünschte Größe. Als Hilfestellung dient die Proteinleiter, anhand derer man die Lage des gesuchten Proteins feststellen kann (Abb. 15). Das Bromphenolblau zeigt die Lauffront an. Anschließend wird das Gel mit Hilfe eines Spatels vorsichtig auf die Nitrocellulose übertragen und luftblasenfrei geglättet.

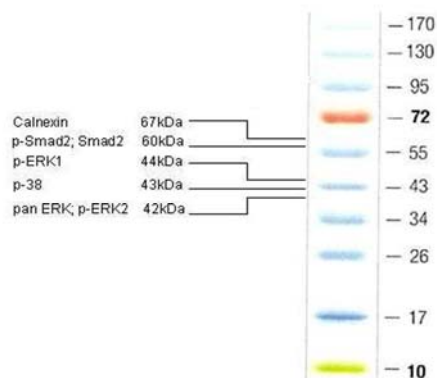


Abb. 15: Proteinleiter [in kDa] inklusive der Position der zu bestimmenden Proteine.

Die Spange wird geschlossen und in die mit Transferbuffer gefüllte und mit Eisbehälter versehene Transferkammer eingesetzt. Dadurch können die Proteine auf die Nitrocellulose geblottet werden (Abb. 16), d.h. von der Kammermitte aus kommt zuerst die Nitrocellulose, dann das Gel, da der Stromfluss von außen nach innen verläuft. Die Kammer wird in den Kühlschrank gestellt um bei 4°C und 400mA den 45minütigen Transferblot durchzuführen.



Abb. 16: Schema der Anordnung der einzelnen Bestandteile der Transferkassette.

Überprüfen des Ergebnisses mittels Ponceau- Färbung

Nachdem die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose transferiert wurden, wird die Nitrocellulose entnommen und diese für 2min mit einer Ponceau Färbelösung inkubiert. Anschließendes Schwenken in Aqua dest. entfernt überschüssige Farbe und lässt die rot gefärbten Proteinbanden in Erscheinung treten.

Blocken der Nitrocellulose

Damit der primäre Antikörper (prim. AK) wirklich nur an der gewünschten Position bindet, müssen Nitrocellulosefragmente geblockt werden. Dies erreicht man durch einstündige Inkubation der Nitrocellulose mit Blockingbuffer (Herstellung s.o.) am Bellydancer (Stufe 3). Nach dem Blocken wird die Nitrocellulose 2x für 5min mit Washingbuffer am Bellydancer von Blockingbuffer- Resten befreit.

Inkubation mit primärem Antikörper (prim. AK; gegen zu bestimmendes Protein gerichtet)

Die Nitrocellulose wird über Nacht bei 4°C in einer prim. AK- Lösung am Bellydancer bei Stufe 1 geschwenkt (Herstellung der prim. AK- Lösungen siehe Tab. 4).

Tab. 4: Herstellung der prim. AK- Lösungen (verdünnt mit 3%iger BSA-Lösung; inklusive Zufügen einer Spatelspitze Natriumazid).

Antikörper	Molmasse	Isotyp	Verdünnung	Bezugsfirma
panERK	42kDa	Mouse IgG2a	1 : 3000	BD Biosciences
p-ERK 1/ 2	44/ 42kDa	Rabbit IgG	1 : 3000	Cell Signalling
p-p38 MAPK	43kDa	Rabbit IgG	1 : 3000	Cell Signaling
Calnexin	67kDa	Rabbit IgG	1 : 3000	Abcam
Smad2	60kDa	Rabbit IgG	1 : 3000	Cell Signaling
p-Smad2	60kDa	Rabbit IgG	1 : 3000	Cell Signaling

Inkubation mit sekundärem Antikörper (sek. AK; gegen primären Antikörper gerichtet)

Die prim. AK-Lösung wird nun in den Falcon zurückpipettiert, da man diese wieder verwenden kann. Anschließend wird die Nitrocellulose 3x mit Washingbuffer am Bellydancer (Stufe 3) für jeweils 10min gewaschen, danach mit sek. AK- Lösung (sek. AK: Blockingbuffer = 1:10000) für 1 h am Bellydancer inkubiert und abschließend nochmals 3 x wie oben beschrieben gewaschen.

Inkubation mit Photoreagenz (Chemilumineszenz Reagenz)

Die Nitrocellulose wird vom Washingbuffer befreit und mit der geringstmöglichen Menge an Chemilumineszenz Reagenz (1:1 Gemisch der beiden in einer Packung enthaltenen Lösungen) beträufelt. Anschließend wird sie 5 min im Dunkeln inkubiert.

Entwicklung eines Photos (mittels Imager-Gerät)

Die Nitrocellulose wird luftblasenfrei in eine Frischhaltefolie gewickelt und im Imager positioniert. Nun wird die Chemilumineszenz festgehalten. Bei der Entwicklung eines Photos ist darauf zu achten, dass man die höchstmögliche Auflösung verwendet und den höchstmöglichen Sättigungsgrad erreicht (ohne 100%ige Sättigung zu erhalten).

3.6 Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion (rtPCR)

3.6.1 Verwendete Geräte/Materialien/Reagenzien

3.6.1.1 Für RNA Isolierung und reverse Transkription

Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf 5417R
Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Phase Lock Gel Tubes	PEQLAB
PCR- Tubes	PEQLAB
NanoDrop™ ND 1000	Thermo Scientific
DEPC	Sigma
DEPC-Wasser RNasefrei	
<ul style="list-style-type: none"> • 100µl DEPC • in 1l Aqua dest. 3h unter Abzug lösen • 2h bei 120°C autoklavieren 	
DEPC-Pipettenspitzen, -Reaktionsgefase RNasefrei	
<ul style="list-style-type: none"> • in DEPC-Wasser über Nacht tränken • 2h bei 120°C autoklavieren; bei 70°C trocknen 	
Chloroform	MERCK
Isopropanol	MERCK
Ethanol 75% in DEPC-Wasser	MERCK
Random Hexamer Primer 0,2µg/µl	Fermentas
Reaction Buffer (5x)	Fermentas
dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 100mM)	Fermentas
dNTPs 10mM ; 100µl:	
<ul style="list-style-type: none"> • 80µl Aqua dest. steril filtriert • je 5µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM 	
RiboLock™ RNase Inhibitor 40U/µl	Fermentas
RevertAid™ M-MuLV ReverseTranskriptase 200U/µl	Fermentas

3.6.1.2 Für PCR

Thermo Cycler	MWG Biotech Primus
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Elektrophoresestation	Bio-Rad
Mikrowelle	Moulinex
PCR-Tubes	PEQLAB
Sterilfilter (0,45µm Porendurchmesser)	Sartorius
Aqua dest. steril filtriert	
Buffer Taq buffer + KCl 10x	Fermentas
MgCl₂ 25mM	Fermentas
dNTP Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM)	Fermentas
dNTPs 10mM ; 100µl:	
<ul style="list-style-type: none">• 180µl Aqua dest. steril filtriert• je 5µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM	
Taq DNA Polymerase recombinant 1 U/µl	Fermentas
Gen-spezifische Primer 100µM:	VBC-Genomics
<ul style="list-style-type: none">• Primerdesign mit PRIMER3 Software• 1:10 mit Aqua dest. steril filtriert (10µM)	
5 x TBE Buffer; 1000 ml:	
<ul style="list-style-type: none">• 54g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan• 27,5g Borsäure H₃BO₃• 20ml 0,5M EDTA-Lösung	MERCK MERCK
0,5M EDTA-Lösung; pH= 8, 500ml:	
<ul style="list-style-type: none">• 93g Titriplex• in 400ml Aqua dest. lösen• 10N NaOH zur Einstellung des pH-Wertes• mit Aqua dest. auffüllen• Lagerung bei Raumtemperatur	MERCK MERCK
Agarose-Pulver	MERCK

Ethidiumbromid	MERCK
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
6x Loading Dye	Fermentas
UV Transilluminator	UVP
Chemilmager™ 4400	Biozym
AlphaEaseFC-Chemilmager 4400	Alpha Innotec

3.6.2 Methode

Mit Hilfe der rtPCR lässt sich die Expression ausgewählter Gene bzw. die Expressionssteigerung oder Expressionsminderung durch Inkubation der Zelle mit einer bestimmten Substanz, in diesem Fall Laktoferrin, nachverfolgen. Als Spiegel der Expression dient die messengerRNA (mRNA), die zuerst isoliert und anschließend mit Hilfe der reversen Transkriptase in die complimentary DNA (cDNA) „umgeschrieben“ wird.

Mit der so erhaltenen cDNA lassen sich nun beliebig viele PCRs durchführen, wobei darauf zu achten ist, dass man das zu bestimmende Gen durch Verwendung der passenden Primer (Tab. 5) erhält. Die Primer wurden mit Hilfe des Primer 3 Programms selbst designed und mit dem BLAST Programm der NCBI Homepage auf Genspezifität geprüft.

Tab. 5: Zeigt die Nukleotidsequenzen der forward and reverse Primer, der zu amplifizierenden Gene sowie deren Annealingtemperatur (AT), Zyklenoptimum (ZO) und die Größe des Amplicons. (GAPDH: Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase; PAI-1: Plasminogen Aktivator Inhibitor-1; uPA:Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator; ICAM-1: Inter-Cellular Adhesion Molecule- 1; MMP-1, 2, 3, 9: Matrix Metalloproteinase-1, 2, 3, 9; CD-163: Cluster of Differentiation-163; a2M: alpha-2-Macroglobulin; LRP-1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1)

Gen	Nukleotidsequenz: Forward Primer Revert Primer	AT	ZO	Amplicon
GAPDH	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3' 5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'	62	23	185
PAI-1	5'-TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT-3' 5'-CGG TCA TTC CCA GGT TCT CTA-3'	61	30	399
uPA	5'-CCA AGG AGG GCA GGT GTG CG-3' 5'-CGG GTG GTG CCC GTT TCC TC-3'	67	30	480
ICAM-1	5'-CGT GTC CTG TAT GGC CCC CG -3' 5'-GGG AGG CGT GGC TTG TGT GT -3'	70	30	426
MMP-1	5'-CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A-3' 5'-AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T-3'	61	30	787
MMP-2	5'-GTG CTG AAG GAC ACA CTA AAG AAG A-3' 5'- TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G-3'	61	30	605
MMP-3	5'-GAA ATG CAG AAG TTC CTT GG-3' 5'-GTG AAA GAG ACC CAG GGA GTG-3'	60	30	489
MMP-9	5'-ATT CAG GGA GAC GCC CAT TT-3' 5'-GTG CAG GCG GAG TAG GAT TG-3'	63	30	317
CD-163	5'-GCC ACA ACA GGT CGC TCA TCC C-3' 5'-TCA GAA TGG CCT CCT TTT CCA TTC CA-3'	67	30	322
a2M	5'-ACA GCA CAA GAA GGG GAC CA-3' 5'-ACT GTG TCC TGG GTG GAG GA-3'	63	30	365
LRP-1	5'-CAA CAA CAG CAC CTG CAC TGT CAA CCA G-3' 5'-GGA CTC GCC GCT TAT ACC AGA ATA CCA C-3'	67	30	515

3.6.3 Durchführung

3.6.3.1 RNA-Isolierung und reverse Transkription

RNA Isolierung

Die in TriFAST lysierten Proben werden im Abzug aufgetaut und gleichzeitig die gleiche Anzahl an Phase lock gel tubes (PLGT) für 5 Minuten bei 15.000g zentrifugiert. Wenn das Gel erfolgreich am Boden des PLGT sitzt, werden 100µl Chloroform und 500µl Probe zugegeben und diese Mischung anschließend für 20 Sekunden intensiv geschüttelt, nicht gevortext. Während nun das hellrosa farbene Gemisch für 5min bei 12.000*g zentrifugiert, wird Eis vorbereitet, da ab diesem Zeitpunkt bei 4°C gearbeitet werden muss. Für jedes PLGT wird ein mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)- Wasser behandeltes Eppi auf Eis mit 250µl 4°C kalten iso- Propanol vorbereitet.

Die DEPC- Wasser- Behandlung der Eppis und der Pipettenspitzen sowie die spätere Verwendung des DEPC- Wassers selbst ist nötig, da DEPC die Ribonuclease (RNase) Aktivität inhibiert und somit den unter normalen Zuständen verlaufenden Abbau der RNA verhindert. Diethylpyrocarbonat ist sehr giftig und leicht flüchtig, weshalb nur im Abzug gearbeitet werden darf. Nach dem Autoklavieren verliert sich die gesundheitsschädliche Wirkung von DEPC, da es während dieses Vorgangs in Ethanol und Kohlendioxyd (CO₂) zerfallen ist.

Nach dem Zentrifugieren wird das überstehende Wasser, das sich im PLGT befindet, auf das vorgelegte iso-Propanol pipettiert (auf gleiches Volumen bei jeder Probe achten) und danach für 1-2 Stunden, abh. von der Dichte der verwendeten Zellen (differenzierte Zellen < 1h; undiff. Zellen 1h bis zu 1 Tag), bei -20°C gelagert.

Die ausgefallene RNA wird nun bei 4°C und 12.000g für 10min zentrifugiert, um ein Pellet am Boden des Eppis zu erhalten. Dieses Pellet wird nun 2x mit 1 ml 4°C kalten, 75%igen Ethanol wie folgt gewaschen: Ethanol zugeben, vortexen, 10min bei 4°C und 12.000g zentrifugieren, Ethanol verwerfen. Das Pellet durch den Luftzug in der

Laminarflow antrocknen lassen und zügig mit der „Umschreibung“, wie die reverse Transkription ugs. genannt wird, fortfahren.

Reverse Transkription

Wichtig: Pro Probe und Umschreibung werden **20µl Gesamtvolumen** zur Berechnung herangezogen!

Das trockene Pellet wird in **14µl** (14µl= 12µl + Sicherheitszuschlag von 2µl) DEPC-Wasser suspendiert und innerhalb von 10 min am 55°C heißen Wasserbad gelöst. Danach werden 12µl der gelösten RNA in ein PCR-Tube überführt und auf Eis weiterverarbeitet. 1µl Random Hexamer Primer wird zugefügt und für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert, damit sich die Primer anlagern können und sich die Tertiärstruktur der RNA findet. Die passende programmierte Methode wurde mit RT1 eingespeichert. Während der 10 min Inkubation wird der Mastermix laut Tab. 6 (s.u.) vorbereitet. **7µl** des Mastermixes werden zur Probe pipettiert, gevortext und danach bei 37°C für 1 h und anschließend 60°C für 10 min im Thermocycler zur cDNA umgeschrieben. In diesem Fall nennt sich die passende programmierte Methode RT2. Bis zur Verwendung der cDNA für die PCR wird die Probe bei -20°C gelagert.

Tab. 6: Pipettierschema für den Mastermix der Umschreibung, mit Beispielsrechnung für 3 Proben, da meist 3 Proben gleichzeitig aufgearbeitet wurden. Wird ein Volumen später aliquotiert, muss zuvor ein Sicherheitszuschlag (SZ) von 10% berücksichtigt werden.

Umschreibung	Ausgangs-Konzentration	Endkonzentration in 20µl	Volumen 1x	Volumen 3,3x (inkl. SZ)
RT Buffer	5x	1x	4µl	13,2µl
dNTPs	10mM	1mM	2µl	6,6µl
RNAse Inhibitor	40U/ µl	1U/ µl	0,5µl	1,7µl
Reverse Transkriptase	200U/ µl	5U/ µl	0,5µl	1,7µl

3.6.3.2 PCR

PCR Vorbereitung

Da bei 4°C gearbeitet werden muss, werden alle benötigten Materialien und Proben auf Eis aufgetaut. Für jedes zu amplifizierende Gen benötigt man einen Mastermix, der laut Tab. 7 in einem kleinen Eppi zusammengefügt wird. Die einzelnen Lösungen werden vor dem Pipettieren, der fertige Mastermix danach kurz gevortext. Wird dasselbe Gen in 3 Proben vervielfältigt, kann die 3-fache Menge des Mastermixes vorbereitet und diese dann aliquot aufgeteilt werden.

Tab. 7: Pipettierschema für den Mastermix des PCR- Ansatzes, mit Beispielsrechnung für 3 Proben, da meist 3 Proben gleichzeitig verarbeitet wurden. Wird ein Volumen später aliquotiert, muss zuvor ein Sicherheitszuschlag (SZ) von 10% berücksichtigt werden.

PCR-Ansatz	Volumen 1x	Volumen 3,3x (inkl. SZ)
Aqua dest. steril filtriert	31µl	102,3µl
Buffer Taq buffer+ KCl 10x	5µl	16,5µl
Mg ₂ Cl ₂ , 25mM	5µl	16,5µl
dNTPs, 10mM	4µl	13,2µl
Primer a, 10µM	1,5µl	4,95µl
Primer b, 10µM	1,5µl	4,95µl
Taq DNA Polymerase, 1U/µl	1µl	3,3µl

In einem PCR-Tube werden nun 49 µl Mastermix vorgelegt, mit 1µl der Probe vereinigt, kurz gevortext und anschließend mittig im Thermocycler positioniert.

PCR Durchführung

Im Thermocycler findet nun die eigentliche Polymerasekettenreaktion in den unten beschriebenen Schritten statt:

- a. **Initiale Denaturierung:** die doppelstrangige DNA wird durch Erhitzen für 3min bei 94 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt
- b. **Denaturierung:** 40 Sekunden bei 94 °C
- c. **Annealing:** nach Abkühlung auf eine primerspezifische Temperatur (s. Tab. 5) können diese innerhalb von 60 Sekunden an die DNA hybridisieren
- d. **Elongation:** bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq Polymerase, wird der Zweitstrang innerhalb von 60 Sekunden, ausgehend von den Primern, durch Anlagerung der komplementären dNTPs synthetisiert
- e. **Finale Elongation:** 5min bei 72 °C
- f. **Fertig:** Lagerung bei 4 °C

WICHTIG: Punkt **b**, **c**, **d** werden je nach Primer 25- 32 Mal wiederholt. Diese Wiederholung beschreibt die Zyklenanzahl (s. Tab. 5).

Gele für die ELFO der PCR Produkte gießen

Während der Thermocycler läuft werden die 1,5%igen Agarose Gele für die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Genprodukte vorbereitet. Für ein Agarosegel werden 0,6g Agarose in ein 250ml Becherglas eingewogen, mit 40ml Tris-Borsäure-EDTA-Buffer (TBE-Buffer) vermischt und in der Mikrowelle bei 800W für 40 Sekunden erhitzt, wobei die Lösung etwa 20 Sekunden lang sieden muss.

Anschließend werden der Lösung 20µl Ethidiumbromid (0,5g/ml) zugefügt, diese dann 2 mal kreisförmig geschwenkt und in eine kurz zuvor vorbereitete Form (Schablone und Kamm) in einem Zug gegossen. Beim Arbeiten mit Ethidiumbromid ist Vorsicht geboten, da dieser rote Phenanthridin- Farbstoff krebserregend ist und deshalb auch nach einer gesonderten Entsorgung verlangt (gelber Abfallkanister). Die Gele härten innerhalb von einer viertel Stunde komplett aus.

ELFO der PCR Produkte, Visualisierung der Banden und Auswertung des Photos

Wenn die PCR beendet ist werden die Proben dem Thermocycler entnommen und auf Eis gestellt. Als Farbmarker zum Abschätzen der bereits gelaufenen Strecke im Gel findet bevorzugt Xylencyanol (XC; sog. Loading dye) Verwendung, da XC durch seine geringe Molmasse (538,61g/mol) nicht im Feld der Amplicongrößen liegt. Deshalb werden nun 3µl des blauen 6x loading dye in einem kleinen Eppi vorgelegt, mit 15µl Probe (loading dye: Probe= 1:6) versetzt und kurz gevortext.

Das Gel wird vorsichtig in eine ELFO Kammer überführt, diese mit TBE-Buffer bis zur Marke befüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und die einzelnen Geltaschen mit je 15µl der vorbereiteten Proben sowie 3µl einer DNA-Leiter als Identifikationshilfe befüllt. Die amplifizierte DNA wird nun in Richtung zur Anode bei 100V für 20min der Größe nach aufgetrennt. Die unter UV-Licht fluoreszierenden Banden werden im ChemilmagerTM 4400 sichtbar gemacht, fotografiert und das digitale Bild anschließend mit Hilfe der Software „AlphaEaseFC Chemilmager 4400“ ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

Laktoferrin (LF) bietet ein breites Spektrum an experimentellen Ansätzen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Hüttinger beschäftigte sich in vorangegangenen Experimenten mit der Wirkung von bovinem Laktoferrin (bLF) auf Chondrozyten, THP-1 Monozyten, HeLa-, Mef-, Mink- und Caco-2 Zellen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Aktivierbarkeit bestimmter Signale, Stimulierbarkeit der Expression ausgewählter Gene sowie dem Differenzierungs-, Migrations- und Proliferationsverhalten dieser Zellen als Antwort auf verschiedene Konzentrationen an und unterschiedliche Inkubationszeiten mit bLF. Diese Versuche schafften ein Basisverständnis über die Wirkung von bLF auf verschiedene Zelltypen in Bezug auf Proliferation, Migration und Differenzierung.

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von rekombinantem humanen Laktoferrin (rhLF) im Vergleich zu bLF in Bezug auf Signaltransduktion, Genexpression und Zellproliferation getestet. Zu den Methoden der Wahl zählten dabei: (A) Westernblot, zur Untersuchung der Signaltransduktion, (B) reverse transcription Polymerase Chain Reaction (rtPCR), zur Analyse der Genexpression und (C) MTT-Test sowie Zellzahlbestimmung, zur Bestimmung der Proliferationsrate. Im Fokus der Beobachtung standen die Aktivierung von p38 MAPK, ERK1/2 und Smad-2 Signale sowie die Stimulierung der Expression Extrazellulärmatrix- modellierender Gene in Caco-2 Zellen und THP-1 Monozyten und deren Proliferationsverhalten.

Caco-2 Zellen sind adhärente, humane, heterogene, kolorektale, epitheliale Adenokarzinomzellen. Im undifferenzierten, subkonfluenten Stadium gleichen sie den Stammzellen des Dickdarms, durch längere Kultivierung (bis zu 3 Wochen) differenzieren sie jedoch zu dem Phänotyp eines Enterozyten des Dünndarms [PINTO et al., 1983].

THP-1 Monozyten sind Suspensionzellen und entstammen einem an akuter monozytischer Leukämie erkrankten Patienten. Bei Kultivierung unter Zusatz von speziellen Substanzen wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) differenzieren Monozyten zu Makrophagen [AUWERX et al., 1991].

Die Entscheidung für den experimentellen Einsatz von Caco-2 wurde getroffen, da sich in diesem Modell die Wirkung von oral aufgenommenem humanem Laktoferrin (hLF) aus der Muttermilch im Vergleich zu bovinem Laktoferrin (bLF) aus der Kuhmilch simulieren ließ.

THP-1 Monozyten wiederum dienten einerseits der simulierten Beobachtung der Effekte des über Nahrung aufgenommenen hLF bzw. bLF, andererseits des während einer Entzündung in Massen aus den sekundären Granula neutrophiler Granulozyten freigesetzten hLFs.

In folgenden Tabellen und Graphen wurde die Antwort der subkonfluenten Caco-2 Zellen, der differenzierten Caco-2 Zellen und der THP-1 Monozyten auf rhLF und bLF Inkubation, zum einen im Zeit- (1-, 4-, 24 Stunden) und zum anderen im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) dargestellt. Die mittels drei unabhängiger Versuche generierten Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Prism 3.0“ statistisch ausgewertet und in eine repräsentative Form (Tabellen und Graphen) überführt.

Die Tabellen zeigen neben Konfidenzintervall (KI) und dem p-Wert (Signifikanzniveau) die mittlere Differenz (MD). Da es sich hierbei um eine Differenz handelt muss man den Wert von 1 (Kontrolle) dazu rechnen, um die tatsächliche Stimulierung/Aktivierung zu erhalten. Möchte man jedoch den Unterschied der Stimulierung/Aktivierung zwischen rhLF und bLF betrachten entfällt dieser Schritt, da die MD genau dies darstellt.

4.1 Ergebnisse der Caco-2 Zellversuche

4.1.1 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Weder die 1- noch die 4- stündige Inkubation mit 50µg/ml rhLF führte zu einer Aktivierung von Smad2, p38 sowie ERK1 und ERK2 in subkonfluenten bzw. undifferenzierten Caco-2 Zellen (Abb. 1a). Im Vergleich dazu führt die 1- wie auch die 4- stündige Inkubation mit 50µg/ml bLF zu einer 2,4 fachen Aktivierung des Smad-2 Signals. Die Phosphorylierung von p38 wird nach bLF bei 1- stündiger Inkubation nicht und nach 4- stündiger um 40% stimuliert (n.s.). 1- sowie 4- stündige Inkubation mit bLF sowie rhLF führte zu keiner verstärkten ERK1 und ERK2 Aktivierung in undifferenzierten Caco-2 Zellen (Tab. 8, - 9; Abb. 17).

Tab.8: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe

Signal	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	rhLF	0,10	>0,05	0,70 bis -0,50
		bLF	-0,19	>0,05	0,41 bis -0,79
	4h	rhLF	-0,03	>0,05	0,62 bis -0,67
		bLF	0,36	>0,05	1,00 bis -0,29
pERK1	1h	rhLF	-0,09	>0,05	0,53 bis -0,71
		bLF	-0,11	>0,05	0,51 bis -0,73
	4h	rhLF	-0,08	>0,05	0,60 bis -0,75
		bLF	0	>0,05	0,68 bis -0,67
pERK2	1h	rhLF	-0,04	>0,05	0,59 bis -0,66
		bLF	-0,14	>0,05	0,48 bis -0,76
	4h	rhLF	0	>0,05	0,68 bis -0,67
		bLF	0,01	>0,05	0,68 bis -0,67
pSmad2	1h	rhLF	0,10	>0,05	0,45 bis -0,26
		bLF	1,44	<0,001	1,80 bis 1,09
	4h	rhLF	0,16	>0,05	0,51 bis -0,20
		bLF	1,42	<0,001	1,78 bis 1,07

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab.9: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündige Inkubation mit 50µg/ml LF in undiff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF

Signal	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	0,29	>0,05	-0,23 bis 0,80
	4h	-0,38	>0,05	-0,99 bis 0,22
pERK1	1h	0,02	>0,05	-0,54 bis 0,58
	4h	-0,08	>0,05	-0,73 bis 0,57
pERK2	1h	0,11	>0,05	-0,46 bis 0,67
	4h	-0,01	>0,05	-0,65 bis 0,64
pSmad2	1h	-1,34	<0,001	-1,65 bis -1,04
	4h	-1,26	<0,001	-1,57 bis -0,96

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 17a

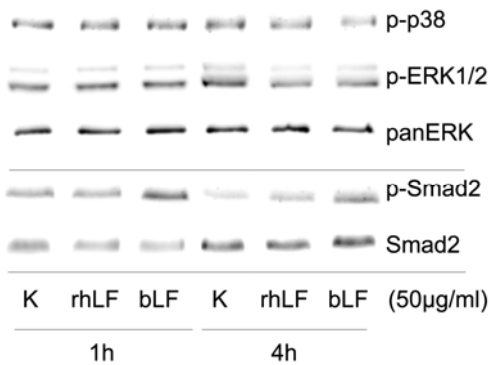


Abb. 17b

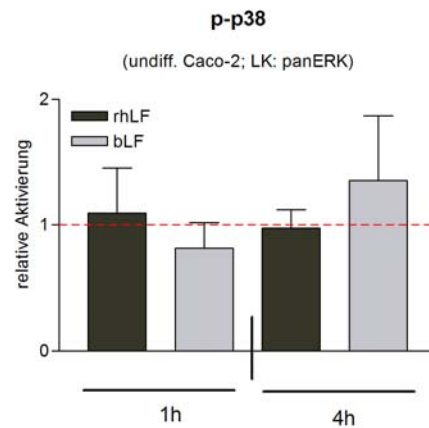


Abb. 17c

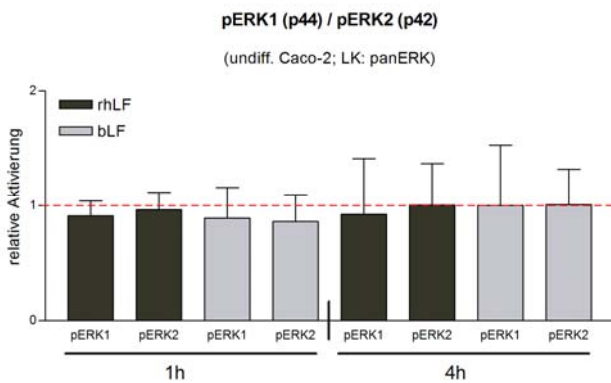


Abb. 17d

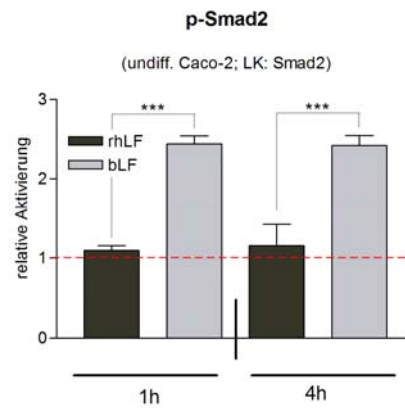


Abb.17: Einfluss von rekombinantem humanem Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin mittels Western Blot. (a) Repräsentative Abbildung der p-Smad2, p-p38 und p-ERK1/2 Signalbanden sowie der Ladekontrollen panERK und Smad2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50µg/ml) sowie die graphische Darstellung (b) der relativen p38, (c) der relativen ERK1/2 und (d) der relativen Smad2 Aktivierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle (panERK und Smad2) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test (rhLF vs. bLF: ***: $p < 0,001$).

Ein Unterschied zwischen rhLF und bLF wurde also nur in Bezug auf den Smad Pathway gefunden. Während bLF diesen Pathway offenbar eindeutig aktivieren kann, zeigt rhLF hier keinerlei Einfluss.

4.1.2 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Expression ausgewählter Gene in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Im undifferenzierten Caco-2 Zellmodell führte weder die Inkubation mit 50µg/ml rhLF noch bLF zu einer Steigerung der Genexpression von PAI-1 sowie MMP-1 (nach einer oder vier Stunden; Abb. 18a). Das Fehlen einer MMP-2, -3 und -9 Expression wurde weder durch rhLF noch bLF geändert, weshalb deren Abbildung nicht möglich war (Tab. 10, -11; Abb. 18).

Tab.10: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Gen	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	rhLF	-0,03	>0,05	0,53 bis -0,59
		bLF	0,01	>0,05	0,57 bis -0,55
	4h	rhLF	-0,08	>0,05	0,48 bis -0,63
		bLF	-0,09	>0,05	0,47 bis -0,65
MMP-1	1h	rhLF	-0,13	>0,05	0,46 bis -0,72
		bLF	0,05	>0,05	0,64 bis -0,54
	4h	rhLF	-0,04	>0,05	0,55 bis -0,62
		bLF	-0,04	>0,05	0,55 bis -0,62

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab.11: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF.

Gen	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	-0,04	>0,05	-0,52 bis 0,45
	4h	0,02	>0,05	-0,47 bis 0,50
MMP-1	1h	-0,19	>0,05	-0,70 bis 0,32
	4h	0	>0,05	-0,51 bis 0,51

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 18a

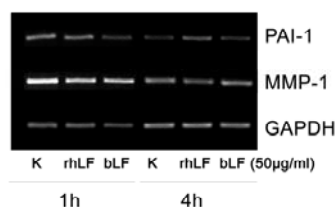


Abb. 18b

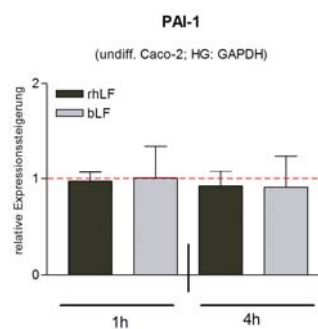


Abb. 18c

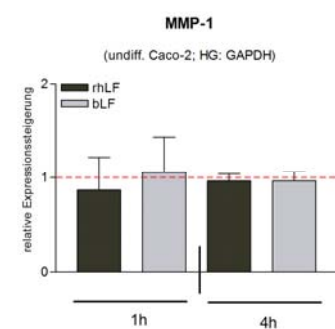


Abb. 18: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Expression ausgewählter Gene in undifferenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin. (a) Repräsentative Abbildung der PAI-1 und MMP-1 Genexpression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50µg/ml) sowie die graphische Darstellung (b) der relativen PAI-1 und (c) der relativen MMP-1 Stimulierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

4.1.3 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in differenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Im Zeitverlauf: Eine 1- wie auch 4- stündige Inkubation von über 3 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehaltener und somit differenzierter Caco-2 Zellen mit rhLF sowie bLF (jeweils 50µg/ml) führte zu keiner deutlichen Aktivierung der Signalproteine Smad2, p38 sowie ERK1 und ERK2 (Abb. 19a). Da die Signalstärke der ausgewählten Proteine trotz Berücksichtigung hoher Applikationsmengen (~ 65µg Protein pro Geltasche) sehr schwach ausfiel, war eine Abbildung aller Signale zwar möglich, eine statistische Auswertung jedoch nur im Fall von p-p38, pERK1 und pERK2 (Tab. 12, -13; Abb. 19b, -c). p38 wurden nach 1- stündiger Inkubation mit rhLF sowie mit bLF schwach (n.s.), nach 4- stündiger Inkubation hingegen weder mit rhLF noch mit bLF aktiviert.

Tab. 12: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	rhLF	0,28	>0,05	0,78 bis -0,22
		bLF	0,50	>0,05	1,00 bis -0,002
	4h	rhLF	0,10	>0,05	0,41 bis -0,60
		bLF	0,08	>0,05	0,42 bis -0,58
pERK1	1h	rhLF	0,23	>0,05	0,89 bis -0,43
		bLF	0	>0,05	0,66 bis -0,66
	4h	rhLF	-0,11	>0,05	0,55 bis -0,77
		bLF	-0,03	>0,05	0,64 bis -0,69
pERK2	1h	rhLF	0,37	>0,05	1,03 bis -0,30
		bLF	-0,04	>0,05	0,62 bis -0,66
	4h	rhLF	-0,06	>0,05	0,60 bis -0,72
		bLF	-0,14	>0,05	0,52 bis -0,80
pSmad2	1h	rhLF	-	-	-
		bLF	-	-	-
	4h	rhLF	-	-	-
		bLF	-	-	-

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 13: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF

Signal	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	-0,22	>0,05	-0,65 bis 0,22
	4h	-0,01	>0,05	-0,45 bis 0,42
pERK1	1h	0,23	>0,05	-0,36 bis 0,82
	4h	-0,08	>0,05	-0,68 bis 0,51
pERK2	1h	0,40	>0,05	-0,19 bis 0,99
	4h	0,08	>0,05	-0,51 bis 0,67
pSmad2	1h	-	-	-
	4h	-	-	-

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 19a

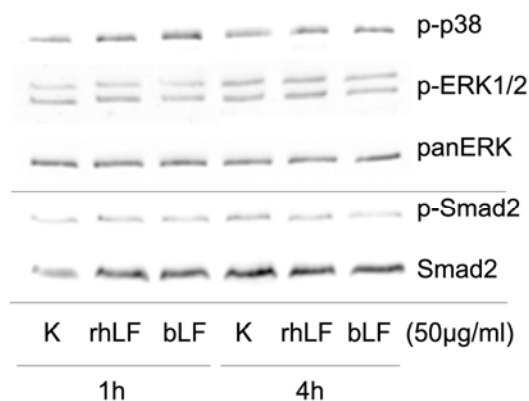


Abb. 19b

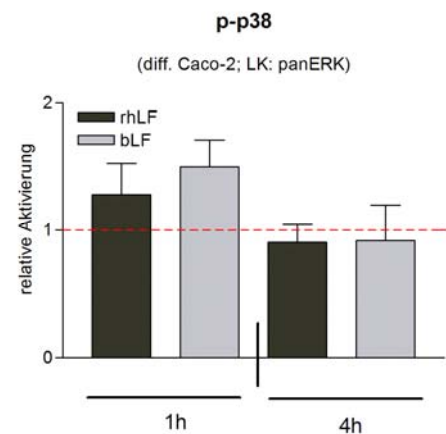


Abb. 19c

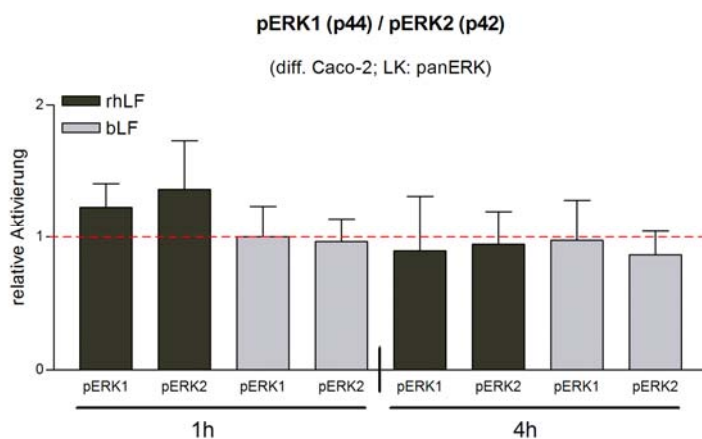


Abb. 19: Einfluss von rekombinatem humanem Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in differenzierten Caco-2 Zellen (21 Tage in Kultur) im Vergleich zu bovinem Laktoferrin mittels Western Blot. (a) Repräsentative Abbildung der p-Smad2, p-p38 und p-ERK1/2 Signalbanden sowie der Ladekontrollen panERK und Smad2 nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50 µg/ml) sowie die graphische Darstellung (b) der relativen p38 und (c) der relativen ERK1/2 Aktivierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle (panERK) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

Im Konzentrationsverlauf: Die 4- stündige Inkubation der differenzierten Caco-2 Zellen zeigte im Konzentrationsverlauf (rhLF: 0,5-, 5-, 50-, 500 µg/ml und 50 µg/ml bLF) abermals keine Aktivierung des Smad2, p38 sowie ERK1 und ERK2 Signals (Abb. 20a). Dieses Ergebnis konnte graphisch im Fall von p-Smad2 wie auch pERK1 und pERK2 abgebildet werden (Tab. 14; Abb. 20).

Das p-p38 Signal war aufgrund der Signalschwäche und dem uneinheitlichen Erscheinungsbild der 3 unabhängigen Versuche nicht statistisch auswertbar und konnte somit graphisch nicht dargestellt werden. Da p-p38 zu den Stress- induzierten Signalen gehört und die Kultivierung der Caco-2 Zellen über 3 Wochen eine breite Möglichkeit bietet die Zellen einer Stresssituation auszusetzen, kann dieses Erscheinungsbild eventuell dadurch erklärt werden.

Tab. 14: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in diff. Caco-2 Zellen nach 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	rhLF	0,5	-	-	-
		5	-	-	-
		50	-	-	-
		500	-	-	-
		50	-	-	-
pERK1	rhLF	0,5	0,25	>0,05	-0,29 bis 0,78
		5	0,26	>0,05	-0,27 bis 0,80
		50	0	>0,05	-0,53 bis 0,53
		500	0,04	>0,05	-0,49 bis 0,57
		50	-0,07	>0,05	-0,61 bis 0,46
pERK2	rhLF	0,5	0,15	>0,05	-0,39 bis 0,68
		5	0,23	>0,05	-0,30 bis 0,77
		50	0,07	>0,05	-0,46 bis 0,61
		500	0,16	>0,05	-0,38 bis 0,69
		50	-0,08	>0,05	-0,61 bis 0,46
pSmad2	rhLF	0,5	0,05	>0,05	0,53 bis -0,44
		5	-0,01	>0,05	0,47 bis -0,50
		50	0,04	>0,05	0,53 bis -0,44
		500	-0,02	>0,05	0,46 bis -0,51
		50	0,10	>0,05	0,58 bis -0,39

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 20a

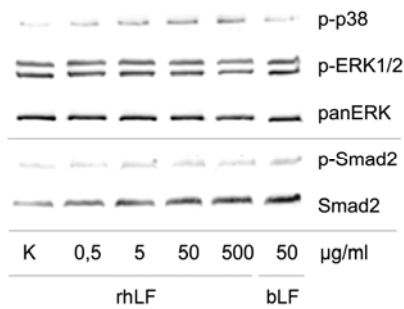


Abb. 20b

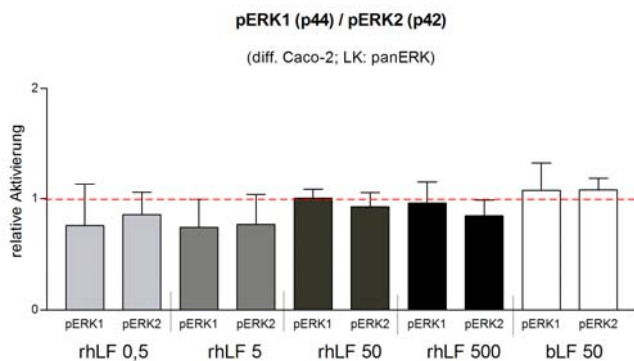


Abb. 20c

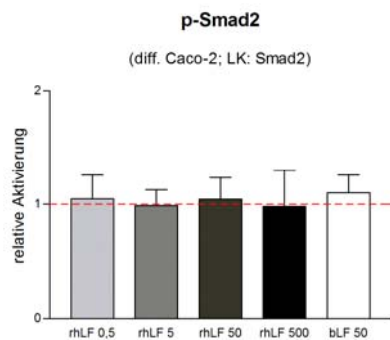


Abb. 20: Einfluss von rekombinantem humanem Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in differenzierten Caco-2 Zellen (21 Tage in Kultur) im Vergleich zu bovinem Laktoferrin mittels Western Blot. (a) Repräsentative Abbildung der p-Smad2, p-p38 und p-ERK1/2 Signalbanden sowie der Ladekontrollen panERK und Smad2 nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) und 50µg/ml bLF sowie die graphische Darstellung (b) der relativen Smad2 und (c) der relativen ERK1/2 Aktivierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle (panERK und Smad2) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

4.1.4 Einfluss von rekombinantem humanem Laktoferrin auf die Expression ausgewählter Gene in differenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Im Zeitverlauf: Auch im differenzierten Caco-2 Zellmodell führte weder die Inkubation über 1 noch die über 4 Stunden mit je 50µg/ml rhLF und bLF zu einer Steigerung der Genexpression von PAI-1 und MMP-1 (Tab. 15, - 16; Abb. 21). In diesem Differenzierungsstadium konnte abermals keine Grundexpression von MMP-2, -3 und -9 gefunden werden, welche weder durch rhLF noch bLF stimuliert wurde, sodass deren Abbildung nicht möglich war.

Tab. 15: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Gen	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	rhLF	0,05	>0,05	0,92 bis -0,84
		bLF	0,08	>0,05	0,97 bis -0,80
	4h	rhLF	0,18	>0,05	1,06 bis -0,71
		bLF	-0,13	>0,05	0,76 bis -1,01
MMP-1	1h	rhLF	0,05	>0,05	0,53 bis -0,44
		bLF	-0,02	>0,05	0,47 bis -0,50
	4h	rhLF	0,04	>0,05	0,53 bis -0,44
		bLF	-0,02	>0,05	0,46 bis -0,51

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 16: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in diff. Caco-2 Zellen: rhLF vs. bLF

Gen	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	-0,04	>0,05	-0,80 bis 0,73
	4h	0,30	>0,05	-0,46 bis 1,07
MMP-1	1h	0,06	>0,05	-0,35 bis 0,47
	4h	0,06	>0,05	-0,34 bis 0,47

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 21a

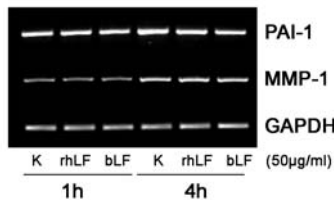


Abb. 21b

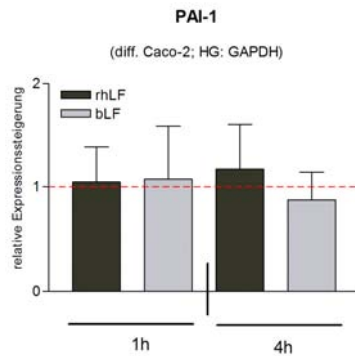


Abb. 21c

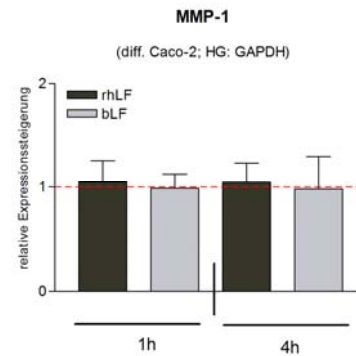


Abb. 21: Einfluss von rekombinatem humanen Laktoterrin auf die Expression ausgewählter Gene in differenzierten Caco-2 Zellen (21 Tage in Kultur) im Vergleich zu bovinem Laktoterrin. (a) Repräsentative Abbildung der PAI-1 und MMP-1 Genexpression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH nach 1- und 4-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50µg/ml) sowie die graphische Darstellung (b) der relativen PAI-1 und (c) der relativen MMP-1 Stimulierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

Im Konzentrationsverlauf: Die 4- stündige Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen im Konzentrationsverlauf (rhLF: 0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml und 50µg/ml bLF) führte, unabhängig von der Laktoterrinkonzentration, zu keiner Expressionserhöhung von PAI-1 und MMP-1 (Tab. 17; Abb. 22). Wieder konnte eine MMP-2, -3 und -9 Expression nicht detektiert und somit nicht dargestellt werden.

Tab. 17: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	rhLF	0,5	0,05	>0,05	0,65 bis -0,55
		5	0,12	>0,05	0,72 bis -0,48
		50	0,14	>0,05	0,74 bis -0,46
		500	-0,12	>0,05	0,48 bis -0,71
	bLF	50	0,17	>0,05	0,77 bis -0,42
MMP-1	rhLF	0,5	-0,17	>0,05	0,75 bis -1,09
		5	-0,01	>0,05	0,91 bis -0,93
		50	-0,09	>0,05	0,83 bis -1,01
		500	-0,14	>0,05	0,78 bis -1,06
	bLF	50	-0,01	>0,05	0,91 bis -0,93

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 22a

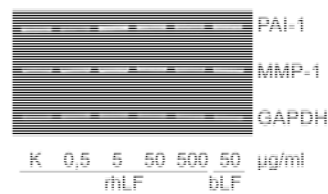


Abb. 22b

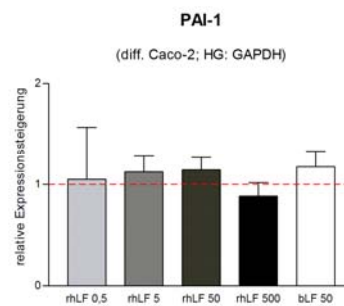


Abb. 22c

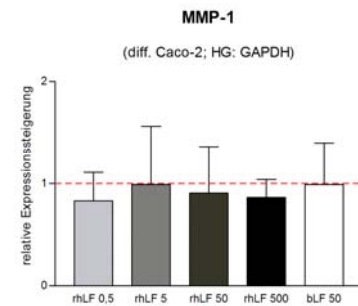


Abb. 22: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Expression ausgewählter Gene in differenzierten Caco-2 Zellen (21 Tage in Kultur) im Vergleich zu bovinem Laktoferrin. (a) Repräsentative Abbildung der PAI-1 und MMP-1 Genexpression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) und 50µg/ml bLF sowie die graphische Darstellung (b) der relativen PAI-1 und (c) der relativen MMP-1 Stimulierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

4.1.5 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Proliferationsrate von differenzierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Undifferenzierte Caco-2 Zellen zeigten in Gegenwart von rhLF mit zunehmender Inkubationsmenge und Inkubationszeit im MTT-Test eine Proliferationssteigerung um maximal 51% (n.s.) nach 2- tägiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF. Ein proliferativer Effekt von maximal 25% (n.s.) zeigte sich durch bLF Inkubation nach 2- tägiger Inkubation mit 0,5µg/ml bLF (Tab. 18, -19, -20; Abb. 23).

Tab. 18: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5- und 50µg/ml) auf die Proliferationsrate undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe (Bestimmung mittels MTT-Test)

Tage	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
1	0,5	0,13	>0,05	0,66 bis -0,39
	5	0,19	>0,05	0,71 bis -0,33
	50	0,14	>0,05	0,67 bis -0,38
2	0,5	0,16	>0,05	0,68 bis -0,37
	5	0,29	>0,05	0,82 bis -0,23
	50	0,51	>0,05	1,04 bis -0,16

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 19: Einfluss von bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5- und 50µg/ml) auf die Proliferationsrate undiff. Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe (Bestimmung mittels MTT-Test)

Tage	LF	MD*	p-Wert*	KI*
1	0,5	0,06	>0,05	0,53 bis -0,41
	5	0,08	>0,05	0,55 bis -0,40
	50	-0,07	>0,05	0,41 bis -0,55
2	0,5	0,25	>0,05	0,73 bis -0,22
	5	0,16	>0,05	0,63 bis -0,32
	50	0,16	>0,05	0,64 bis -0,31

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 20: Vergleich der Proliferation der Caco-2 Zellen nach 1- und 2-tägiger Inkubation mit LF (in Bezug auf die Konzentration): rhLF vs. bLF (Bestimmung mittels MTT-Test)

Tage	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
1	0,5	0,08	>0,05	-0,37 bis 0,52
	5	0,12	>0,05	-0,33 bis 0,56
	50	0,21	>0,05	-0,23 bis 0,66
2	0,5	-0,10	>0,05	-0,54 bis 0,35
	5	0,14	>0,05	-0,31 bis 0,58
	50	0,35	>0,05	-0,10 bis 0,80

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 23a

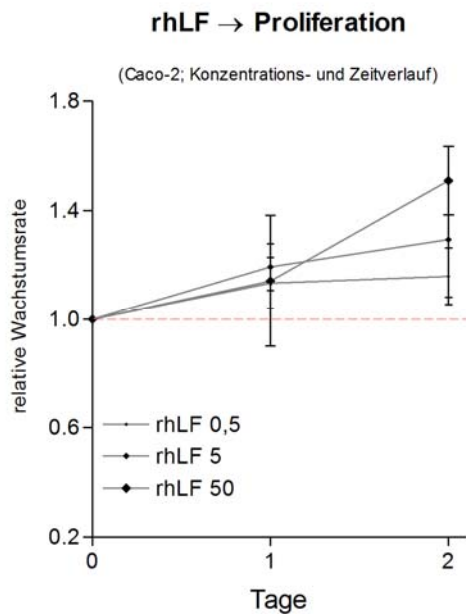


Abb. 23b

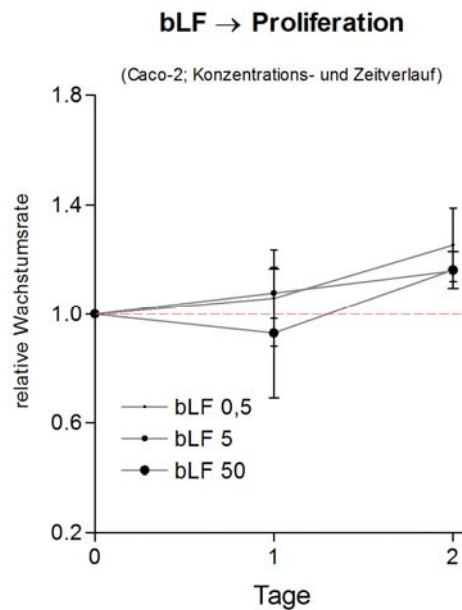


Abb.23: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Proliferation von undiff. Caco-2 Zellen im Vergleich zu bovinem Laktoferrin. Graphische Darstellung der relativen Wachstumsrate nach 1- und 2- tägiger Inkubation (a) mit 0,5-, 5- und 50µg/ml rhLF und (b) mit 0,5-, 5- und 50µg/ml bLF. Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen MTT-Test Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normalisiert und diese auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test.

Die Ergebnisse zeigen also, dass die Proliferationsrate von undifferenzierten Caco-2 Zellen weder durch rhLF noch durch bLF unter diesen Bedingungen signifikant beeinflusst werden konnte.

4.2 Ergebnisse der THP-1 Zellversuche

Nach der Betrachtung des Proliferationsverhaltens von Caco-2 Zellen sowie der Aktivierbarkeit bestimmter Signaltransduktionswege und der Expressionssteigerung bestimmter Zielgene durch rekombinantes humanes Laktoferrin (rhLF) sowie bovines Laktoferrin (bLF) folgen nun die Ergebnisse derselben Untersuchungen, diesmal jedoch mit dem Zellmodell der THP-1 Monozyten. Die Experimente konzentrierten sich abermals auf die zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von rhLF im Vergleich zu bLF.

4.2.1 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Im Zeitverlauf: Die 24- stündige Inkubation der THP-1 Monozyten mit Laktoferrin führte innerhalb der drei unabhängigen Experimente zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, weshalb auf deren Interpretation verzichtet wurde. Effekte nach 1- sowie 4-stündiger Inkubation konnten jedoch problemlos statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt werden (Tab. 21, -22; Abb. 24).

Der stärkste Effekt nach 1- sowie 4-stündiger Inkubation mit rhLF konnte bei dem Signalprotein p-p38 beobachtet werden. Nach 1-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF kam es zur Signalverdoppelung (n.s.), mit 50µg/ml bLF zu einer 2,4 fachen Steigerung (n.s.). Die 4-stündige Inkubation mit rhLF führte zur 2,3 fachen (n.s.), mit bLF mit einer 2,1-fachen Aktivierung von p38.

Die Signalschwäche der pERK1/2 Banden nach 1-stündiger Inkubation trotz hochdosierter Proteinmenge (~60µg Proteinapplikation pro Geltasche) verhinderte deren Auswertung. Eine Aktivitätserhöhung durch rhLF sowie bLF ist jedoch auszuschließen. Die Antwort des ERK1 sowie ERK2 Signals auf 4-stündige Inkubation mit rhLF oder bLF zeigte keine merkliche Stimulierung der Aktivierung.

Während sich Smad2 von dem 1- wie auch 4-stündigen Kontakt mit 50µg/ml rhLF unbeeindruckt zeigte, führte die Inkubation mit derselben Konzentration an bLF nach einer Stunde zu einer 26,5 fachen und nach vier Stunden zu einer 17,7 fachen Signalaktivierung (Tab. 21), die sich mit einer mittleren Differenz von 25,6 (1h; p<0,001) und 16,6 (4h; p<0,001) von der Aktivierung mittels rhLF deutlich abhob (Tab. 22).

Tab. 21: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten nach 1- und 4-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	rhLF	0,96	>0,05	2,44 bis -0,52
		bLF	1,42	>0,05	2,90 bis -0,06
	4h	rhLF	1,32	>0,05	2,80 bis -0,16
		bLF	1,13	>0,05	2,61 bis -0,36
pERK1	1h	rhLF	-	-	-
		bLF	-	-	-
	4h	rhLF	0,11	>0,05	0,86 bis -0,64
		bLF	-0,26	>0,05	0,50 bis -1,01
pERK2	1h	rhLF	-	-	-
		bLF	-	-	-
	4h	rhLF	0,08	>0,05	0,83 bis -0,68
		bLF	-0,31	>0,05	0,45 bis -1,06
pSmad2	1h	rhLF	-0,17	>0,05	3,41 bis -3,74
		bLF	25,46	<0,001	29,03 bis 21,89
	4h	rhLF	0	>0,05	3,58 bis -3,57
		bLF	16,65	<0,001	20,22 bis 13,07

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 22: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalproteine nach 1- und 4-stündige Inkubation mit 50µg/ml LF in THP-1 Monozyten: rhLF vs. bLF

Signal	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	1h	-0,46	>0,05	-1,74 bis 0,82
	4h	0,19	>0,05	-1,09 bis 1,47
pERK1	1h	-	-	-
	4h	0,37	>0,05	-0,28 bis 1,02
pERK2	1h	-	-	-
	4h	0,38	>0,05	-0,27 bis 1,03
pSmad2	1h	-25,63	<0,001	-28,73 bis -22,53
	4h	-16,65	<0,001	-19,74 bis -13,55

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 24a

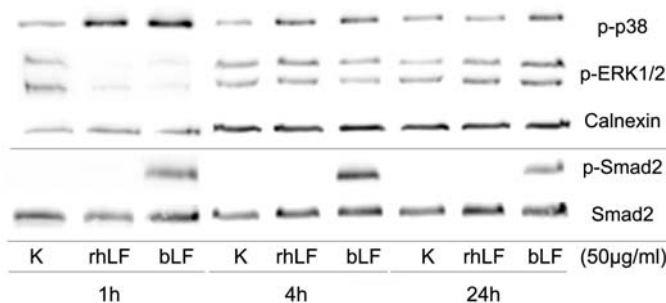


Abb. 24b

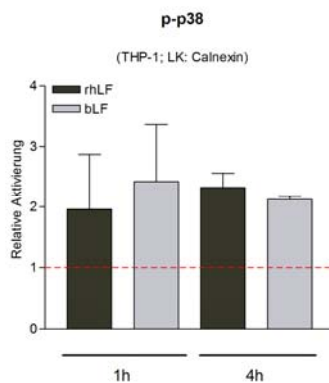


Abb. 24c

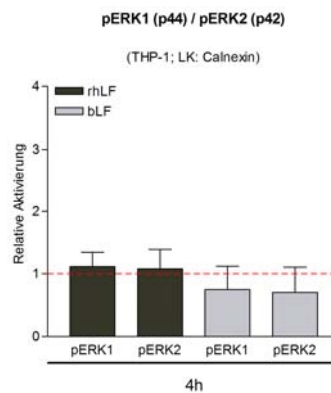


Abb. 24d

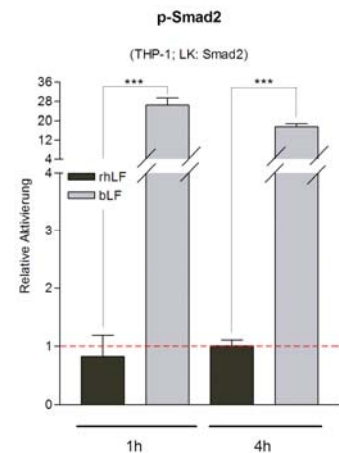


Abb. 24: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin mittels Western Blot. (a) Repräsentative Abbildung der p-Smad2, p-p38 und p-ERK1/2 Signalbanden sowie der Ladekontrollen panERK und Smad2 nach 4- und 24-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50µg/ml) sowie die graphische Darstellung (b) der relativen p38, (c) der relativen ERK1/2 und (d) der relativen Smad2 Aktivierung. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle (panERK und Smad2) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test (rhLF vs. bLF: ***: $p < 0,001$).

Im Konzentrationsverlauf: Die Antwort auf die 1-stündige Inkubation der THP-1 Monozyten mit rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) im Vergleich wurde graphisch in Abb. 25 und statistisch in Tab. 23 interpretiert.

Die Signalaktivierung von p38 nach 1-stündiger Inkubation mit rhLF zeigte eine konzentrationsabhängige positive Korrelation. Dabei wurde keine Aktivierung durch 0,5µg/ml rhLF, eine 1,5 fache Steigerung durch 5µg/ml rhLF, eine 2-fache Steigerung durch 50µg/ml rhLF und eine 2,4-fache Steigerung durch 500mg/ml rhLF beobachtet, die der 2,4-fachen Steigerung durch 50µg/ml bLF glich (sämtliche Werte n.s.).

Die Signalschwäche der pERK1/2 Banden nach 1-stündiger Inkubation mit rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) verhinderte deren Auswertung. Eine Aktivitätserhöhung durch rhLF sowie bLF ist jedoch auszuschließen.

Das p-Smad2 Signal zeigte nach 1-stündiger Inkubation mit rhLF im Konzentrationsverlauf keine Aktivierung. Die Inkubation mit 50µg/ml bLF hingegen führte zu einer 26,5-fache Erhöhung der Smad2 Aktivierung ($p < 0,001$) durch.

Tab. 23: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten nach 1-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	rhLF	0,5	0	>0,05	1,96 bis -1,97
		5	0,46	>0,05	2,42 bis -1,50
		50	0,96	>0,05	2,92 bis -1,01
		500	1,44	>0,05	3,40 bis -0,52
	bLF	50	1,42	>0,05	3,38 bis -0,55
pERK1	rhLF	0,5	-	-	-
		5	-	-	-
		50	-	-	-
		500	-	-	-
	bLF	50	-	-	-
pERK2	rhLF	0,5	-	-	-
		5	-	-	-
		50	-	-	-
		500	-	-	-
	bLF	50	-	-	-
pSmad2	rhLF	0,5	-0,10	>0,05	3,00 bis -3,20
		5	0,05	>0,05	3,15 bis -3,05
		50	-0,17	>0,05	2,93 bis -3,27
		500	-0,07	>0,05	3,025 bis -3,17
	bLF	50	25,46	<0,001	28,56 bis 22,36

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 25a

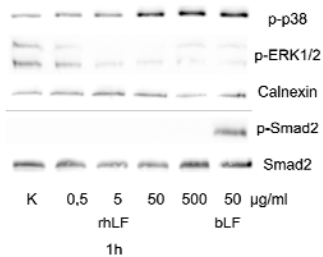


Abb. 25b

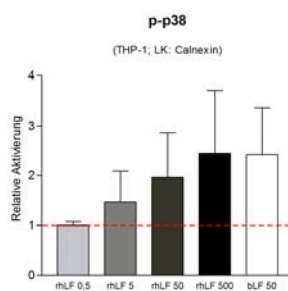


Abb. 25c

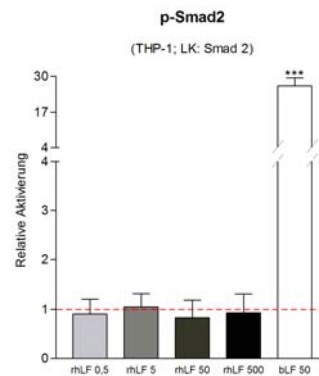


Abb. 25: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Aktivierung ausgewählter Signalproteine in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin. (a) Repräsentative Abbildung der p-Smad2, p-p38 und p-ERK1/2 Signalbanden nach 1 stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) und 50µg/ml bLF sowie die graphische Darstellung (b) der relativen p38 und (c) der relativen Smad2 Aktivierung nach 1 stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) und 50µg/ml bLF. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle (panERK und Smad2) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test (bLF vs. K: ***: $p < 0,001$).

4.2.2 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Besonderes Augenmerk bei der Beobachtung der Genexpression in THP-1 Monozyten wurde auf Zielgene wie: plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), urokinase- type plasminogen activator (uPA), matrix metalloproteinases-1, -2, -9 (MMP-1, -2, -9), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), low density lipoprotein receptor- related- protein 1 (LRP-1) und alpha-2 macroglobuline (a2M) gelegt.

Abb. 26

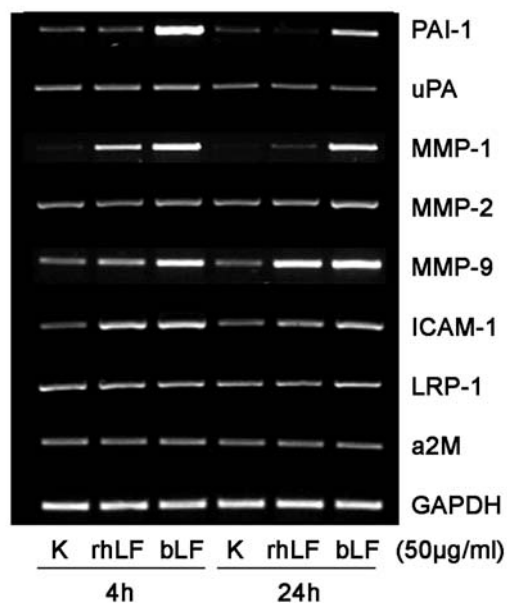


Abb. 26: Einfluss von rekombinantem humanem Laktoferrin (rhLF) auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin (bLF). Repräsentative Abbildung der PAI-1, uPA, MMP-1, MMP-2, MMP-9, ICAM-1, LRP-1 und a2M Genexpression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH nach 4- und 24-stündiger Inkubation mit rhLF und bLF (jeweils 50µg/ml).

Im Zeitverlauf: Im Fall von uPA, MMP-2, LRP-1 und a2M führte weder die Inkubation der THP-1 Monozyten über 4 noch über 24 Stunden mit 50µg/ml rhLF sowie bLF zu einer Erhöhung der Genexpression (Abb. 26).

Die Abbildungen 27 a, -b, -c, -d zeigen den Unterschied der Genexpressionssteigerung von PAI-1, MMP-1, -9 und ICAM-1 nach 1-, 4- und 24- stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF und bLF. Die Tabellen 24 und 25 liefern die statistischen Daten dazu.

Nach Inkubation der THP-1 Monozyten mit 50µg/ml rhLF fand sich keine signifikante Expressionssteigerung von PAI-1. Verglichen damit zeigte die Inkubation mit 50µg/ml bLF nach 1-stündiger Inkubation eine 3,1-fache Stimulierung, welche nach 4-stündiger Inkubation auf eine 18,6-fache Expressionssteigerung ($p < 0,001$) anstieg und nach 24-stündiger Inkubation auf die 4,6- fache Expression (n.s.) zurückfiel.

Obwohl die 1- sowie die 24-stündige Inkubation mit rhLF zu keiner MMP-1 Expressionserhöhung führten, zeigte sich nach 4-stündiger Inkubation der THP1 Monozyten mit 50µg/ml rhLF eine 5,8-fache Stimulierung ($p < 0,001$). Die Inkubation mit 50µg/ml bLF führte schon nach 1 Stunde zu einer 8-fachen Expressionssteigerung ($p < 0,001$), die nach 4 Stunden zu einer 9,3-fachen Stimulierung der MMP-1 Expression anstieg (n.s.), welche nach 24 Stunden wieder auf eine 7,8 fache Expressionssteigerung abfiel (n.s.).

Die Expression von MMP-9 zeigte durch rhLF nach 1-stündiger Inkubation einen anfänglichen Anstieg auf das 4-fache ($p < 0,01$). Nach 4-stündiger Inkubation folgte eine 1,7-fache Steigerung (n.s.) und nach 24-stündiger Inkubation eine abschließende 5-fache Steigerung ($p < 0,001$). Die Inkubation mit 50µg/ml bLF zeigte das gleiche Muster, jedoch mit höherer Intensität. Der 7,7-fachen Expressionssteigerung ($p < 0,001$) folgte eine 3,9-fache (n.s.) und dieser eine 9,1-fache ($p < 0,001$).

ICAM-1 zeigte nach 1-stündiger Inkubation mit rhLF eine Verdoppelung der Expression (n.s.), gefolgt von 3,8 ($p < 0,01$) nach 4-stündiger und 1,8 (n.s.) nach 24-stündiger Inkubation. Im Gegensatz dazu kam es durch die Inkubation mit 50µg/ml bLF nach 1-stündiger Inkubation zu einer 3,4-fachen (n.s), nach 4-stündiger Inkubation zu einer 3,8-fachen ($p < 0,01$) und nach 24-stündiger Inkubation zu einer 3,1-fachen (n.s.) Expressionssteigerung von ICAM-1 in THP-1 Monozyten.

Tab. 24: Einfluss von rhLF sowie bLF (je. 50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Gen	Dauer	LF	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	rhLF	-0,06	>0,05	8,85 bis -8,97
		bLF	2,12	>0,05	11,03 bis -6,79
	4h	rhLF	0,47	>0,05	9,38 bis -8,44
		bLF	17,6	<0,001	26,52 bis 8,701
	24h	rhLF	-0,31	>0,05	8,59 bis -9,22
		bLF	3,56	>0,05	12,47 bis -5,35
MMP-1	1h	rhLF	0,27	>0,05	2,27 bis -1,73
		bLF	7,04	<0,001	9,04 bis 5,04
	4h	rhLF	4,77	<0,001	6,77 bis 2,77
		bLF	8,25	>0,05	10,25 bis 6,25
	24h	rhLF	0,79	<0,001	2,79 bis -1,21
		bLF	6,82	>0,05	8,82 bis 4,82
MMP-9	1h	rhLF	2,95	<0,01	5,25 bis 0,66
		bLF	6,73	<0,001	9,03 bis 4,44
	4h	rhLF	0,66	>0,05	2,96 bis -1,63
		bLF	2,90	<0,05	5,19 bis 0,60
	24h	rhLF	4,01	<0,001	6,30 bis 1,72
		bLF	8,07	<0,001	10,37 bis 5,78
ICAM-1	1h	rhLF	0,94	>0,05	3,02 bis -1,15
		bLF	2,35	>0,05	4,43 bis 0,26
	4h	rhLF	2,84	<0,01	4,925 bis 0,76
		bLF	2,80	<0,01	4,88 bis 0,71
	24h	rhLF	0,84	>0,05	2,92 bis -1,24
		bLF	2,11	>0,05	4,19 bis 0,02

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 25: Vergleich der Expressionssteigerung ausgewählter Gene nach 1-, 4- und 24-stündiger Inkubation mit 50µg/ml LF in THP-1 Monozyten: rhLF vs. bLF

Gen	Dauer	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	1h	-2,18	>0,05	-10,07 bis 5,70
	4h	-17,14	<0,001	-25,03 bis -9,25
	24h	-3,87	>0,05	-11,76 bis 4,02
MMP-1	1h	-6,77	<0,001	-8,55 bis -5,00
	4h	-3,48	<0,001	-5,25 bis -1,71
	24h	-6,03	<0,001	-7,80 bis -4,25
MMP-9	1h	-3,78	<0,001	-5,81 bis -1,75
	4h	-2,24	<0,05	-4,27 bis -0,21
	24h	-4,07	<0,001	-6,10 bis -2,03
ICAM-1	1h	-1,41	>0,05	-3,25 bis 0,44
	4h	0,05	>0,05	-1,80 bis 1,90
	24h	-1,27	>0,05	-3,12 bis 0,57

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 27a

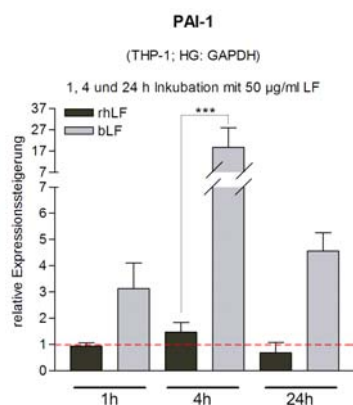


Abb. 27b

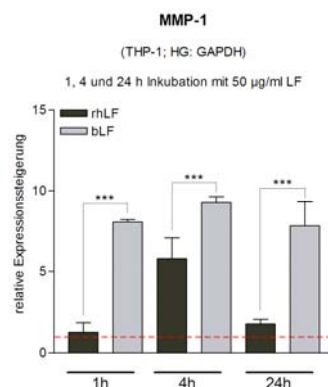


Abb. 27c

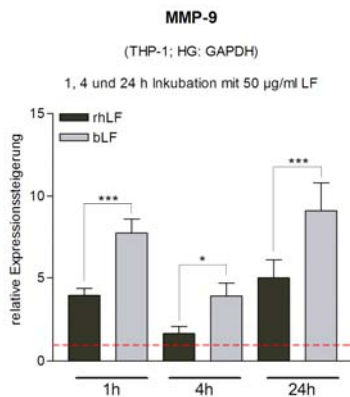


Abb. 27d

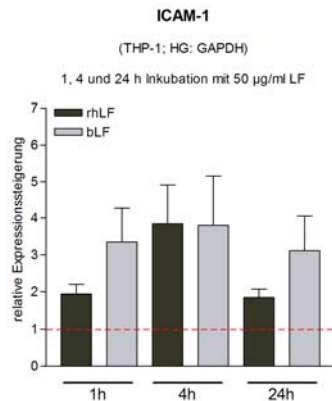


Abb. 27: Einfluss von rekombinantem humanem Laktoferrin (rhLF) auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin (bLF). Graphische Darstellung (b) der relativen PAI-1, (c) MMP-1, (d) MMP-9 und (e) ICAM-1 Stimulation durch rhLF und bLF im Vergleich nach 1-, 4- und 24 stündiger Inkubation. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Methode (rhLF vs. bLF: *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

Von den untersuchten Zielgenen wurde uPA, MMP-2, LRP-1 und a2M weder von rhLF noch von bLF beeinflusst. Wohingegen die Expressionslevel von MMP-1, -9 und ICAM-1 sowohl von rhLF als auch bLF, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß und Kinetik stimuliert wurden. Die Expression von PAI-1 hingegen konnte nur durch bLF stimuliert werden.

Im Konzentrationsverlauf: Die Expressionssteigerung der Zielgene PAI-1, MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 nach Normierung auf das Housekeeping- Gen GAPDH nach 24-stündiger Inkubation mit rhLF im Konzentrationsverlauf (rhLF: 0,5-, 5-, 50- und 500 μ g/ml; bLF: 50 μ g/ml) ist in den Abbildungen 28 a, -b, -c und -d zu sehen und statistisch in Tab. 26 dargestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation der THP-1 Monozyten mit rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500 μ g/ml) konnte weder bei der niedrigsten, noch bei der höchsten Konzentration eine PAI-1 Expressionssteigerung beobachtet werden. Die Inkubation mit 50 μ g/ml bLF führte zu einer 3,1-fache Stimulierung ($p < 0,001$) der PAI-1 Expression.

Die MMP-1, -9 und ICAM-1 Expression zeigte eine konzentrationsabhängige positive Korrelation.

Nach einer anfänglichen schwachen Stimulierung von max. 27% (n.s.) bei einer Konzentration von 50µg/ml konnte eine 8,8-fache Stimulierung ($p < 0,001$) der MMP-1 Expression nach Inkubation mit 500µg/ml festgehalten werden. Die Antwort auf die Inkubation mit 50µg/ml bLF führte ebenfalls zu einer 8-fache Steigerung ($p < 0,001$).

MMP-9 hatte bei 500µg/ml die Spitze der Expressionssteigerung von 6,4 ($p < 0,001$). Der Vergleich mit 50µg/ml bLF zeigte eine 7,7-fache Stimulierung ($p < 0,001$).

Im Fall von ICAM-1 kam es zu einer maximalen Stimulierung von 3,1 ($p < 0,01$) bei 500µg/ml rhLF. Im Vergleich dazu führten 50µg/ml bLF zu einer 3,35-fachen Stimulierung ($p < 0,001$).

Tab. 26: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) sowie bLF (50µg/ml) auf die Expression ausgewählter Gene in diff. Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
PAI-1	rhLF	0,5	0,15	>0,05	1,22 bis -0,92
		5	0,11	>0,05	1,18 bis -0,96
		50	-0,06	>0,05	1,02 bis -1,13
		500	-0,15	>0,05	0,92 bis -1,21
	bLF	50	2,13	<0,001	3,19 bis -1,06
MMP-1	rhLF	0,5	0,02	>0,05	1,96 bis -1,92
		5	0,10	>0,05	2,04 bis -1,84
		50	0,27	>0,05	2,21 bis -1,67
		500	7,83	<0,001	9,77 bis 5,89
	bLF	50	7,04	<0,001	8,99 bis 5,10
MMP-9	rhLF	0,5	0,08	>0,05	1,88 bis -1,72
		5	0,37	>0,05	2,17 bis -1,43
		50	2,95	<0,01	4,75 bis 1,15
		500	5,38	<0,001	7,18 bis 3,58
	bLF	50	6,73	<0,001	8,53 bis 4,93
ICAM-1	rhLF	0,5	0,21	>0,05	1,45 bis -1,04
		5	0,20	>0,05	1,45 bis -1,04
		50	0,94	>0,05	2,18 bis -0,31
		500	2,05	<0,01	3,30 bis 0,80
	bLF	50	2,35	<0,001	3,59 bis 1,10

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 28a

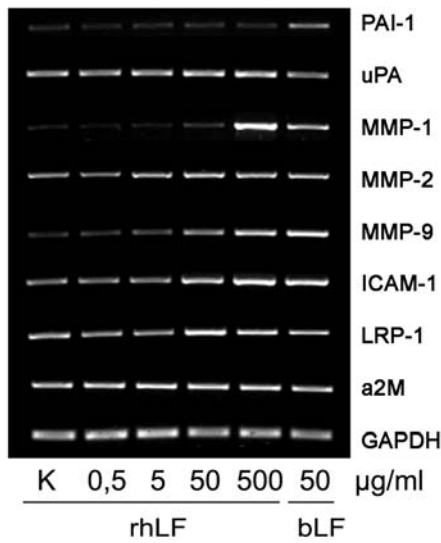


Abb. 28b

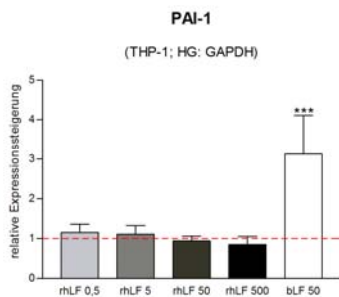


Abb. 28c

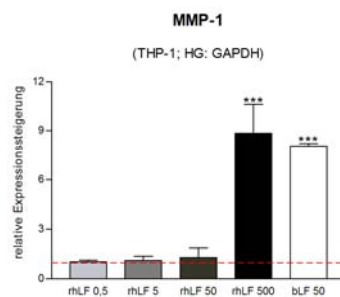


Abb. 28d

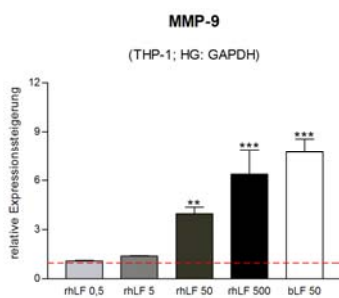


Abb. 28e

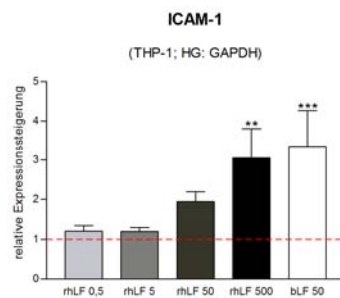


Abb.28: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin (rhLF) auf die Expression ausgewählter Gene in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin (bLF). (a) Repräsentative Abbildung der PAI-1, uPA, MMP-1, MMP-2, MMP-9, ICAM-1 2, LRP-1 und a2M Genexpression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) und 50µg/ml bLF sowie die graphische Darstellung (b) der relativen PAI-1, (c) MMP-1, (d) MMP-9 und (e) ICAM-1 Stimulation. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Methode (rhLF, bLF vs. K: **: p<0,01; ***: p<0,001).

4.2.3 Zymogramm Ergebnisse

Für dieses Experiment wurden die Überstände der 3-tägigen Proliferationstests der THP-1 Monozyten abgehoben, auf die Zellzahl normiert und für die Bestimmung der Proteaseaktivität von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymogramm eingesetzt.

MMP-2, MMP-9 und Pro-MMP-2 zeigten keine Enzymaktivität, weshalb dessen graphische und statistische Auswertung nicht möglich war, jedoch Pro-MMP-9 (Abb. 29a).

Die Proteaseaktivität von Pro-MMP-9 wurde durch SDS hervorgerufen und zeigte eine konzentrationsabhängige positive Korrelation im Fall von rhLF sowie bLF, wobei die Intensität durch bLF in etwa doppelt so stark ausfiel (Tab. 27, -28; Abb. 29 a, -b). Bei der max. Inkubationsmenge von 500µg/ml rhLF zeigte Pro-MMP-9 eine 55%ige Steigerung(n.s.). Im Vergleich dazu führten 500µg/ml bLF zu einer 109%igen Stimulierung ($p < 0,05$) der Enzymaktivität.

Tab. 27: Einfluss von rhLF sowie bLF auf die Pro-MMP-9 Aktivität in THP-1 Monozyten nach 3-tägiger Inkubation mit LF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml).

LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
rhLF	0,5	0,02	>0,05	1,02 bis -0,97
	5	0,05	>0,05	1,04 bis -0,94
	50	0,22	>0,05	1,21 bis -0,77
	500	0,55	>0,05	1,54 bis -0,44
bLF	0,5	0,04	>0,05	1,03 bis -0,96
	5	0,15	>0,05	1,14 bis -0,84
	50	0,86	>0,05	1,86 bis -0,12
	500	1,09	<0,05	2,08 bis 0,09

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 28: Vergleich der Aktivität von Pro-MMP-9 in THP-1 Monozyten nach 3-tägiger Inkubation mit LF: rhLF vs. bLF (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml)

LF	MD*	p-Wert*	KI*
0,5	-0,01	>0,05	-0,90 bis 0,88
5	-0,10	>0,05	-0,99 bis 0,79
50	-0,64	>0,05	-1,53 bis 0,25
500	-0,54	>0,05	-1,43 bis 0,35

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 29a



Abb. 29b

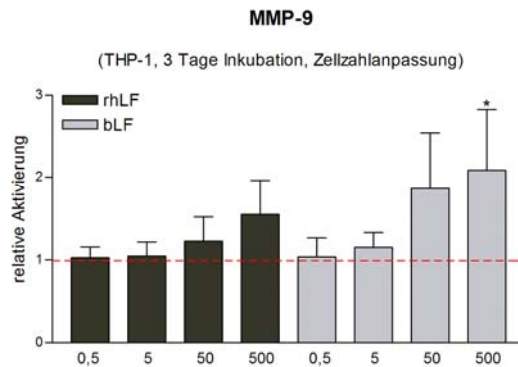


Abb. 29: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin (rhLF) auf die Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9 in THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin (bLF). (a) Repräsentative Abbildung der MMP-2 und MMP-9 Aktivität nach 3-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an rhLF und bLF (0,5-, 5-, 50-, 500µg/ml) sowie (b) die graphische Darstellung dieses Ergebnisses. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Fetal Calv Serum (FCS) diene als Blindwert. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Methode (rhLF, bLF vs. K: *: p<0,05).

Die konzentrationsabhängige Steigerung der Enzymaktivität korreliert mit der MMP-9 Expression.

Die Expression von MMP-9 wurde in etwa gleich stark durch 500µg/ml rhLF als auch durch 50µg/ml bLF. Die Steigerung der Pro-MMP-9-Aktivität zeigte dasselbe Muster.

4.2.4 Signalproteinaktivierung nach Inhibierung des p38 MAPK pathways durch SB202190 in THP-1 Monozyten

Da von den untersuchten Signalproteinen (Smad2, p38, ERK1 und ERK2) nur bei p38 eine 2,3- fache Erhöhung der Aktivierung in THP-1 Monozyten nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF zu beobachten war (Abb. 24), wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesem Signal und der Expressionsstimulierung der ausgewählten Zielgene MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 besteht.

Für diesen Zweck fand der p-p38 Inhibitor SB202190 Verwendung, der in der Lage ist, die Signalweiterleitung zu unterdrücken. In Zellen, die mit IL-1 bzw. Arsen behandelt worden waren, wurde p38 als upstream Kinase von MAP kinase- activated protein kinase-2 (MAPKAPK2 bzw. M2) entdeckt [FRESHNEY et al., 1994; ROUSE et al., 1994]. Das Pyridinyl-Imidazol, SB202190, inhibiert p-p38 und verhindert somit die darauffolgende Aktivierung von p-MAPKAPK2, die weitere Signaltransduktion und schlussendlich die Expression der Zielgene [MANTHEY et.al, 1998].

Bevor die Bedeutung des p38 MAPK pathways für die Aktivierung der genannten Zielgene untersucht werden konnte, wurde zunächst die Effektivität und Selektivität des Inhibitors mittels Westernblot ermittelt. Laut Manthey et. al (1998) ist SB202190 in der Lage, die Kinaseaktivität von p-p38, jedoch nicht die von ERK oder JNK zu inhibieren. In Abb. 30 ist die Selektivität des Inhibitors gut zu erkennen.

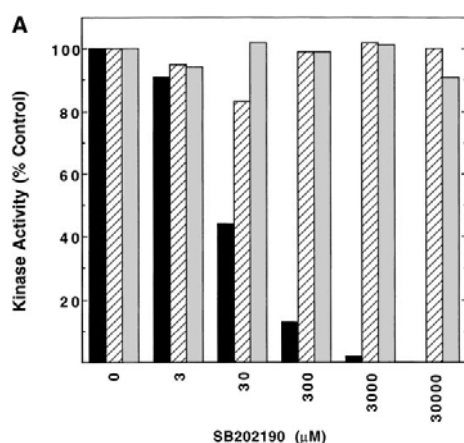


Abb. 30: Kinase Aktivität von p-p38 (schwarze Balken), ERK (strichlierte Balken) und JNK (hellgraue Balken) nach 10-minütiger Inkubation mit SB202190 (0 bis 30000μM) und 20ng/ml LPS in THP-1 Monozyten [Manthey et.al, 1998].

In Abbildung 31a kann man beobachten, dass die Inhibierung der Signalweiterleitung von p-p38 auf p-MAPKAPK2 gelungen ist. Die p-MAPKAPK2 Stimulierung bei 4-stündiger Inkubation mit 50μg/ml rhLF ist durch 2μM SB202190 von 50% (n.s.) auf 15% (n.s.) gesunken, bei 50μg/ml bLF erlosch die 2,6- fache Stimulierung ($p < 0,01$) gänzlich (Tab. 29, -30; Abb. 31b, -c).

Das p38 Signal zeigte sowohl inklusive als auch exklusive Inhibitorzusatz keine Stimulierung der Aktivierung. Die Steigerung aus vorhergehendem Versuch (Abb. 24b) von 2,3 (n.s.) nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF konnte demnach nicht wiederholt werden. Da eine Aktivierung von MAPKAP2 durch rhLF und bLF (ohne Inhibitorzusatz) stattgefunden hat, kann man diesem Phänomen derzeit keine definierte Bedeutung zuschreiben.

Die Signalproteine pERK1 und pERK2 blieben wie erwartet von dem Inhibitorzusatz unbeeindruckt.

Tab. 29: Einfluss von p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190 auf die Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4 stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF sowie bLF im Vergleich zur Kontrollprobe.

Signal	Inhibitor	LF	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	-	rhLF	-0,18	>0,05	0,76 bis -1,12
		bLF	0,22	>0,05	1,47 bis -1,04
	+	rhLF	-0,21	>0,05	0,73 bis -1,15
		bLF	0,44	>0,05	1,69 bis -0,81
p-MAPKAP2	-	rhLF	0,47	>0,05	1,41 bis -0,47
		bLF	1,61	<0,01	2,87 bis -0,36
	+	rhLF	0,15	>0,05	1,09 bis -0,80
		bLF	-0,25	>0,05	1,00 bis -1,50
pERK1	-	rhLF	-0,11	>0,05	0,83 bis -1,05
		bLF	-0,41	>0,05	0,85 bis -1,66
	+	rhLF	0,22	>0,05	1,16 bis -0,72
		bLF	-0,53	>0,05	0,72 bis -1,79
pERK2	-	rhLF	-0,28	>0,05	0,65 bis -1,23
		bLF	-0,36	>0,05	0,89 bis -1,62
	+	rhLF	0	>0,05	0,94 bis -0,94
		bLF	-0,66	>0,05	0,59 bis -1,91

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 30: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190

Signal	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	-0,02	>0,05	0,81 bis -0,87
p-MAPKAP2	-0,33	>0,05	0,51 bis -1,17
pERK1	0,33	>0,05	1,18 bis -0,51
pERK2	0,29	>0,05	1,13 bis -0,55

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 31: Vergleich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signaltransduktionsproteine nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml bLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190

Signal	MD*	p-Wert*	KI*
p-p38	0,22	>0,05	1,35 bis -0,90
p-MAPKAP2	-1,86	<0,001	-0,74 bis -2,99
pERK1	-0,13	>0,05	0,10 bis -1,25
pERK2	-0,30	>0,05	0,83 bis -1,42

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 31a

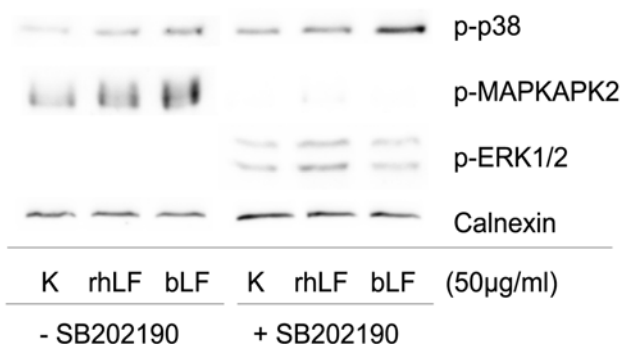


Abb. 31b

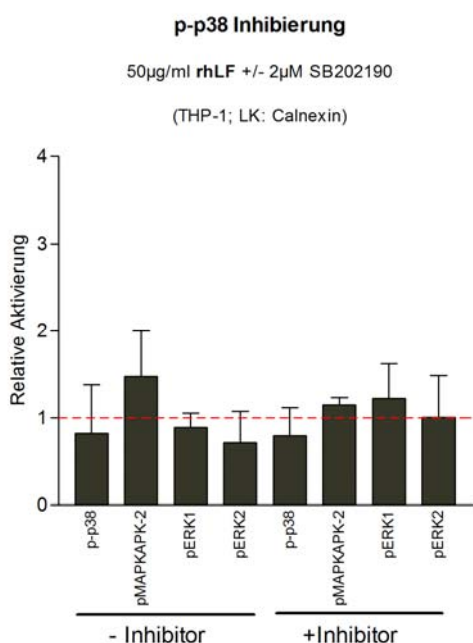


Abb. 31c

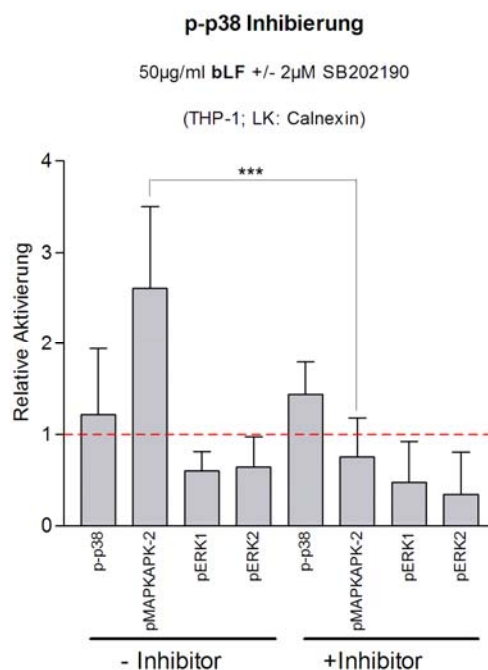


Abb. 31: Signalproteinaktivierung nach Inhibierung des p-p38 Pathways durch 2µM SB202190 in THP-1 Monozyten bei 4 stündiger Inkubation mit jeweils 50µg/ml rekombinatem humanen Laktotferin (rhLF) und bovinem Laktotferin (bLF) mittels Western Blot. (a) Repräsentative Abbildung der p-p38, p-MAPKAPK-2 und p-ERK1/2 Signalbanden sowie der Ladekontrollen panERK und Smad2 und graphische Darstellung (b) der relativen p38, MAPKAPK-2 und ERK1/2 Aktivierung nach rhLF Inkubation exkl./inkl. 2µM Inhibitorzusatz (c) der relativen p38, MAPKAPK-2 und ERK1/2 Aktivierung nach bLF Inkubation exkl./inkl. 2µM Inhibitorzusatz. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Ladekontrolle, Calnexin, normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test (exkl. vs. inkl. SB202190: ***: p<0,001).

4.2.5 Beteiligung des p38 MAPK pathways an der LF- induzierten Stimulierung von MMP-1, -9 und ICAM-1

Das p38 Signal zeigte in THP-1 Monozyten als einziges der 3 beobachteten nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF eine 2,3- fache Stimulierung der Aktivierung, weshalb ein möglicher Zusammenhang zwischen diesem Signal und der Expressionssteigerung der ausgewählten Zielgene PAI-1, MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 untersucht wurde (Abb.24). Zu diesem Zweck wurden 2µM des p-p38 Inhibitors, SB202190, zusätzlich zur 4- stündigen Inkubation mit 50µg/ml rhLF sowie bLF eingesetzt.

Die MMP-1 Expressionsstimulierung nach 4-stündiger Inkubation mit rhLF von 5,3 ($p < 0,001$) zeigte nach Inhibitorzusatz eine schwache Minderung auf das 4-fache ($p < 0,01$). Im Vergleich dazu kam es bei bLF Inkubation zu keiner Minderung bei Verwendung des Inhibitors (Tab. 32, -33, -34; Abb. 32).

Die Expression von MMP-9 blieb von dem Inhibitorzusatz unbeeindruckt, egal ob die THP-1 Monozyten mit rhLF oder mit bLF inkubiert worden war.

Wie auch schon bei MMP-1 konnte bei ICAM-1 eine schwache aber nicht signifikante Reduktion der Expression durch Inhibitorzusatz beobachtet werden. Die 2,8-fache Expressionssteigerung (n.s.) mittels rhLF sank auf 2,1 (n.s.) und die 3,6-fache Stimulierung (n.s.) mittels bLF sank auf 2,8 (n.s.).

Ingesamt kann festgehalten werden, dass es durch die Inhibierung des p38 pathways zu keiner deutlichen Änderung des Expressionsverhaltens der beobachteten Zielgene kam. Ein dominanter Zusammenhang dieser Gene mit dem p38 pathway ist daher unwahrscheinlich. Der Effekt scheint durch mehrere bzw. andere Signaltransduktionen zustande gekommen zu sein.

Tab. 32: Einfluss von p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190 auf die Expression ausgewählter Gene nach 4 stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF sowie bLF im Vergleich zur Kontrollprobe.

Gen	Inhibitor	LF	MD*	p-Wert*	KI*
MMP-1	-	rhLF	4,32	<0,001	6,43 bis 2,21
		bLF	11,18	<0,001	17,10 bis 5,26
	+	rhLF	3,05	<0,01	5,16 bis 0,94
		bLF	11,34	<0,001	17,26 bis 5,42

MMP-9	-	rhLF	0,08	>0,05	2,19 bis -2,04
		bLF	0,59	>0,05	6,51 bis -5,36
	+	rhLF	0,43	>0,05	2,54 bis -1,69
		bLF	1,43	>0,05	7,35 bis -4,50
ICAM-1	-	rhLF	1,87	>0,05	3,98 bis -0,24
		bLF	2,62	>0,05	8,54 bis 3,30
	+	rhLF	1,11	>0,05	3,23 bis -0,99
		bLF	1,75	>0,05	7,67 bis -4,17

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 33: Vergleich der Expression ausgewählter Gene nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190

Gen	MD*	p-Wert*	KI*
MMP-1	-1,27	>0,05	-3,14 bis 0,60
MMP-9	0,35	>0,05	-1,52 bis 2,22
ICAM-1	0,75	>0,05	-2,62 bis 1,12

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 34: Vergleich der Expression ausgewählter Gene nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml bLF: inklusive vs. exklusive p-p38 Signalweiterleitungsinhibitor SB202190

Gen	MD*	p-Wert*	KI*
MMP-1	0,16	>0,05	-5,08 bis 5,40
MMP-9	0,84	>0,05	-4,40 bis 6,09
ICAM-1	-0,87	>0,05	-6,11 bis 4,37

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 32a

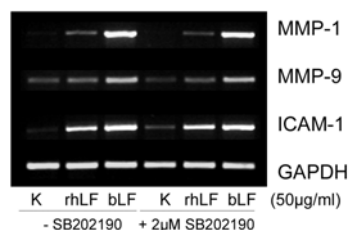


Abb. 32b

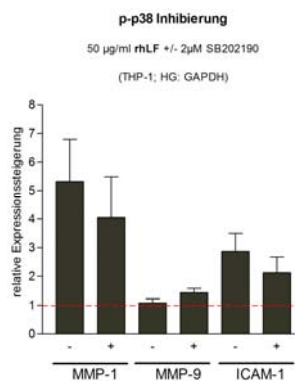


Abb. 32c

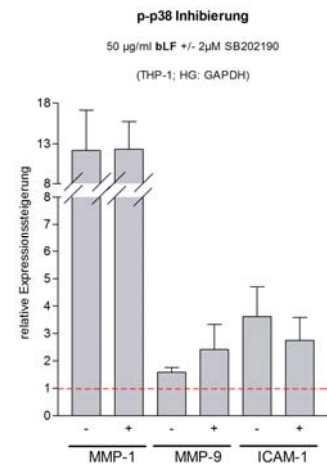


Abb. 32: Expression ausgewählter Gene nach Inhibierung der p-p38 abhängigen MAPKAPK-2 Aktivierung durch SB202190 in THP-1 Monozyten nach 4 stündiger Inkubation mit jeweils 50µg/ml rekombinatem humanen Laktoferrin (rhLF) und bovinem Laktoferrin (bLF). (a) Repräsentative Abbildung der MMP-9, ICAM-1 und MMP-1 Expression sowie des Housekeeping-Gens GAPDH und die graphische Darstellung der MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 Expression nach (b) rhLF Inkubation und (c) bLF Inkubation exkl./inkl. Inhibitor. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf das Housekeeping-Gen (GAPDH) normalisiert und die Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung (exkl. vs. inkl. SB202190) erfolgte mittels Bonferroni- Methode.

4.2.6 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Adhäsionsfähigkeit von THP-1 Monozyten im Vergleich zu einer Kontrollprobe

Da die Studienergebnisse von Benard et. al (2010) eine Assoziation zwischen der ICAM-1 Expression in THP-1 Monozyten und deren Aggregatbildung zeigten [BENARD et. al, 2010], galt es zu überprüfen, ob dieser Effekt auch durch rhLF zu erzielen ist.

Abb. 33a

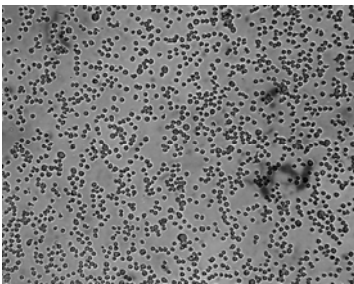


Abb. 33b

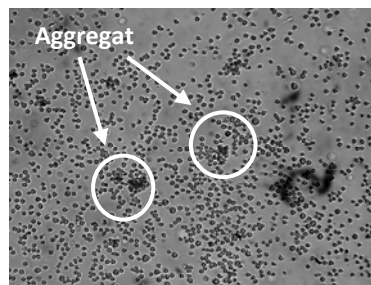


Abb. 33c

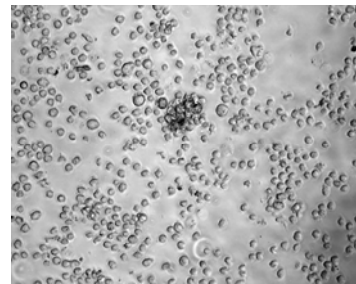


Abb. 33: Mikroskopische Darstellung von THP-1 Monozyten (Phasenkontrast) nach eintägiger Inkubation mit (a) 1x PBS (Kontrollprobe), (b) 50µg/ml rhLF sowie (c) eine 10-fache Vergrößerung eines THP-1 Aggregates.

In Abbildung 33 ist klar zu erkennen, dass die Kontrollprobe zu keiner, die eintägige Inkubation mit 50µg/ml rhLF jedoch zur Bildung mehrerer, etwa 10- bis 20-zelliger Aggregate führte.

4.2.7 Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Proliferationsrate von THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin

Die Proliferationsrate von THP-1 Monozyten konnte durch 3-tägige Inkubation mit rhLF und bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml) nicht gesteigert werden. Die Inkubation mit bLF zeigte im Bereich höherer Konzentrationen sogar das Gegenteil im Sinne einer Wachstumshemmung. Nach 3 Tagen wurde eine Hemmung von 22% (n.s.) bei 50µg/ml bLF und von 45% ($p < 0,001$) bei 500µg/ml bLF mittels MTT-Test festgestellt (Tab. 35, -36, -37; Abb. 34a, -b).

Tab. 35: Einfluss von rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml) auf die Proliferationsrate THP-1 Monozyten nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Tage	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
1	rhLF	0,5	0,07	>0,05	0,36 bis -0,23
		5	0,02	>0,05	0,31 bis -0,28
		50	0,15	>0,05	0,45 bis -0,14
		500	-0,06	>0,05	0,23 bis -0,36
2	rhLF	0,5	0,04	>0,05	0,35 bis -0,25
		5	0,05	>0,05	0,34 bis -0,24
		50	0,02	>0,05	0,31 bis -0,28
		500	-0,13	>0,05	0,16 bis -0,43
3	rhLF	0,5	0,10	>0,05	0,39 bis -0,20
		5	0,01	>0,05	0,30 bis -0,28
		50	0,03	>0,05	0,32 bis -0,27
		500	-0,06	>0,05	0,23 bis -0,36

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 36: Einfluss von bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml) auf die Proliferationsrate THP-1 Monozyten nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation im Vergleich zur Kontrollprobe.

Tage	LF	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
1	bLF	0,5	-0,04	>0,05	0,19 bis -0,27
		5	-0,09	>0,05	0,14 bis -0,31
		50	-0,15	>0,05	0,07 bis -0,38
		500	0,02	>0,05	0,24 bis -0,21
2	bLF	0,5	-0,09	>0,05	0,13 bis -0,32
		5	-0,04	>0,05	0,19 bis -0,26
		50	-0,22	>0,05	0,01 bis -0,44
		500	-0,31	<0,01	-0,09 bis -0,54
3	bLF	0,5	-0,01	>0,05	0,22 bis -0,23
		5	0,06	>0,05	0,28 bis -0,17
		50	-0,22	>0,05	0,01 bis -0,45
		500	-0,45	<0,001	-0,23 bis -0,68

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Tab. 37: Einfluss der Proliferation der Caco-2 Zellen nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation mit LF (in Bezug auf die Konzentration): rhLF vs. bLF (Bestimmung mittels MTT-Test)

Tage	Konz.	MD*	p-Wert*	KI*
1	0,5	0,11	>0,05	-0,15 bis 0,36
	5	0,10	>0,05	-0,15 bis 0,36
	50	0,31	<0,01	0,05 bis 0,56
	500	-0,08	>0,05	-0,34 bis 0,17
2	0,5	0,14	>0,05	-0,12 bis 0,39
	5	0,09	>0,05	-0,17 bis 0,34
	50	0,24	>0,05	-0,02 bis 0,49
	500	0,18	>0,05	-0,08 bis 0,44
3	0,5	0,10	>0,05	-0,15 bis 0,36
	5	-0,05	>0,05	-0,30 bis 0,21
	50	0,25	>0,05	-0,01 bis 0,50
	500	0,40	<0,001	0,14 bis 0,65

*Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test

Abb. 34a

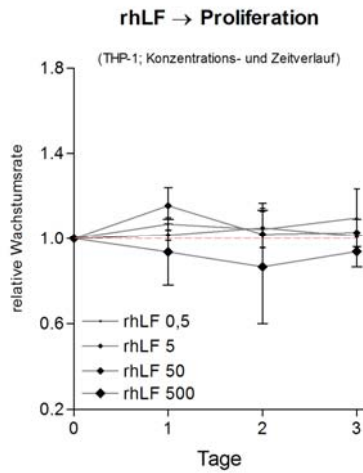


Abb. 34b

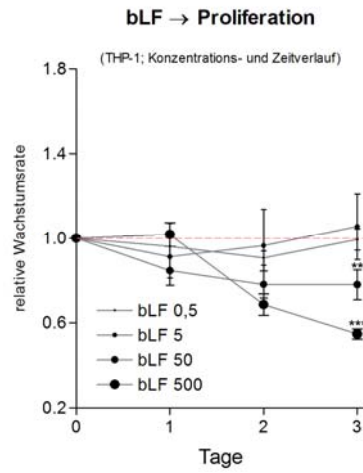


Abb. 34: Einfluss von rekombinantem humanen Laktoferrin auf die Proliferation von THP-1 Monozyten im Vergleich zu bovinem Laktoferrin. Graphische Darstellung der relativen Wachstumsrate nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation (a) mit 0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml rhLF (b) mit 0,5-, 5-, 50 und 500µg/ml bLF. Mittelwert (+/- SD) von drei unabhängigen rtPCR Experimenten. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normalisiert und diese auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bonferroni- Test (rhLF, bLF vs. K: **: p<0,01; ***: p<0,001).

4.2.8 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

rhLF			bLF			Beobachtung
UD. Caco-2	D. Caco-2	THP-1	UD. Caco-2	D. Caco-2	THP-1	Westernblot
-	-	-	+ (s)	-	+++ (s)	p-Smad2
-	-	-	-	-	-	pERK1/2
-	-	+ (ns)	-	-	+ (ns)	p-p38
						PCR
-	-	-	-	-	+++ (s)	PAI
-	-	++ (s)	-	-	++ (s)	MMP-1
-	-	++ (s)	-	-	++ (s)	MMP-9
-	-	+ (s)	-	-	+ (s)	ICAM-1
-	-	-	-	-	-	uPA, MMP-2,-3, LRP-1, a2M
						Zymogramm
		-			+ (s)	Pro-MMP-9
		-			-	MMP-9,(Pro)-MMP-2
						MTT-Test/ CASY
Steigt mit Konzentration und Zeit (ns)		-	Fällt mit Konzentration, steigt mit Zeit (ns)		Sinkt mit Konzentration und Zeit (s)	Wachstumsrate

Maximale Stimulierung: +: 2 bis 5-fach; ++: 5 bis 10-fach; +++: >10-fach; -: kein Effekt; (s)...signifikant; (ns)...nicht signifikant

5 DISKUSSION

5.1 Entwicklung des kindlichen Darms: rhLF vs. bLF

Die Entwicklung des menschlichen Darms wird merklich über die in der Muttermilch enthaltenen Substanzen beeinflusst. Dabei wurde einerseits beobachtet, dass LF in der Lage ist, das Wachstum von Enterozyten zu begünstigen, andererseits, dass Säuglinge die gestillt werden eine schnellere Entwicklung des Darms gegenüber Formula gefütterten Kindern zeigen [BUCCIGROSSI, 2007].

5.1.1 Einfluss auf die Proliferation

Die konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung der Caco-2 Zellen durch natives LF (nLF; 10% Eisen- gesättigtes LF + 90% Eisen- ungesättigte Isoformen), gezeigt durch Buccigrossi (2007), konnte mit rhLF sowie bLF (im Vergleich) wiederholt werden. Rekombinantes humanes Laktoferrin aus Reis (rhLF) lag mit einer max. Proliferationssteigerung von 51% (n.s.) nach 2-tägiger Inkubation mit 50µg/ml im Bereich der durch 10µg/ml bis 100µg/ml nLF erzielten Werte, bei ebenfalls für 2 Tage inkubierten Caco-2 Zellen. Die Ergebnisse durch 50µg/ml bLF hingegen zeigten lediglich eine 16%ige (n.s.), mit 0,5µg/ml jedoch eine 25%ige (n.s.) Wachstumssteigerung. Dieses Ergebnis deutet auf einen positiv proliferativen Caco-2- Wachstumseffekt höherer Konzentrationen von rhLF und niedrigerer Konzentrationen von bLF hin.

Als möglicher Nutzen der höheren Konzentration von nLF in Muttermilch am Anfang der Laktation (im Kolostrum) wird die fördernde Wirkung auf die Entwicklung des Darms angesehen [BUCCIGROSSI, 2007]. Da rhLF aus Reis zum gleichen Wachstumseffekt wie nLF aus der Muttermilch führt, wäre eine Anreicherung von Formulanahrung mit rhLF denkbar. Um einem möglichen Risiko vorzubeugen sollte an eine Anpassung der Konzentration des in der Formulanahrung enthaltenen rhLF an die Konzentration des in der Muttermilch enthaltenem und vom Reifungsgrad abhängigen nLF gedacht werden.

5.1.2 Einfluss auf den immunmodulierenden Effekt

Im Gegensatz zu humanem Laktoferrin (hLF), das sich in vielen Kompartimenten des menschlichen Körpers widerfindet, beschränkt sich die direkte immunoprotektive Wirkung von oral gegebenem bovinem Laktoferrin (bLF) auf den Intestinaltrakt (Abb. 2). bLF wird durch die Magenpassage nicht komplett zersetzt, es verbleiben Laktoferricin tragende Peptide, deren Absorption ins Blut jedoch auszubleiben scheint [KUWATA et al, 2001; WAKABAYASHI et al., 2004]. Bovines LF und dessen Peptide können aber in Enterozyten und Immunzellen des Darms (dendritische Zellen und Lymphozyten) aufgenommen werden und/ oder intrazelluläre Signale aktivieren und somit die Transkription bestimmter Gene beeinflussen. Dies führt einerseits zur Migration der Immunzellen zur betroffenen Stelle, andererseits zur Sekretion humoraler Faktoren wie Zytokinen, die durch Zirkulation die erkrankte Stelle erreichen. Abschließend arbeiten humorale Faktoren und Immunzellen zusammen, um die Infektion und Entzündungsbeschwerden zu verbessern [TOMITA et al., 2009].

Damit Immunzellen überhaupt zur Migration befähigt sind, bedarf es einer Fülle von Extrazellulärmatrix (EZM) verändernder Verbindungen. Zu diesen Verbindungen zählen Matrix Metalloproteinasen (MMPs), das Plasminogen System, bestehend aus der aktivierenden Urokinase (uPA) und des blockierenden Inhibitors (PAI-1), sowie Adhäsionsmoleküle (Bsp: ICAM-1). Mehr Information zu den EZM modellierenden Verbindungen unter Punkt 2.4.3.

Während die Beobachtung der Expression von uPA, MMP-2, LRP-1 und a2M in THP-1 Monozyten nach LF Inkubation im Zeitverlauf (1-, 4- und 24-stündige Inkubation) keine Steigerung zeigte, konnte eine signifikante Stimulierung der MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 Expression durch 50µg/ml rhLF erreicht werden. Im Vergleich dazu führte die Inkubation der THP-1 Monozyten mit 50µg/ml bLF zusätzlich noch zu einer signifikanten PAI-1 Expressionssteigerung (Abb. 26).

Die Expression von PAI-1, MMP-1 und -9 sowie ICAM-1 wurde neben der zeitabhängigen Inkubation mit 50µg/ml LF auch auf die konzentrationsabhängige (24-

stündige Inkubation mit 0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) Stimulierbarkeit geprüft (Abb.28). Dabei zeigte sich, dass die maximale Stimulierung immer bei 500µg/ml rhLF zu beobachten war. Einzig PAI-1 zeigt überhaupt keine Expressionssteigerung.

Die gesteigerte Expression dieser EZM verändernden Verbindungen kann mit einer verstärkten Migration der Monozyten zum Entzündungsherd in Verbindung gebracht werden. Im Vergleich von rhLF zu bLF zeigt sich eine Präferenz zu Gunsten von rhLF, da die MMPs, MMP-1 und MMP-9, und ICAM-1 verstärkt exprimiert wurden, was wiederum der Einwanderung der Monozyten zum Ort der Entzündung helfen würde. Zusätzlich positiv zu bewerten ist, dass die massive Stimulierung der PAI-1 Expression ausbleibt und somit möglicherweise ein pro-kanzerogener Effekt (wie unter 5.2.2. beschrieben) vermieden werden könnte.

Die Dosisabhängigkeit der Expressionssteigerung in Folge von rhLF bestärkt die Bedeutung von LF als immunologisch relevanten Mediator bei Entzündungsreaktionen. Während einer Entzündung wird LF im betroffenen Gewebe in dramatisch hoher Konzentration aus sekundären Granula neutrophiler Granulozyten freigesetzt. LF kann anschließend im Plasma von einem Normalwert von 0,4-2mg/l auf bis zu 200mg/l bei Sepsis ansteigen [BENNETT et al., 1978; MAAKS et al., 1989]. Da am Entzündungsort selbst LF sofort an Glykosaminoglykane der Proteoglykane von Zelloberflächen bindet, spiegelt der Plasmawert nur die Spitze des Eisbergs wider [ZIERE et al., 1996; MANN et al., 1994; LEGRAND et al., 1997].

Die MMP Aktivität ist stark von dessen Aktivierung abhängig [HAHN- DANTONA et. al, 2001] sowie von möglichen Inhibitoren wie dem im Plasma befindlichen α_2 -Makroglobulin oder den Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs). MMPs werden zuerst als Pro- Form (sog. Zymogene) exprimiert, die dann extrazellulär (bei Fibroblasten z.Bsp. mittels Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer: EMMPRIN) und/oder intrazellulär (z.Bsp. mittels Prokonvertase Furin) zu der aktiven Form umgewandelt werden, bevor sie abschließend endozytiert und abgebaut werden [EMONARD et. al, 2005].

Die Gelatinaseaktivität des verstärkt exprimierten MMP-9 nach 3-tägiger Inkubation mit rhLF sowie bLF wurde in THP-1 Monozyten mittels Zymogramm geprüft. Die Proteaseaktivität der Pro- Form von MMP-9 zeigte eine konzentrationsabhängige positive Korrelation im Fall von rhLF und bLF, wohingegen die aktivierte Form nicht detektiert werden konnte (Abb. 29). Neben PAI-1 wird auch MMP-9 mit prokanzerogenen Effekten in Verbindung gebracht. Eine stärkere Aktivierung durch bLF könnte diesbezüglich negativ interpretiert werden.

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 unterstützt nicht nur die Migration der Immunzellen des Darms, sondern hilft außerdem die im Plasma zirkulierenden Monozyten an die Gefäßwand zu binden und trans- bzw. parazellulär ins Gewebe und zum Ort der Entzündung einzuwandern [RHAMAN et al., 2009]. Sowohl rhLF als auch bLF führten zu einer verstärkten Expression von ICAM-1, was im Fall einer Entzündung die Einwanderung der Monozyten begünstigt. Auch wenn bLF zu einer höheren Expressionssteigerung führt, ist doch das rhLF als relevanter zu sehen. rhLF ist dem körpereigenem humanem LF ähnlicher (mehr Informationen zu Struktureigenschaften siehe 2.2.) und kommt neben Muttermilch (1-7g/l Milch) [HOUGHTON et al., 1985] auch in Nabelschnurblut, Vaginalsekret sowie Tränenflüssigkeit vor und wird außerdem in dramatisch hoher Konzentration aus sekundären Granula neutrophiler Granulozyten während einer Entzündung freigesetzt [BENNETT et al., 1978; MAAKS et al., 1989].

Wie anfangs erwähnt kann LF neben den Immunzellen des Darms, an Rezeptoren der Enterozyten binden. Durch Differenzierung der Caco-2 Zellen ist es möglich Enterozyten ähnliche Zellen zu erhalten [PINTO et al., 1983]. Bevor die Genexpressionsstimulierung durch LF getestet wurde, wurden die Caco-2 Zellen drei Wochen bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert, um den Phänotypen des Enterozyten zu erhalten. Die Antwort der differenzierten Caco-2 Zellen auf Inkubation mit rhLF sowie bLF führte jedoch zu dem Ergebnis, dass keine der beiden Formen in der Lage war, die Expression von MMP-1 und PAI-1 zu stimulieren, noch die Expression von MMP-2, -3, und -9 auszulösen (Abb. 21). Da Enterozyten eine Darm-spezifische, gereifte Zellform darstellen, ist es nicht verwunderlich, dass keine Matrixverändernden

Verbindungen wie MMPs und dergleichen vermehrt exprimiert werden. Dass jedoch der gleiche Effekt auch schon bei den undifferenzierten Caco2-Zellen zu finden war, lässt sich nicht so einfach erklären. Insgesamt ist aber klar festzuhalten, dass durch Ausbleiben einer zusätzlichen Stimulierung der Expression dieser Verbindungen kein Nachteil beim Einsatz von rhLF oder bLF entsteht und somit keiner LF-Spezies, im Fall oral zugeführten LFs bei dem Kontakt mit Enterozyten, eine Präferenz zuzuschreiben wäre.

Die Ergebnisse der Beobachtung der Genexpressionsstimulierung durch rhLF im Vergleich zu bLF lassen die Diskussion nicht verstummen, welches LF zur Anreicherung von Lebensmittel herangezogen werden soll. Im Focus dabei steht v.a. die Anreicherung von Formulamilch. Um jedoch im Fall der positiven immunologischen Wirkung der Muttermilch, dem Effekt von humanem LF näher zu kommen, wäre die Überlegung, zukünftig Formulanahrung anstatt mit bLF mit rhLF anzureichern, ein Schritt in die richtige Richtung.

5.2 Krebsentstehung und Metastasierung: rhLF vs. bLF

5.2.1 Proliferationssteigerung/ -hemmung von Krebszellen

Da es sich bei Caco-2 Zellen um Krebszellen handelt, kann der Gedanke einer negativen Auswirkung in Bezug auf das Tumorwachstum aufkommen. Mehrere Studien haben sich mit der Frage der Wirkung von LF auf verschiedenste Krebsarten beschäftigt und konnten zeigen, dass LF nicht nur in der Lage ist die Entstehung sondern auch das Wachstum eines bestehenden Tumors zu beeinträchtigen. Beispielsweise zeigten Ratten nach einer Diät mit supplementiertem bLF weniger Diethylnitrosamin-, Dihydroxy-di-N-propylnitrosamin- und N-Nitrosomethylbenzylamin- induzierte Ösophagus- und Lungenkarzinomen [USHIDA et.al, 1999].

Eine Studie an T- Zell immunokompromitierten *nu/nu* Mäusen ergab, dass nach einer 8-tägigen Gabe von 1mg/kg rhLF (2,9g/m²; 2x täglich) eine Wachstumshemmung des

Plattenepithelkarzinoms (O12) von 80% ($p < 0,001$) erzielt wurde. Ähnliche Effekte zeigten sich auch bei Mamma- Adenokarzinomen von immunokompetenten BALB/c-Mäusen bei einer täglichen oralen Gabe von 1mg/kg rhLF [VARADHACHARY, 2004].

Neben Caco-2 Zellen wurde eine proliferationssteigernde Wirkung durch Inkubation mit rhLF auch bei Mamma-, Hybridom- und humanen Embryonalzellen sowie Osteoblasten beobachtet. Der Vergleich der 3 Isoformen (pis: 50%-, apo: <10%-, holo: >90% Eisen- gesättigt) brachte holo- rhLF als stärksten Wachstumsfaktor hervor [HUANG, 2008].

Nach 2-tägiger Stimulierung der Caco-2 Zellen mit 50µg/ml rhLF konnte eine Proliferationssteigerung um 51% (n.s.) beobachtet werden. Im Vergleich führten 50µg/ml bLF zu einem schwächeren Wachstumsanstieg der Caco-2 Zellen (16%, n.s., nach 2 Tagen).

Als pis-Isoform des rhLF bezeichnet man die teilweise Eisen-gesättigte Form des rhLF. Für die Experimente mit THP-1 Monozyten wurde teilweise Eisen-gesättigtes rhLF verwendet. Eine wachstumsfördernde Wirkung wurde jedoch nicht beobachtet. So führte eine 3-tägige Inkubation mit rhLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) weder bei höchster noch bei niedrigster Konzentration zu einer Wachstumssteigerung der THP-1 Monozyten. Im Vergleich dazu führte die gleiche Behandlung der THP-1 Monozyten mit bLF sogar zu einer Proliferationshemmung, mit der Spitze von 45% ($p < 0,001$) bei einer Inkubation mit 500µg/ml bLF nach 3 Tagen.

Eine Studie an humanen epithelialen Krebszellen (HeLa) kam nach Inkubation mit bLF zu demselben Ergebnis. Hierbei führte die 6-tägige Inkubation mit bLF im Konzentrationsverlauf (0,5-, 5-, 50- und 500µg/ml) ebenfalls zu einer Proliferationshemmung, wenn auch mit 25% ($p < 0,001$) nicht in dem Ausmaß der THP-1 Monozyten. Neben der fehlenden typischen Proliferationssteigerung durch LF wird eine fehlende ERK1/2 und p38 Aktivierung beobachtet [ZEMANN, 2010]. Die Proliferationssteigerung von Chondrozyten sowie Osteoblasten hingegen geht mit einer ERK1/2 und p38 Aktivierung einher [BRANDL, 2010]. Eine 4-stündige Inkubation

der THP-1 Monozyten mit 50µg/ml rhLF sowie bLF führte ebenfalls zu keiner ERK1/2 Aktivierung. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen der fehlenden Proliferationssteigerung und dem Fernbleiben der ERK1/2 Aktivierung schließen. Das p-p38 Signal hingegen wurde durch 50µg/ml rhLF sowie bLF in etwa verdreifacht (n.s.).

5.2.2 Differenzierung der Krebszellen

Wie unter Punkt 5.1.2. erwähnt, handelt es sich bei MMPs um Matrix modellierende Metalloproteinasen. Der Zusammenhang von MMP-2 und MMP-9 mit Krebs konnte in mehreren Studien gezeigt werden, wobei das Fehlen von MMP-2 sowie MMP-9 mit verminderter Angiogenese, Tumorwachstum und –metastasierung assoziiert waren [HAHN- DANTONA et. al, 2001]. MMPs selbst sind ebenso wie LF in der Lage an LRP zu binden. LRP wiederum kann den Level von MMPs (MMP-2, -13 und -9) modulieren und somit die exzessive extrazelluläre proteolytische Aktivität im Zaum halten. Eine verringerte Expression und Aktivität von LRP wird vor allem in Tumoren beobachtet. Dieses Phänomen geht mit einem verringerten Proteaseabbau einher und führt so zu einer höheren Konzentration dieser Enzyme bei einem Tumor. Kancha et al. hat in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen Tumorinvasion und geringerem LRP-Gehalt festgestellt [BERNHARD et al., 1995; KANCHA et al., 1994].

Die Antwort der undifferenzierten Caco-2 Zellen auf die Inkubation mit rhLF sowie bLF in Bezug auf die Genexpression von MMP-2, -3 und -9 blieb komplett aus und die von PAI-1 sowie MMP-1 zeigte keine Expressionserhöhung (Abb. 18). Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass weder rhLF noch bLF zu einer verstärkten Differenzierung der Caco-2 Zellen bzw. der Tumorinvasion führen. Passend zu dem Ergebnis der Genexpressionsuntersuchung wurde auch bei der Beobachtung der Aktivierung bestimmter Signalproteine, wie der MAP Kinasen, p38 und ERK1/2 sowie dem TGF-β pathway Signal, Smad2, keine Stimulierung der Aktivierung durch Inkubation mit rhLF festgestellt. Allerdings zeigte sich nach Inkubation mit bLF eine signifikante Smad2 Aktivierung.

Anders als bei den Caco-2 Zellen wurde in THP-1 Monozyten das aktivierte MAP Kinase Signalprotein p-p38 durch rhLF sowie bLF auf ca. das Doppelte (n.s) gesteigert. p-Smad2 blieb durch rhLF wieder unbeeindruckt, durch bLF hingegen wurde es fast verdreißigfacht (26,5-fache Aktivierung nach 1h mit 50µg/ml; $p < 0,001$). Lediglich pERK1/2 zeigte weder durch rhLF noch durch bLF eine Aktivitätserhöhung (Abb. 24).

Da es in THP-1 Monozyten durch LF zur Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege kam, lag der Verdacht nahe, dass sich auch auf Genexpressionsebene Effekte zeigen würden. Während die Beobachtung der Expression von uPA, MMP-2, LRP-1 und a2M keine Steigerung ergaben, konnte eine signifikante MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 Expressionssteigerung durch 50µg/ml rhLF gezeigt werden. Im Vergleich dazu führte die Inkubation der THP-1 Monozyten mit 50µg/ml bLF zusätzlich zu einer signifikanten PAI-1 Expressionssteigerung (Abb. 26).

Die verstärkte Expression dieser EZM modellierenden Verbindungen geht mit der verstärkten Differenzierung der THP-1 Monozyten einher und kann die Invasion der Tumorzellen begünstigen. Benard et al. gelang es 2010 einen Zusammenhang zwischen ICAM-1 und der Aggregation von Monozyten im THP-1 Modell aufzudecken [BENARD et al., 2010]. Dieses Phänomen konnte durch eintägige Inkubation der THP-1 Monozyten mit 50µg/ml rhLF bestätigt werden (Abb. 33). Der Zusammenhang zwischen der gesteigerten MMP-9 Expression und der ausbleibenden LRP Expression wirkt durch verringerten Abbau der Proteasen positiv auf die Invasion und Metastasierung des Tumors [BERNHARD et al., 1995; KANCHA et al., 1994].

Proteolyse und im speziellen das Plasminogen aktivierende System, welches über die Urokinase (uPA), dessen Rezeptor (uPAR) und Inhibitor (PAI-1) reguliert wird, spielen bei der Tumorgenese, -progression, -invasion und Metastasenbildung eine wichtige Rolle [CARROLL & BINDER, 1999; BLASI & CARMELIET, 2002; SIDENIUS & BLASI; 2003; BINDER & MIHALY, 2007]. Dabei lässt sich aus etlichen Studien eine positive Korrelation zwischen der uPA- und uPAR Expression und der Malignität des Tumors beobachten. Paradoxerweise kam man aber bei Untersuchungen an Krebspatienten zu dem Schluss, dass Patienten mit hoher PAI-1 Expression, dem Inhibitor dieses Systems,

eine deutlich schlechtere Prognose zu erwarten haben. Diesem Phänomen gab man den passenden Namen „das PAI-1 Paradoxon“ [BINDER und MIHALY, 2008].

Während also die Inkubation mit rhLF zu keiner merklichen PAI-1 Expressionssteigerung führte, war eine massive Stimulierung durch bLF in THP-1 Monozyten zu beobachten. Dieses Ergebnis lässt den Einsatz von bLF als Krebstherapeutikum bezweifeln.

5.3 Zusammenhang zwischen Signalaktivierung und Expressionssteigerung

Bei der Versuchreihe von rhLF und bLF im Zeit- sowie Konzentrationsverlauf im undifferenzierten (Abb. 17 und -18) sowie differenzierten Caco-2 Zellmodell (Abb. 19 - 21) stellt sich nicht die Frage eines möglichen Zusammenhangs zwischen Signaltransduktion durch p-p38, pERK1/2 und p-Smad2 und der Steigerung der Expression von PAI-1, MMP-1,-2,-3 und -9, da es weder zu einer Aktivierung der Signale noch zu einer Expressionssteigerung der Zielgene kam.

Bei der Versuchreihe von rhLF und bLF in THP-1 Monozyten hingegen (Abb. 24 -27) wurde ein möglicher Verantwortlicher für die Expressionssteigerung von MMP-1 und -9 sowie ICAM-1 gesucht. Da von den Signalproteinen Smad2, p38, ERK1 und ERK2 nur bei p38 eine 2,3- fache Aktivierung in THP-1 Monozyten nach 4-stündiger Inkubation mit 50µg/ml rhLF zu beobachten war (Abb. 24) wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesem Signal und der Expressionsstimulierung der ausgewählten Zielgene MMP-1, -9 und ICAM-1 besteht. Zu diesem Zweck wurde der p-p38 Inhibitors SB202190 eingesetzt.

Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass p38 sehr unwahrscheinlich als verantwortlicher Pathway für die Expressionssteigerung von PAI-1, MMP-1 und -9 in Frage kommt.

Da die Signaltransduktionswege über die MAP Kinase pathways p38 und ERK1/2 sowie über das TGF-β Signal, Smad2, wegfallen, stellt sich die Frage, welches Signal für die Weiterleitung des LF Reizes und die stimulierende Wirkung auf die Expression

bestimmter EZM modellierenden Verbindungen in Frage kommt. Als möglicher Kandidat könnte NF- κ B diskutiert werden.

NF- κ B spielt v.a. im Immunsystem eine wichtige Rolle [GHOSH et al., 1998]. Zur NF- κ B Familie zählen 5 Mitglieder: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2), die in unstimulierten Zellen als Homo- bzw. Heterodimer allesamt an Proteine der I κ B Familie gebunden sind. Dieser Komplex verhindert die Translokation in den Nukleus.

Die Aktivierung von NF- κ B kann klassisch über Phosphorylierung von I κ B, via Aktivierung der β -Einheit des I κ B Kinase Komplex (IKK), durch pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder alternativ über Phosphorylierung von p100, via Aktivierung von IKK α , ablaufen. Phosphoryliertes I κ B wird anschließend durch die Ubiquitinligase polyubiquitiniert und teilweise zersetzt. p100 wird mittels Proteasomen abgefertigt. Die freigelegten NF- κ B Dimere sind nun in der Lage in den Nukleus zu translozieren und durch Promotor- und Enhancerbindung die Expression bestimmter Gene zu regulieren [HAYDEN & GHOSH, 2010].

In Endothelzellen spielt NF- κ B beispielsweise bei der Stimulierung der Expression von ICAM-1 eine Rolle. Dabei wird entweder NF- κ B direkt aktiviert oder die Bindungsfähigkeit von NF- κ B an die Promoterregion von ICAM-1, wiederum durch andere Signale vermittelt, verstärkt [EMONARD et al., 2005]. In der Studie von Oh et al. konnte die Aktivierung von NF- κ B durch humanes Laktoferrin über den klassischen NF- κ B Weg in HeLa Zellen demonstriert werden [OH et al., 2004]. Dadurch scheint ein Zusammenhang zwischen der gefundenen ICAM-1 Expressionssteigerung nach der Inkubation der THP-1 Monozyten mit rhLF mittels Aktivierung von NF- κ B nicht abwegig.

Die Rolle von NF- κ B bei der Regulation von MMP-1 und -9 in THP-1 Monozyten bleibt vorerst unklar. Das Vorhandensein einer NF- κ B Bindungsstelle des MMP-9 Promoters [SATO et al., 1993; FINI et al., 1994] und eines NF- κ B- ähnlichen Elements auf der

MMP-1 Promoterregion [VINCENTI, 1998] deuten aber auf ein Zusammenspiel von NF- κ B und der Expression der MMPs, MMP-1 und -9, hin.

Außerdem konnten Bond et al. 2001 zeigen, dass die klassische Aktivierung von NF- κ B mit einer gesteigerten MMP-1, -3 und -9 Expression in VMSCs einhergeht [BOND et al., 2001]. Die Stimulierung der MMP-1 und MMP-9 Expression durch rhLF in THP-1 Monozyten könnte also, zusätzlich zu der ICAM-1 Expressionssteigerung, über eine mögliche NF- κ B Aktivierung erklärt werden.

Der Verdacht, dass NF- κ B tatsächlich eines der verantwortlichen Signale ist, muss jedoch erst durch eine detaillierte Untersuchungsreihe überprüft werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Neben der Aufgabe Eisen zu transportieren zeigt Laktoferrin (LF) antimikrobielle, antibakterielle, antiparasitäre, antivirale, antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkungen und verfügt außerdem über die Eigenschaft die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen zu beeinflussen [ADLEROVA et al., 2008]. Mit der Frage, wodurch diese Wirkungen zustande kommen, beschäftigen sich unterschiedlichste Forschungsgruppen seit Jahrzehnten.

Durch diese Masterarbeit konnte erstmals die unterschiedliche Wirkung von rekombinantem humanen Laktoferrin (rhLF) aus transgenem Reis im Vergleich zu bLF gezeigt werden. Im Fokus der Beobachtung standen die Aktivierung der Signalproteine, p38 MAPK, ERK1/2 und Smad-2 (Analyse mittels Westernblot), die Stimulierung der Expression Extrazellulärmatrix- modellierender Proteine (Analyse mittels rtPCR) und das Proliferationsverhalten von Caco-2 Zellen (Bestimmung mittels MTT-Test) und THP-1 Monozyten (Zellzahlbestimmung mittels Casy).

Caco-2 Zellen zeigten weder im undifferenzierten noch im differenzierten Stadium, weder bei kürzester noch bei längster Inkubationszeit und weder bei niedrigster (0,5µg/ml) noch bei höchster (500µg/ml) Konzentration an rhLF eine signifikante Aktivierung von p38, ERK1/2 und Smad2 oder eine Stimulierung der Expression von PAI-1, MMP-1, -2, -3 und -9. Die Proliferation der Caco-2 Zellen stieg mit zunehmender Konzentration und längerer Inkubation mit rhLF(51%, n.s.).

Der Vergleich mit bLF zeigte eine signifikante doppelte Aktivierung von Smad2 und eine schwächere Proliferationssteigerung (25%, n.s.) in undiff. Caco-2 Zellen.

In THP-1 Monozyten konnte in Antwort auf rhLF eine Stimulierung der Phosphorylierung von p38, jedoch nicht von ERK1/2 und Smad2 festgestellt werden. Die Expression von uPA, MMP-2, LRP-1, a2M und PAI-1 wurde nicht signifikant verstärkt, jedoch die von MMP-1, -9 und ICAM-1.

Im Vergleich dazu führte bLF neben der p38 Aktivierung auch zu einer massiven Erhöhung von p-Smad2 (26,5-fach nach 1-stündiger Inkubation, $p < 0,001$) in THP-1 Monozyten, die mit einer massiven Expressionssteigerung von PAI-1 (18,6-fach, $p < 0,001$) einherging. MMP-1, MMP-9 und ICAM-1 zeigten das gleiche Muster der zeitabh. Expressionssteigerung. Die Proliferation der THP-1 Monozyten blieb durch rhLF unbeeinflusst, durch bLF hingegen sogar signifikant gehemmt (Hemmung von 45% nach 3-tägiger Inkubation mit $500\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$).

Die unterschiedliche Antwort auf rhLF bzw. bLF soll zukünftig bei der Wahl der passenden LF- Spezies als darmprotektiver Zusatz zu Formulanahrung oder als Krebstherapeutika helfen.

7 ABSTRACT

Lactoferrin (LF) has a lot of biological functions. It is able to transport iron, acts antimicrobial, antibacterial, antiparasitic, antiviral and anticancerogenic and influences the proliferation, differentiation and migration of cells [ADLEROVA et al., 2008]. The elucidation of these effects represented the goal of many different work groups for decades.

This master's thesis revealed differences in p38, ERK and Smad2 activation (western blot), as well as differences in the expression of extracellular matrix (ECM) remodeling proteins (rtPCR) and cell proliferation (MMT-test and cell count) induced by recombinant human LF (rhLF, from transgenic rice) compared to the effects induced by bovine LF (bLF) in Caco-2 cells and THP-1 monocytes.

Differentiated as well as undifferentiated Caco-2 cells showed no significant increase in the activity of p38, ERK1/2 and Smad2 or the expression of PAI-1, MMP-1, -2, -3 and -9 after short or long-term incubation (1h, 4h) and low or high concentrations (0.5 – 500µg/ml) of rhLF. In contrast, bLF was found to induce a significant two-fold increase of Smad2 phosphorylation in undiff. Caco-2 cells.

THP-1 incubation with rhLf resulted in p38 activation but failed to induce ERK1/2 or Smad2 activation. The expression of uPA, MMP-2, LRP-1, a2M and PAI-1 was unaffected, while the expression level of MMP-1, MMP-9 and ICAM-1 were increased in response to rhLF. In addition to the activation of p38, bLF induced a dramatic increase of Smad2 phosphorylation (26.5-fold after 1h using 50µg/ml bLF, $p < 0.001$). The expression of PAI-1 was enhanced to 18.6-fold ($p < 0.001$), indicating a positive relationship between p-Smad2 and PAI-1. bLF also increased MMP-1, -9 and ICAM-1 expression to a greater extent compared to rhLF. The THP-1 proliferation rate was not increased by rhLF and inhibited 45% by bLF after 3 days with 500µg/ml ($p < 0,001$).

The different effects of rhLF or bLF should help to choose the appropriate LF-species as immunoprotective additive to formula milk or as cancer therapeutic.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ADLEROVA L., BARTOSKOVA A. und FALDYNA M. (2008): Lactoferrin: a review. *Veterinari Medicina*: 53, 457-468.

AFRAKHTE M., MOREN A., JOSSAN S., ITOH S., SAMPATH K., WESTERMARK B., HELDIN C. H., HELDIN N. E. und TEN DIJKE P. (1998): Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun*: 249, 505-511.

ALBELDA S. M., SMITH C. W. und WARD P. A. (1994): Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J*: 8, 504-512.

ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. und WALTER P. (2005): *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 3. überarbeitete Auflage. Wiley Verlag GmbH & Co. Weinheim.

ALESSI M. C., JUHAN-VAGUE I., KOOISTRA T., DECLERCK P. J. und COLLEN D. (1988): Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. *Thromb Haemost*: 60, 491-494.

ARNOLD R. R., COLE M. F. und GHEE J. R. (1977): A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*: 197, 263-265.

ASHIDA K., SASAKI H., SUZUKI Y. A. und LONNERDAL B. (2004): Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*: 17, 311-315.

AUWERX J. (1991): The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*: 47, 22-31.

BAKER E. N. (1994): Structure and reactivity of transferrins. *Adv. Inorg. Chem.*: 41, 389-463.

BAKER E. N. und BAKER H. M. (2009): A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*: 91, 3-10.

BENARD C., CULTRONE A., MICHEL C., ROSALES C., SEGAIN J. P., LAHAYE M., GALMICHE J. P., CHERBUT C. und BLOTTIERE H. M. Degraded carrageenan causing colitis in rats induces TNF secretion and ICAM-1 upregulation in monocytes through NF-kappaB activation. *PLoS One*: 5, e8666.

BENNETT R. M. und KOKOCINSKI T. (1978): Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol*: 39, 509-521.

BERNHARD E. J., HAGNER B., WONG C., LUBENSKI I. und MUSCHEL R. J. (1995): The effect of E1A transfection on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int J Cancer*: 60, 718-724.

BEZAULT J., BHIMANI R., WIPROVNICK J. und FURMANSKI P. (1994): Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res*: 54, 2310-2312.

BINDER B. R. und MIHALY J. (2008): The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. *Immunol Lett*: 118, 116-124.

BINDER B. R., MIHALY J. und PRAGER G. W. (2007): uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost*: 97, 336-342.

BLASI F. und CARMELIET P. (2002): uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 3, 932-943.

BOND M., CHASE A. J., BAKER A. H. und NEWBY A. C. (2001): Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*: 50, 556-565.

BRANCHO D., TANAKA N., JAESCHKE A., VENTURA J. J., KELKAR N., TANAKA Y., KYUUMA M., TAKESHITA T., FLAVELL R. A. und DAVIS R. J. (2003): Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*: 17, 1969-1978.

-
- BRANDL N., ZEMANN A., KAUPE I., MARLOVITS S., HUETTINGER P., GOLDENBERG H. und HUETTINGER M. (2010): Signal transduction and metabolism in chondrocytes is modulated by lactoferrin. *Osteoarthritis Cartilage*: 18, 117-125.
- BREW K., DINAKARPANDIAN D. und NAGASE H. (2000): Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*: 1477, 267-283.
- BROCK J. (1995): Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol Today*: 16, 417-419.
- BROWN J. D., DICHIARA M. R., ANDERSON K. R., GIMBRONE M. A., JR. und TOPPER J. N. (1999): 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. *J Biol Chem*: 274, 8797-8805.
- BROXMEYER H. E., SMITHYMAN A., EGER R. R., MEYERS P. A. und DE SOUSA M. (1978): Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. *J Exp Med*: 148, 1052-1067.
- BUCCIGROSSI V., DE MARCO G., BRUZZESE E., OMBRATO L., BRACALE I., POLITO G. and GUARINO A. (2007): Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatr Res*: 61, 410-414.
- CAMPBELL S. L., KHOSRAVI-FAR R., ROSSMAN K. L., CLARK G. J. und DER C. J. (1998): Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*: 17, 1395-1413.
- CARROLL V. A. und BINDER B. R. (1999): The role of the plasminogen activation system in cancer. *Semin Thromb Hemost*: 25, 183-197.
- CHEN X., RUBOCK M. J. und WHITMAN M. (1996): A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature*: 383, 691-696.
- CHEN Z., GIBSON T. B., ROBINSON F., SILVESTRO L., PEARSON G., XU B., WRIGHT A., VANDERBILT C. und COBB M. H. (2001): MAP kinases. *Chem Rev*: 101, 2449-2476.

CHEN Z., GIBSON T. B., ROBINSON F., SILVESTRO L., PEARSON G., XU B., WRIGHT A., VANDERBILT C. und COBB M. H. (2001): MAP kinases. *Chem Rev*: 101, 2449-2476.

CHMIELEWSKA J., RANBY M. und WIMAN B. (1983): Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res*: 31, 427-436.

COBB M. H. und GOLDSMITH E. J. (1995): How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*: 270, 14843-14846.

COBB M. H., BOULTON T. G. und ROBBINS D. J. (1991): Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul*: 2, 965-978.

COKER M. L., THOMAS C. V., CLAIR M. J., HENDRICK J. W., KROMBACH R. S., GALIS Z. S. und SPINALE F. G. (1998): Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. *Am J Physiol*: 274, H1516-1523.

DAMIENS E., EL YAZIDI I., MAZURIER J., ELASS-ROCHARD E., DUTHILLE I., SPIK G. und BOILLY-MARER Y. (1998a): Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur J Cell Biol*: 77, 344-351.

DAMIENS E., MAZURIER J., EL YAZIDI I., MASSON M., DUTHILLE I., SPIK G. und BOILLY-MARER Y. (1998b): Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. *Biochim Biophys Acta*: 1402, 277-287.

DAN I., WATANABE N. M. und KUSUMI A. (2001): The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*: 11, 220-230.

DERIY L. V., CHOR J. und THOMAS L. L. (2000): Surface expression of lactoferrin by resting neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*: 275, 241-246.

DIACOVO T. G., ROTH S. J., BUCCOLA J. M., BAINTON D. F. und SPRINGER T. A. (1996): Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*: 88, 146-157.

DIAMOND M. S., STAUNTON D. E., DE FOUGEROLLES A. R., STACKER S. A., GARCIA-AGUILAR J., HIBBS M. L. und SPRINGER T. A. (1990): ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*: 111, 3129-3139.

DIEKMANN O. und TSCHESCHE H. (1994): Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9. *Braz J Med Biol Res*: 27, 1865-1876.

EGEBLAD M. und WERB Z. (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*: 2, 161-174.

EMEIS J. J. und KOOISTRA T. (1986): Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med*: 163, 1260-1266.

EMONARD H., BELLON G., DE DIESBACH P., METTLEN M., HORNEBECK W. und COURTOY P. J. (2005): Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend". *Biochimie*: 87, 369-376.

ENSLEN H., BRANCHO D. M. und DAVIS R. J. (2000): Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J*: 19, 1301-1311.

FARNAUD S. und EVANS R. W. (2003): Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*: 40, 395-405.

FARNAUD S. und EVANS R. W. (2003): Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunologie*: 40, 395-405.

FINI M. E., BARTLETT J. D., MATSUBARA M., RINEHART W. B., MODY M. K., GIRARD M. T. und RAINVILLE M. (1994): The rabbit gene for 92-kDa matrix metalloproteinase. Role of AP1 and AP2 in cell type-specific transcription. *J Biol Chem*: 269, 28620-28628.

FOWLKES J. L., ENGHILD J. J., SUZUKI K. und NAGASE H. (1994): Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem*: 269, 25742-25746.

FREIBURGHHAUS C., JANICKE B., LINDMARK-MANSSON H., OREDSSON S. M. und PAULSSON M. A. (2009): Lactoferricin treatment decreases the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line. *J Dairy Sci*: 92, 2477-2484.

FRESHNEY N. W., RAWLINSON L., GUESDON F., JONES E., COWLEY S., HSUAN J. und SAKLATVALA J. (1994): Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*: 78, 1039-1049.

FUJIYAMA K., SAKAI Y., MISAKI R., YANAGIHARA I., HONDA T., ANZAI H. and SEKI T. (2004): N-linked glycan structures of human lactoferrin produced by transgenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem*: 68, 2565-2570.

FURIE M. B. und MCHUGH D. D. (1989): Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*: 143, 3309-3317.

GEYER M. und WITTINGHOFER A. (1997): GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*: 7, 786-792.

GHOSH S., MAY M. J. und KOPP E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*: 16, 225-260.

GONZALEZ-CHAVEZ S. A., AREVALO-GALLEGOS S. und RASCON-CRUZ Q. (2009): Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*: 33, 301 e301-308.

GOPALAN P. K., BURNS A. R., SIMON S. I., SPARKS S., MCINTIRE L. V. und SMITH C. W. (2000): Preferential sites for stationary adhesion of neutrophils to cytokine-stimulated HUVEC under flow conditions. *J Leukoc Biol*: 68, 47-57.

GREY A., BANOVIC T., ZHU Q., WATSON M., CALLON K., PALMANO K., ROSS J., NAOT D., REID I. R. und CORNISH J. (2004): The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol*: 18, 2268-2278.

GROVES M. L. (1960): The isolation of a red protein from milk. *J Amer Chem Soc*: 82, 3345-3350.

HAGIWARA T., SHINODA I., FUKUWATARI Y. und SHIMAMURA S. (1995): Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem*: 59, 1875-1881.

HAHN-DANTONA E., RUIZ J. F., BORNSTEIN P. und STRICKLAND D. K. (2001): The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem*: 276, 15498-15503.

HALLBERG B., RAYTER S. I. und DOWNWARD J. (1994): Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem*: 269, 3913-3916.

HARIDAS M., ANDERSON B. F. und BAKER E. N. (1995): Structure of human diferric lactoferrin refined at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*: 51, 629-646.

HAVERSEN L., OHLSSON B. G., HAHN-ZORIC M., HANSON L. A. und MATTSBY-BALTZER I. (2002): Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*: 220, 83-95.

HAYDEN M. S. und GHOSH S. (2004): Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*: 18, 2195-2224.

HAZZALIN C. A. und MAHADEVAN L. C. (2002): MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*: 3, 30-40.

HERZ J. und STRICKLAND D. K. (2001): LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*: 108, 779-784.

HERZ J., CLOUTHIER D. E. und HAMMER R. E. (1992): LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*: 71, 411-421.

HILL C. S. (1999): The Smads. *Int J Biochem Cell Biol*: 31, 1249-1254.

HOUGHTON M. R., GRACEY M., BURKE V., BOTTRELL C. und SPARGO R. M. (1985): Breast milk lactoferrin levels in relation to maternal nutritional status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*: 4, 230-233.

HOWELL M., ITOH F., PIERREUX C. E., VALGEIRSDOTTIR S., ITOH S., TEN DIJKE P. und HILL C. S. (1999): Xenopus Smad4beta is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes. *Dev Biol*: 214, 354-369.

HUANG N., BETHELL D., CARD C., CORNISH J., MARCHBANK T., WYATT D., MABERY K. und PLAYFORD R. (2008): Bioactive recombinant human lactoferrin, derived from rice, stimulates mammalian cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*: 44, 464-471.

HUTCHENS T. W., HENRY J. F., YIP T. T., HACHEY D. L., SCHANLER R. J., MOTIL K. J. and GARZA C. (1991): Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr Res*: 29, 243-250.

JAVELAUD D. und MAUVIEL A. (2005): Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*: 24, 5742-5750.

JEFFREY J. J. (1998): Intestinal collagenases. San Diego` Academic Press: 15-42.

JOHNSEN M., LUND L. R., ROMER J., ALMHOLT K. und DANO K. (1998): Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*: 10, 667-671.

JOLLES J., MAZURIER J., BOUTIGUE M. H., SPIK G., MONTREUIL J. und JOLLES P. (1976): The N-terminal sequence of human lactotransferrin: its close homology with the amino-terminal regions of other transferrins. *FEBS Lett*: 69, 27-31.

JONES D. A., ABBASSI O., MCINTIRE L. V., MCEVER R. P. und SMITH C. W. (1993): P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J*: 65, 1560-1569.

KANCHA R. K., STEARNS M. E. und HUSSAIN M. M. (1994): Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. *Oncol Res*: 6, 365-372.

KANSAS G. S. (1996): Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*: 88, 3259-3287.

KOHNO M. und POUYSSEGUR J. (2003): Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res*: 5, 219-224.

KOLCH W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*: 351 Pt 2, 289-305.

KRETZSCHMAR M., DOODY J., TIMOKHINA I. und MASSAGUE J. (1999): A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev*: 13, 804-816.

KRIDEL S. J., CHEN E., KOTRA L. P., HOWARD E. W., MOBASHERY S. und SMITH J. W. (2001): Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem*: 276, 20572-20578.

KUHARA T., IIGO M., ITOH T., USHIDA Y., SEKINE K., TERADA N., OKAMURA H. und TSUDA H. (2000): Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr Cancer*: 38, 192-199.

KUWATA H., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S., USHIDA Y., SHIMOKAWA Y., TOIDA T. und HAYASAWA H. (2001): Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J Nutr*: 131, 2121-2127.

KYRIAKIS J. M. und AVRUCH J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*: 81, 807-869.

LAWRENCE M. B. und SPRINGER T. A. (1993): Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*: 151, 6338-6346.

LEGRAND D., ELASS E., CARPENTIER M. und MAZURIER J. (2005): Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*: 62, 2549-2559.

LEGRAND D., VAN BERKEL P. H., SALMON V., VAN VEEN H. A., SLOMIANNY M. C., NUIJENS J. H. und SPIK G. (1997): 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*: 327 (Pt 3), 841-846.

LEGRAND D., VIGIE K., SAID E. A., ELASS E., MASSON M., SLOMIANNY M. C., CARPENTIER M., BRIAND J. P., MAZURIER J. und HOVANESSIAN A. G. (2004): Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem*: 271, 303-317.

LESUEUR J. A. und GRAFF J. M. (1999): Spemann organizer activity of Smad10. *Development*: 126, 137-146.

LEVAY P. F. und VILJOEN M. (1995): Lactoferrin: a general review. *Haematologica*: 80, 252-267.

-
- LEVEUGLE B., MAZURIER J., LEGRAND D., MAZURIER C., MONTREUIL J. und SPIK G. (1993): Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur J Biochem*: 213, 1205-1211.
- LI Q. und VERMA I. M. (2002): NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*: 2, 725-734.
- LONNERDAL B. (2002): Expression of human milk proteins in plants. *J Am Coll Nutr*: 21, 218S-221S.
- LONNERDAL B. (2004): Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol*: 554, 11-25.
- MAAKS S., YAN H. Z. und WOOD W. G. (1989): Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in pediatric medicine. *J. Biolumines. Chemilumines*: 3, 221-226.
- MANN D. M., ROMM E. und MIGLIORINI M. (1994): Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J Biol Chem*: 269, 23661-23667.
- MANTHEY C. L., WANG S. W., KINNEY S. D. und YAO Z. (1998): SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes. *J Leukoc Biol*: 64, 409-417.
- MARLIN S. D. und SPRINGER T. A. (1987): Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*: 51, 813-819.
- MASSAGUE J. (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*: 6, 597-641.
- MASSAGUE J. (2000): How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 1, 169-178.

MASSAGUE J. und CHEN Y. G. (2000): Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*: 14, 627-644.

MASSON P. L., HEREMANS J. F. und SCHONNE E. (1969): Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med*: 130, 643-658.

MAZURIER J., LEGRAND D., HU W. L., MONTREUIL J. und SPIK G. (1989): Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antiligand-affinity chromatography. *Eur J Biochem*: 179, 481-487.

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

MIYAMORI H., TAKINO T., SEIKI M. und SATO H. (2000): Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun*: 267, 796-800.

MONTREUIL J., TONNELAT J. und MULLET S. (1960): [Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk]. *Biochim Biophys Acta*: 45, 413-421.

MOORE S. A., ANDERSON B. F., GROOM C. R., HARIDAS M. und BAKER E. N. (1997): Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*: 274, 222-236.

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

NAGAOKA I. und HIROTA S. (2000): Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. *Inflamm Res*: 49, 55-62.

NANDI S., SUZUKI Y. A., HUANG J., YALDA D., PHAM P., WU L., BARTLEY G., HUANG N. und LÖNNERDAL B. (2002): Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science*: 163, 713- 722.

NEW L. und HAN J. (1998): The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med*: 8, 220-228.

NYKJAER A., PETERSEN C. M., MOLLER B., JENSEN P. H., MOESTRUP S. K., HOLTET T. L., ETZERODT M., THOGERSEN H. C., MUNCH M., ANDREASEN P. A. et al. (1992): Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J Biol Chem*: 267, 14543-14546.

OH S. M., HAHM D. H., KIM I. H. und CHOI S. Y. (2001): Human neutrophil lactoferrin trans-activates the matrix metalloproteinase 1 gene through stress-activated MAPK signaling modules. *J Biol Chem*: 276, 42575-42579.

OH S. M., PYO C. W., KIM Y. und CHOI S. Y. (2004): Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade. *Oncogene*: 23, 8282-8291.

ONO K. und HAN J. (2000): The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*: 12, 1-13.

PEARSON G., ROBINSON F., BEERS GIBSON T., XU B. E., KARANDIKAR M., BERMAN K. und COBB M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*: 22, 153-183.

PETRI B. und BIXEL M. G. (2006): Molecular events during leukocyte diapedesis. *Febs J*: 273, 4399-4407.

PINTO M., RUBINE-LEON S., APPAY M. D., KEDINGER M., TRIADOU N., DUSSAULX E., LACROIX B., SIMON-ASSMANN P., HAFFEN K., FOGH J. und ZWEIBAUM A. (1983): Enterocyte-like differentiation and polarisation of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*: 47, 323-330.

RAHMAN A. und FAZAL F. (2009): Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal*: 11, 823-839.

RICCIO A., LUND L. R., SARTORIO R., LANIA A., ANDREASEN P. A., DANO K. und BLASI F. (1988): The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene. *Nucleic Acids Res*: 16, 2805-2824.

ROBERTS A. B. und SPORN M. B. (1993): Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*: 8, 1-9.

ROUSE J., COHEN P., TRIGON S., MORANGE M., ALONSO-LLAMAZARES A., ZAMANILLO D., HUNT T. und NEBREDA A. R. (1994): A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*: 78, 1027-1037.

ROUX P. P. und BLENIS J. (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*: 68, 320-344.

RUTSCHOW S., LI J., SCHULTHEISS H. P. und PAUSCHINGER M. (2006): Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res*: 69, 646-656.

SATO H. und SEIKI M. (1993): Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*: 8, 395-405.

SHARMA G. D., HE J. und BAZAN H. E. (2003): p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem*: 278, 21989-21997.

SHI Y., WANG Y. F., JAYARAMAN L., YANG H., MASSAGUE J. und PAVLETICH N. P. (1998): Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*: 94, 585-594.

-
- SIDENIUS N. und BLASI F. (2003): The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev*: 22, 205-222.
- SIMON S. I. und GOLDSMITH H. L. (2002): Leukocyte adhesion dynamics in shear flow. *Ann Biomed Eng*: 30, 315-332.
- SMEAL T., HIBI M. und KARIN M. (1994): Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *Embo J*: 13, 6006-6010.
- SORENSEN M. und SORENSEN S. P. L. (1939): The protein in whey. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*: 23, 55-99.
- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H. und Vliegenthart J. F. (1982): Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur J Biochem*: 121, 413-419.
- SPRINGER T. A. (1990): The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: the cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Annu Rev Cell Biol*: 6, 359-402.
- STAUNTON D. E., MARLIN S. D., STRATOWA C., DUSTIN M. L. und SPRINGER T. A. (1988): Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*: 52, 925-933.
- STERNLICHT M. D. und WERB Z. (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*: 17, 463-516.
- SUGDEN P. H. und CLERK A. (1997): Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*: 9, 337-351.
- SUZUKI Y. A. und LONNERDAL B. (2002): Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol*: 80, 75-80.

TAKAKURA N., WAKABAYASHI H., YAMAUCHI K. und TAKASE M. (2006): Influences of orally administered lactoferrin on IFN-gamma and IL-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph-node cells. *Biochem Cell Biol*: 84, 363-368.

TAO Z. Y., CAVASIN M. A., YANG F., LIU Y. H. und YANG X. P. (2004): Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci*: 74, 1561-1572.

TEN DIJKE P., GOUMANS M. J., ITOH F. und ITOH S. (2002): Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol*: 191, 1-16.

TERAGUCHI S., WAKABAYASHI H., KUWATA H., YAMAUCHI K. und TAMURA Y. (2004): Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals*: 17, 231-234.

THOMAS C. V., COKER M. L., ZELLNER J. L., HANDY J. R., CRUMBLEY A. J., 3RD und SPINALE F. G. (1998): Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*: 97, 1708-1715.

TOMITA M., WAKABAYASHI H., SHIN K., YAMAUCHI K., YAESHIMA T. und IWATSUKI K. (2009): Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*: 91, 52-57.

TSUKAZAKI T., CHIANG T. A., DAVISON A. F., ATTISANO L. und WRANA J. L. (1998): SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*: 95, 779-791.

USHIDA Y., SEKINE K., KUHARA T., TAKASUKA N., IIGO M., MAEDA M. und TSUDA H. (1999): Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn J Cancer Res*: 90, 262-267.

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

VARADHACHARY A., WOLF J. S., PETRAK K., O'MALLEY B. W., JR., SPADARO M., CURCIO C., FORNI G. und PERICLE F. (2004): Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer*: 111, 398-403.

VINCENTI M. P., COON C. I. und BRINCKERHOFF C. E. (1998): Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*: 41, 1987-1994.

WAKABAYASHI H., KUWATA H., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S. und TAMURA Y. (2004): No detectable transfer of dietary lactoferrin or its functional fragments to portal blood in healthy adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*: 68, 853-860.

WAKABAYASHI H., TAKAKURA N., YAMAUCHI K. und TAMURA Y. (2006): Modulation of immunity-related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol*: 13, 239-245.

WAKABAYASHI H., YAMAUCHI K. und TAKASE M. (2006): Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.*: 16, 1241-1251.

WANG W. P., IIGO M., SATO J., SEKINE K., ADACHI I. und TSUDA H. (2000): Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn J Cancer Res*: 91, 1022-1027.

WARD P. P., PAZ E. und CONNEELY O. M. (2005): Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci*: 62, 2540-2548.

WEST M. D., SHAY J. W., WRIGHT W. E. und LINSKENS M. H. (1996): Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Exp Gerontol*: 31, 175-193.

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

WOESSNER J. F. (1998): *The matrix metalloproteinases family*. San Diego` Academic Press: 1-14.

WOESSNER J. F. und NAGASE H. (2000): *Introduction to the matrix metalloproteinases (MMPs.)*. New York`Oxford Univeristy Press: 1-10.

WOLF J. S., LI D., TAYLOR R. J. und O'MALLEY B. W., JR. (2003): Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*: 65, 245-249.

WOOD K. W., SARNECKI C., ROBERTS T. M. und BLENIS J. (1992): ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*: 68, 1041-1050.

WRANA J. L. und ATTISANO L. (2000): The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev*: 11, 5-13.

XIAO Y. Q., MALCOLM K., WORTHEN G. S., GARDAI S., SCHIEMANN W. P., FADOK V. A., BRATTON D. L. und HENSON P. M. (2002): Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*: 277, 14884-14893.

YAGI K., GOTO D., HAMAMOTO T., TAKENOSHITA S., KATO M. und MIYAZONO K. (1999): Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem*: 274, 703-709.

YANAIHARA A., TOMA Y., SAITO H. und YANAIHARA T. (2000): Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells. *Mol Hum Reprod*: 6, 469-473.

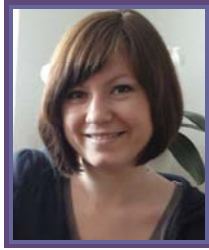
YANG L., FROIO R. M., SCIUTO T. E., DVORAK A. M., ALON R. und LUSCINSKAS F. W. (2005): ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*: 106, 584-592.

YANHONG Z., ZHAOYANG Z. und WENLING Z. (2008): Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor deficient expression in human nasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int. J. Cancer*: 123, 2065-2072.

ZEMANN N., KLEIN P., WETZEL E., HUETTINGER F. und HUETTINGER M. (2010): Lactoferrin induces Growth Arrest and Nuclear Accumulation of Smad-2 in Hela Cells. *Biochimie*: 7, 880-84.

ZHANG Y. und DERYNCK R. (1999): Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol*: 9, 274-279.

ZIERE G. J., KRUIJT J. K., BIJSTERBOSCH M. K. und VAN BERKEL T. J. (1996): Recognition of lactoferrin and aminopeptidase M-modified lactoferrin by the liver: involvement of proteoglycans and the remnant receptor. *Biochem J*: 313 (Pt 1), 289-295.



KARIN HOJDAR

CV

Geboren am 08.08.1982 in Ried im Innkreis (OÖ)

AUSBILDUNG

- 2010- jetzt Master- Arbeit „Rekombinantes humanes Laktoferrin“
(Institut für Pathobiochemie und Genetik der MedUni Wien)
- 2009- jetzt Master- Studium: Molekulare Ernährung
(Uni Wien)
- 2009 Bakkalaureatsarbeit „Scharfstoffe“
(Institut für Ernährungswissenschaften der Uni Wien)
- 2006- 2009 Bakkalaureat Ernährungswissenschaften
(Uni Wien)
- 2005- 2006 Chemie- Studium: Wirtschaftsingenieurwesen-Technische Chemie
(JKU, Linz)
- 2001- 2005 Chemielaborantin im Syntheselabor
(Nycomed Austria, Linz)
- 1999- 2002 Berufsreifepfprüfung: Wirtschafts- und Medieninformatik
(Abendschule, BFI, Linz)
- 1997- 2001 Lehre als Chemielaborantin
(Institut für organische Chemie, JKU, Linz)

NEBENJOB

Pipettenkalibrierung: 1,5 Jahre bei Sartorius Mechatronics
Verkauf: Humanik, Benetton, 1 Jahr bei FOX Jeansmoden

PRAKTIKA

DSM, Nycomed, AGES, Institut für Ernährungswissenschaften

TUTORIUM

Ernährung II Übungen: Mikronährstoffe; Block 9: ELISA (MUW)

ZUSATZ- QUALIFIKATION

Computer: Microsoft Office, Adobe Photoshop

Führerschein: A+B