



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells
upon differentiation and its impact on lectin targeting

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

| | |
|--|-------------------------------------|
| Verfasserin / Verfasser: | Engleder Elisabeth Teresa |
| Matrikel-Nummer: | 0203877 |
| Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): | Pharmazie |
| Betreuerin / Betreuer: | Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr. Michael Wirth |

Wien, am 01.12.2008

*„Was die Tugend eines Menschen vermag,
soll man nicht an seinen außergewöhnlichen Anstrengungen,
sondern an seinem gewöhnlichen Leben messen.“*

(Blaise Pascal)

**Mein herzliches Dankeschön möchte ich allen, die mich während meiner
Studienzeit unterstützt haben, ausdrücken.**

Besonders bedanken möchte ich mich bei

Herrn Ao.Univ.Prof.Mag.Dr.Michael Wirth und Herrn
Univ.Prof.Mag.Dr.Franz Gabor für die Ermöglichung einer interessanten Diplomarbeit
und für die fürsorgliche und ausgezeichnete Betreuung.

Mag. Verena Plattner für die liebevolle, geduldige Unterstützung bei Problemstellungen
im experimentellen Bereich sowie auch bei der Realisierung der Diplomarbeit.

der gesamten Arbeitsgruppe für das sehr angenehme Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. Problemstellung..... | 1 |
| 2. Ergebnisse und Diskussion..... | 4 |
| 3. Anhang A: Abbildungsverzeichnis..... | 12 |
| 4. Anhang B: Publikation..... | 16 |

PUBLIKATION

„Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin targeting“

Plattner V.E., Engleder E.T., Gabor F., Wirth M.

| | |
|-------------------------------|----|
| 5. Abstract..... | 19 |
| 6. Introduction..... | 20 |
| 7. Materials and Methods..... | 22 |
| 8. Results..... | 26 |
| 9. Discussion..... | 29 |
| 10. Figures and Tables..... | 32 |
| 11. References..... | 37 |
| 12. Lebenslauf..... | 40 |

PROBLEMSTELLUNG

Monozyten und Makrophagen sind im Immunsystem von wesentlicher Bedeutung, da sie für unterschiedliche Prozesse, wie der Abwehr von mikrobiellem Befall, Immunität gegen Fremdsubstanzen, Wundheilung, Induktion von Entzündungen und Angiogenese verantwortlich sind. Ihre Bildung beginnt im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und führt über mehrere Differenzierungsschritte zur Ausbildung von Monozyten, die anschließend über die Blutbahn im Organismus verteilt werden. Treten Monozyten mit Krankheitserregern in Kontakt, wandern sie in das entzündete Gewebe ein und können dort durch Zytokine bzw. andere inflammatorische Stimuli zu Makrophagen, den sogenannten Fresszellen, differenzieren.

Wie alle eukaryotischen Zellen, weisen auch Monozyten an der Außenseite der Zellmembran einen Kohlenhydratsaum, die sogenannte Glykokalyx, auf [1, 2]. Dieser Zellmantel hat einen Durchmesser von rund hundert Nanometern und ist auch von funktionaler Bedeutung, weil Zuckerstrukturen in der primären Immunantwort eine wichtige Rolle spielen [3]. Weitere Aufgaben dieser zuckerreichen Schicht bestehen in Zell–Zell und Zell–Matrix Interaktionen. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Glykokalyx während der Adhäsion moduliert wird [5, 6] und manche Elemente der Zuckerschicht die endozytotische Aktivität von Monozyten beeinflussen [4]. Weiters wird bei der Anheftung von peripheren Blut-Monozyten an endotheliale Zellen, die Differenzierung von Monozyten zu Phagozyten (Makrophagen) initiiert [7], wodurch ebenfalls eine Umgestaltung der Zuckerstruktur an der Zelloberfläche wahrscheinlich ist.

Um die Glykosylierung der Zelloberfläche von Monozyten zu untersuchen und damit die Zusammensetzung der Glykokalyx näher zu charakterisieren, sollte eine humane monozytische Zelllinie eingesetzt werden. THP-1 Zellen (humane promonozytische Zellen) wurden von Tsuchiya et al. etabliert und weisen einen beständigen monozytischen Charakter auf [8]. Die weitere Differenzierung von Monozyten kann durch Zusatz verschiedener Substanzen wie DMSO, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3), Retinsäure oder Zytokine induziert werden [9-11]. In der vorliegenden Diplomarbeit wurde PMA als Stimulans für die Differenzierung zu einem Makrophagen-ähnlichen Zelltypus verwendet [14]. Verglichen mit primären humanen Monozyten besitzen THP-1 Zellen den Vorteil, dass sie als Zelllinie hinsichtlich Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutliche Vorteile aufweisen.

Ein Oberflächenrezeptor, der nachweislich auf Monozyten und vermehrt auf Makrophagen exprimiert wird, ist der CD14 Rezeptor, der deshalb auch als Marker für die Differenzierung dienen sollte. Der CD14 Rezeptor ist ein Oberflächenprotein, das mit Lipopolysacchariden interagiert und folglich für die Ausschüttung von Interleukinen und TNF- α verantwortlich ist. Da bei längerer Inkubationszeit mit PMA von einer vermehrten Expression des CD14 Rezeptors ausgegangen werden kann, sollte ein Antikörper, der spezifisch an diesen Rezeptor bindet, eingesetzt werden, um den Differenzierungsgrad der THP-1 Zellen zu bestimmen.

Die Charakterisierung der Glykokalyx von THP-1 Zellen sowie der bereits oben angesprochenen Unterschiede zwischen der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe pflanzlicher, fluoreszenzmarkierter Lektine erfolgen. Lektine sind Proteine mit zumindest einer nicht-katalytischen Domäne, die spezifisch an Mono- oder Oligosaccharide binden. Durch diese spezifische Bindung der Lektine kann das Vorhandensein diverser Zuckerstrukturen an die Zelloberfläche nachgewiesen werden: N-Acetyl-D-Glukosamin und Sialinsäure können durch die Bindung des Lektins von *Triticum vulgare* (WGA), beziehungsweise N-Acetyl-D-Glukosamin auch durch das *Solanum tuberosum*

Lektin (STL) und 2,6- verknüpfte Sialinsäure durch das Binden des *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) bestimmt werden. Mannose und Glukose Strukturen werden durch das *Lens culinaris* Agglutinin (LCA) und D-Galaktosamin durch Peanut Agglutinin (PNA) nachgewiesen. Das Vorkommen von N-Acetyl-D-Galaktosamin kann durch die Bindung von *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA) und L-Fukose durch das Lektin von *Ulex europaeus* (UEA) bestätigt werden. Um das Ausmaß an spezifischer Bindung näher charakterisieren zu können, wurden auch kompetitive Tests mit den korrespondierenden Kohlenhydraten durchgeführt.

Da es sich bei Monozyten und Makrophagen um Zellen mit ausgeprägter Phagozytosefähigkeit handelt, wurde in weiterer Folge für ausgewählte Lektine der Internalisierungsprozess näher untersucht. Darüber hinaus sollten die Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen genau analysiert, dokumentiert sowie Vergleiche mit der Literatur gezogen werden. Ausgehend von diesen Untersuchungen sollte auch überlegt werden, inwieweit Lektine für ein Monozyten- bzw. Makrophagen-spezifisches Targeting eingesetzt werden können.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

„Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin targeting”

von Plattner V.E., Engleder E., Gabor F., Wirth M.

(siehe Anhang B) maßgeblich beigetragen werden.

Für ein gezieltes Targeting an Monozyten bzw. Makrophagen mit Hilfe von Lektinen ist der Aufbau der Glykokalyx maßgebend. Da THP-1 Zellen einen beständigen monozytischen Charakter aufweisen und durch Zugabe von PMA zu reifen Zellen mit den Fähigkeiten von Makrophagen differenzieren [8, 14], wurden mit dieser Zelllinie Unterschiede im Aufbau des Zuckermantelsaums deutlich gemacht und weiterführend Internalisierungsprozesse verfolgt. Alle Untersuchungen wurden sowohl mit undifferenzierten als auch mit differenzierten Zellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Unter Verwendung von Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA, 5 ng/ml Medium) wurden die Zellen zur Differenzierung angeregt und für die Ausdifferenzierung unterschiedlich lange (24, 48, 72 Stunden) bei 37°C inkubiert. Bereits nach 24 Stunden zeigten sich morphologische Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen. Während PMA-unbehandelte Zellen in Suspension wachsen, Aggregate bilden und eine kugelhähnliche Form

aufweisen, liegen differenzierte Zellen in adhärenter Form vor, sind länglich und abgeflacht (Anhang A, Abb. 1 + 2). Um die Differenzierung zu verifizieren, wurden die CD14 Rezeptoren an der Zelloberfläche über eine Antigen–Antikörper Reaktion und anschließende flowzytometrische Analyse quantifiziert, da diese Rezeptoren nach Differenzierung zu Makrophagen vermehrt exprimiert werden sollten [10]. Dazu wurde der Fluoreszein-markierte, murine monoklonale Antikörper MY4-FITC eingesetzt. Der in diesen Untersuchungen beobachtete Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 0.53 ± 0.27 bei undifferenzierten Zellen auf 26.0 ± 0.49 bei bis zu 72 Stunden lang mit PMA behandelten Zellen zeigt, dass es nach Zusatz von PMA tatsächlich zu einer vermehrten Expression des CD14 Rezeptors kommt. Somit konnte die Differenzierung auch auf dieser Ebene nachgewiesen werden. (Anhang A, Abb.3) Um eine unspezifische Antikörperbindung ausschließen zu können, wurde ein FITC markierter IgG-Kontrollantikörper eingesetzt, dessen MFI Werte von den jeweiligen Daten subtrahiert wurden. Die MFI-Werte der Kontrolle, die bei beiden Zelllinien um 0.5 MFI lagen, bestätigten die spezifische Bindung des MY4-FITC Antikörpers.

Durch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen kann es zu Veränderungen in der Glykokalyx kommen. Diese Unterschiede im Zuckermantelsaum sollten mittels differenzierter und undifferenzierter THP-1 Zellen näher charakterisiert werden. Um die jeweiligen Kohlenhydrate nachzuweisen, wurden pflanzliche, Fluoreszein-markierte Lektine (F-Lektine) verwendet, die spezifisch an unterschiedliche, ausgewählte Zuckerstrukturen binden. Für die Untersuchungen wurden alle Zellen unter gleichen Bedingungen und mit der gleichen Menge an Lektin ($3.125 - 100$ pmol) inkubiert. Um die Bindungskapazitäten zu vergleichen, wurden die gemessenen MFI Werte auf 1 Mol Fluoreszein pro Mol Lektin bezogen.

Die Ergebnisse zeigen, dass F-WGA sowohl bei undifferenzierten (MFI 17.1 ± 0.2 bei 100 pmol WGA) als auch bei differenzierten Zellen (MFI 16.6 ± 0.4 bei 100 pmol WGA) die höchste

Bindungskapazität aufweist. Davon ausgehend kann man annehmen, dass *N*-Acetyl-*D*-Glukosamin- und Sialinsäure-Strukturen in der Glykokalyx beider Zelltypen in verhältnismäßig großer Anzahl vorkommen. Interessant war auch, dass sich im Ausmaß der Bindung kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) zwischen den beiden Zelltypen feststellen ließ. Mit MFI Werten bis 10.3 ± 0.5 an undifferenzierten und 5.7 ± 0.2 an differenzierten Zellen wies F-STL, das ebenso spezifisch mit *N*-Acetyl-*D*-Glukosamin-Strukturen interagiert, die zweithöchste Bindungskapazität auf. Vergleicht man die MFI Werte untereinander, so lässt sich für F-STL bei den differenzierten Zellen eine nur halb so starke Bindung beobachten. Da F-WGA aber an beide Zelltypen gleich stark bindet, könnte dies auf ein vermehrtes Vorhandensein von Sialylgruppen bei den differenzierten Zellen hinweisen, da WGA neben *N*-Acetyl-*D*-Glukosamin auch spezifisch an Sialinsäure bindet. Diese Vermutung ließ sich durch die Ergebnisse der Bindungsstudie mit F-SNA, das spezifisch an 2,6-verknüpfte Sialinsäure bindet, absichern, bei denen für differenzierte Zellen mit einem MFI bis 1.2 ± 0.1 ebenfalls eine deutlich höhere Kapazität festgestellt wurde ($p < 0.01$) als bei undifferenzierten Zellen ($0.3 \pm < 0.1$).

Weiters konnte für differenzierte Zellen in Folge einer Bindung von F-LCA mit MFI Werten bis $2.4 \pm < 0.1$ das Vorhandensein von Mannose-Strukturen festgestellt werden. Keine Bindungskapazität zeigte sich hingegen für F-PNA, das Galaktosamin-Strukturen erkennt. Umgekehrt verhielt es sich bei undifferenzierten Zellen. Hier konnte in der Glykokalyx keine Mannose nachgewiesen werden, Galaktosamin-Strukturen hingegen waren in gewissem Ausmaß vorhanden, was sich durch die Bindung von F-PNA mit MFI-Werten bis 1.0 ± 0.1 belegen ließ. Keine Bindung bei beiden Zelltypen zeigte sich für die Lektine F-UEA-I und F-DBA. Dies deutet darauf hin, dass die Glykokalyx der THP-1 Zellen keine *N*-Acetyl-*D*-Galaktosamin- und *L*-Fukose-Strukturen enthält.

Um die Spezifität der Bindung des Lektins an die jeweilige Zuckerstruktur zu überprüfen, wurde versucht, mittels der korrespondierenden Kohlenhydrate eine kompetitive Hemmung der Bindung zu erzielen. Im Fall einer spezifischen Wechselwirkung sollte durch Erhöhen der Kohlenhydratmenge eine kontinuierliche Abnahme der zellgebundenen Lektinmenge und damit des MFI Wertes zu beobachten sein. Dies basiert darauf, dass das Lektin mit dem zugesetzten, löslichen Kohlenhydrat eine Bindung eingeht und so die an der Glykokalyx quantifizierte Lektinmenge sinkt. Ist die Bindung hingegen unspezifisch, sollte keine Änderung des MFI zu beobachten sein.

Die Inhibitionsstudie erfolgte mit folgenden Zuckern: N,N',N''-Triacetylchitotriose für F-WGA und F-STL, D- Mannose für F-LCA und Sialinsäure wurde für F-SNA verwendet. Um die Inhibition in Prozent zu berechnen, wurde der gemessene MFI Wert der jeweiligen Lektinbindung ohne Zusatz eines Kohlenhydrates gleich 100% gesetzt und die Abnahme der Bindungen auf diesen Wert bezogen. Für F-WGA und F-STL ergab sich dabei für beide Zelllinien eine spezifische Bindung mit einer prozentualen Inhibition von zum Teil über 90%. Im Fall von undifferenzierten Zellen konnte die Spezifität der Bindung von F-PNA mit einer Inhibition von über 90% nach Zusatz von 1 µmol Galaktosamin pro Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Bei differenzierten Zellen wurde eine spezifische Bindung für F-LCA mit Inhibitionswerten bis zu 90% analysiert. Obwohl F-SNA spezifisch mit 2,6-verknüpfte Sialinsäure interagiert, konnte durch Sialinsäure keine kompetitive Inhibition der F-SNA Bindung an THP-1 Zellen beobachtet werden.

Basierend auf der Tatsache, dass F-WGA eine sehr hohe Bindungskapazität für THP-1 Zellen besitzt, wurde in weiterer Folge untersucht, ob oberflächengebundenes F-WGA von den Zellen, die als Monozyten und Makrophagen eine hohe Phagozytosefähigkeit besitzen sollten, auch internalisiert werden kann. Dabei wurde ein Pulse-Chase Inkubationsprotokoll verfolgt, bei dem

F-WGA zunächst bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden wird (Pulse) und die Zellen anschließend – nach Entfernen von ungebundenem Lektin – für unterschiedliche Zeitintervalle (0 – 240 Minuten) bei 37°C inkubiert werden (Chase). Da Zellen nur bei 37°C metabolisch aktiv sind, sollte das während der Pulse-Inkubation an die Oberfläche gebundene Lektin in der Chase-Phase internalisiert werden. Für Vergleichszwecke wurde der Versuch auch bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird der Zellstoffwechsel nahezu vollständig reduziert, sodass hier keine Internalisierung erwartet werden kann. Die Analyse erfolgte mittels Flowzytometer und zeigte bei einer Chase-Inkubationstemperatur von 4°C über einen Zeitraum von 240 Minuten keinerlei Änderung der zellgebundenen Fluoreszenzintensität. Nach gleich langer Inkubation bei 37° konnte hingegen bei beiden Zelltypen eine kontinuierliche Abnahme des MFI Wertes beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass F-WGA in saure Kompartimente der Zelle wie Lysosomen oder späte Endosomen aufgenommen wird. Das als Marker eingesetzte Fluoreszein weist nämlich in saurem Milieu eine deutlich geringere Quantenausbeute auf, wodurch bei Akkumulation von F-WGA in diesen Kompartimente ein Quench des Fluoreszenzsignals erfolgt.

Anschließende Zugabe von Monensin, das als Natrium-Ionophor den intrazellulären pH Gradienten äquilibrieren kann, sollte in einem Anstieg der MFI resultieren, da der saure pH-Wert angehoben wird und somit wieder die ursprüngliche Fluoreszenzintensität messbar sein sollte. Für beide Zelltypen konnte dabei nach Inkubation bei 4°C keine Veränderungen der MFI Werte festgestellt werden. Inkubiert man hingegen bei 37°C konnte bei differenzierten Zellen ein Anstieg der MFI auf die Messwerte der Vergleichsgruppe (4°C) beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass oberflächengebundenes F-WGA tatsächlich in saure Kompartimente aufgenommen wird, wobei nach 10 Minuten bei differenzierten Zellen bereits ein Einbau von 26% ermittelt wurde. Nach 240 Minuten lagen sogar 74% in internalisierter Form vor. Im Gegensatz zu den PMA behandelten Zellen wurden bei undifferenzierten THP-1 Zellen nach Monensinzusatz die MFI- Werte der Vergleichsgruppe (4°C) nicht ganz erreicht. Dies könnte

darauf zurückzuführen sein, dass bei undifferenzierten Zellen ein Teil des oberflächengebundenen Lektins in andere Kompartimente aufgenommen werden oder aber oberflächengebundenen WGA während der Chase-Inkubation von der Zelloberfläche abgelöst wird. Eine endgültige Klärung muss hier nachfolgenden Diplomarbeiten vorbehalten bleiben. Die für undifferenzierte Zellen ermittelte Einbaurrate war mit 15% nach 10 Minuten und 64% nach 240 Minuten jeweils etwas geringer als jene der differenzierten Zellen.

Lektinbindung sowie Internalisation wurden zusätzlich auch mittels Fluoreszenzmikroskopie visuell bestätigt. Um die Interaktion zwischen Lektin und Zelle zu analysieren, wurde F-WGA bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden und die Zellen danach fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung der Internalisation wurden Zellen mit membrangebundenem F-WGA 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Zellen, die nur bei 4°C inkubiert wurden, durch eine diffuse Fluoreszenzverteilung an ihrer Oberfläche gekennzeichnet waren. Erfolgt die Inkubation der Zellen allerdings bei 37°C, so lässt sich vermehrt eine punktförmige Verteilung im Zellinneren nachweisen, die darauf hindeutet, dass F-WGA nach der Aufnahme in intrazellulären Vesikeln akkumuliert. (Anhang A, Abb.4-7)

Die Differenzierung der THP-1 Zellen zu Makrophagen wurde mittels Antigen-Antikörper Reaktion ebenfalls visuell dargestellt. Dazu wurden die Zellen mit dem MY4-FITC Antikörper bei 4°C inkubiert und die Interaktion anschließend im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Bei den differenzierten Zellen war dabei ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erkennen. Diese erhöhte Antikörperbindung deutet auf eine vermehrte Ausbildung von CD14 Rezeptoren hin und beweist damit die erfolgreiche Differenzierung der THP-1 Zellen durch PMA. Im Vergleich dazu wiesen die undifferenzierten Zellen nur eine sehr niedrige, kaum sichtbare Fluoreszenz auf. (Anhang A, Abb. 8+9)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit monozytische THP-1 Zellen durch PMA erfolgreich zu Makrophagen differenziert werden konnten, was sowohl mikroskopisch als auch durch erhöhte CD14 Expression an der Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurde anhand des Lektinbindungsmusters die Glykokalyx der THP-1 Zellen näher charakterisiert. Dabei wurden durch Einsatz verschiedener Lektine mit definierter Zuckerbindungskapazität Unterschiede im Zuckermantelsaum von nicht differenzierten und differenzierten Zellen festgestellt. Zusätzlich konnte auch eine Internalisation von WGA nachgewiesen sowie der vermutliche Aufnahmemechanismus näher bestimmt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen erscheinen THP-1 Zellen als Modell für weiterführende Studien geeignet, die klären sollten, ob und in welchem Ausmaß ein Monozyten- bzw. Makrophagen-spezifisches Targeting mit Hilfe von Lektinen möglich ist.

Anhang A

Abbildungsverzeichnis

THP-1 Zellen

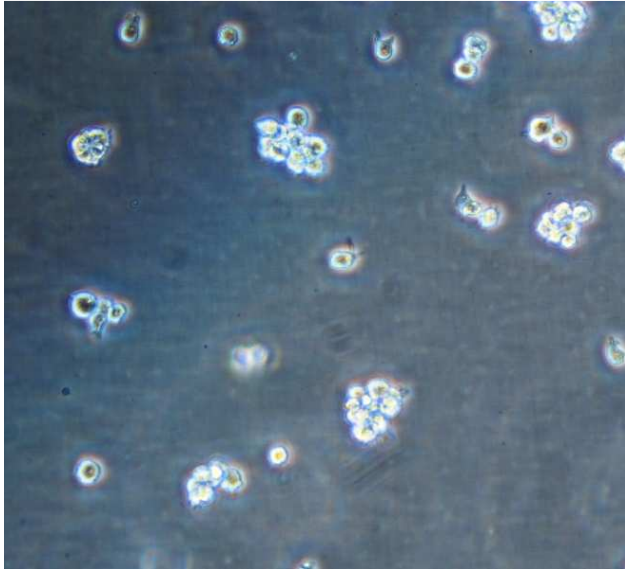


Abb. 1: undifferenzierte Zellen

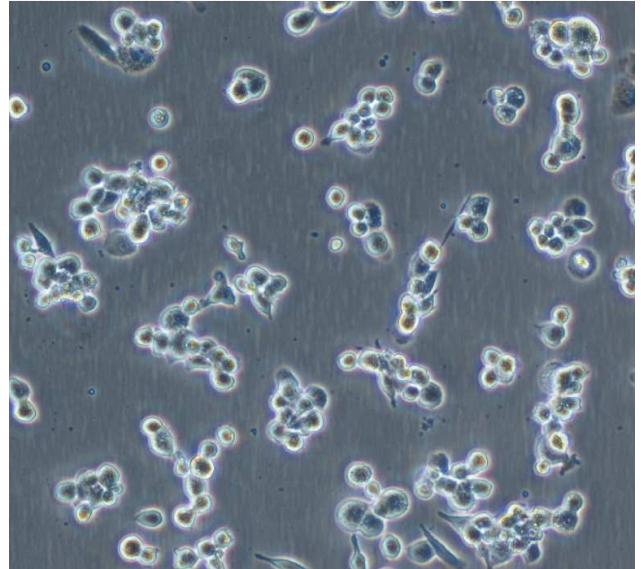


Abb. 2: differenzierte Zellen

CD14 Expression

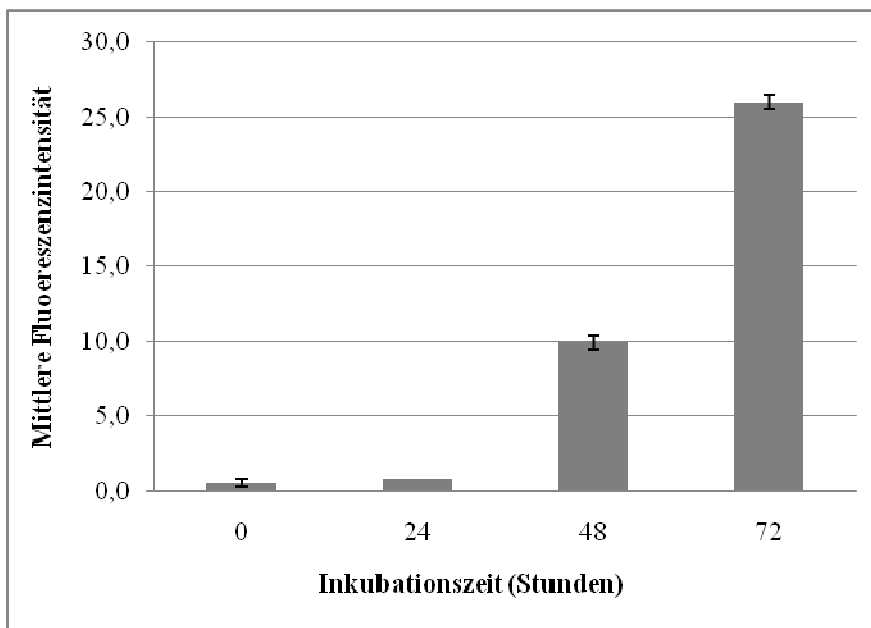


Abb.3: Flowzytometrische Analyse der CD14 Expression

Visualisierung der Lektinbindung an THP-1 Zellen

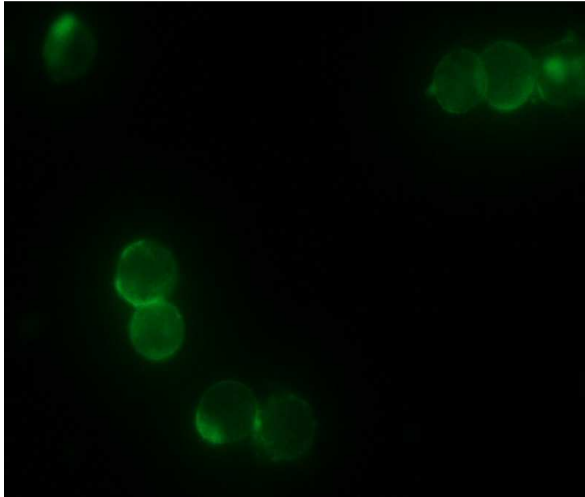


Abb.4: undifferenzierte Zellen, 4°C

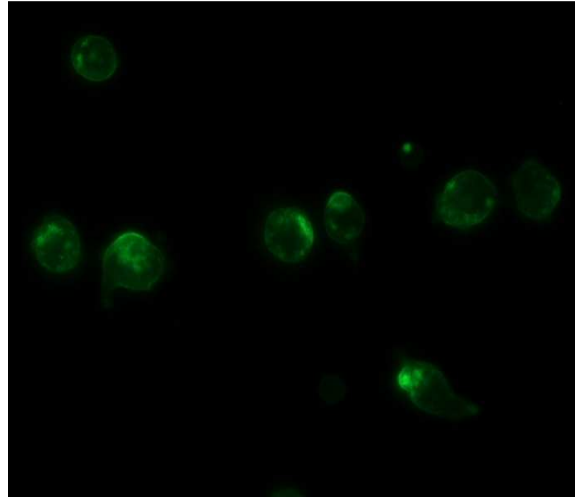


Abb.5: undifferenzierte Zellen, 37°C

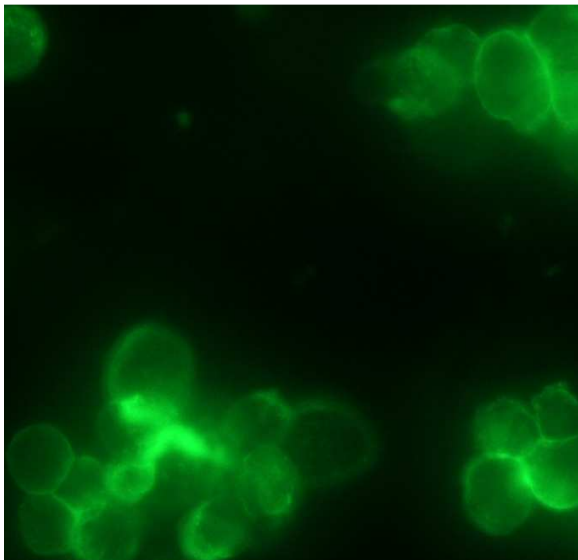


Abb.6: differenzierte Zellen, 4°C

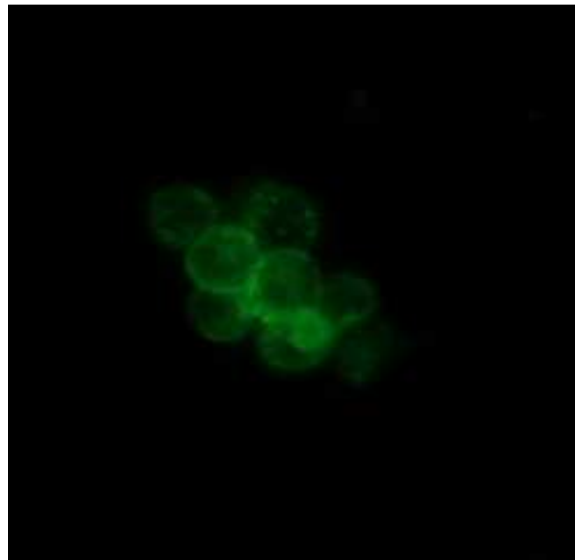


Abb.7: differenzierte Zellen, 37°C

CD14 Visualisierung



Abb.8: undifferenzierte Zellen

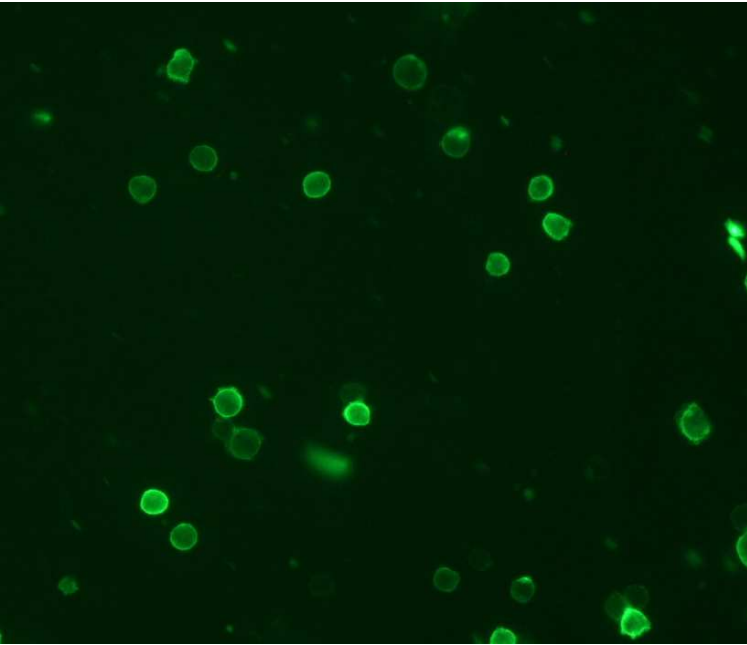


Abb.9: differenzierte Zellen

Anhang B

Publikation

„Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells
upon differentiation and its impact on lectin targeting”

von Plattner V.E., Engleder E.T., Gabor F., Wirth M.

**Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells
upon differentiation and its impact on lectin targeting**

V.E. Plattner ¹, E.T. Engleder ¹, F. Gabor ¹, M. Wirth ^{1,*}

¹ *Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna,
A-1090 Vienna, Austria*

To be submitted to the International Journal of Pharmaceutics

* Corresponding author

Tel.: +43 1 4277 55407; fax: +43 1 4277 9554

E-mail address: michael.wirth@univie.ac.at

Abstract

In the present study human monocytic THP-1 cells were treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in order to obtain macrophage-like cells. Before and after treatment, plant lectins with distinct sugar specificities were applied in order to elucidate the glycosylation pattern of both cell types and to follow changes during differentiation.

As a result of flow cytometric analyses, for untreated as well as for differentiated cells WGA yielded the highest binding without significant changes in the binding capacity. For the other lectins divergent results were obtained which demonstrates a reorganization of sugar residues on the cell surface during differentiation. Interestingly, prior to PMA induction galactosamine-structures were assessed at the cell surface, which were absent after treatment. Vice versa, mannose residues were present only in case of differentiated cells.

Additionally, cytoinvasion as beneficial for targeted drug delivery was studied with WGA, which had displayed a high binding capacity together with a high specificity. For both cell types decreased fluorescence intensity at 37°C as compared to 4°C was observable pointing to internalization and accumulation in acidic compartments.

According to these findings, the application of WGA-grafted drug delivery systems might be an interesting approach, e.g. in treatment of infectious diseases evoked by parasites, facultative intracellular bacteria or viruses such as HIV.

Introduction

Being essential parts of the immune system monocytes and macrophages are involved in defense against microbial infection, initiation of inflammation, immunity to foreign substances, wound healing, and angiogenesis. They originate from the bone marrow and undergo differentiation from hematopoietic stem cells to blood monocytes and finally to tissue-specific macrophages. Like all eukaryotic cells, they are covered by a carbohydrate-rich layer, denominated glycocalyx or pericellular matrix [1, 2]. This cell coat is several tens of nanometers thick and is of functional importance as the first line defense of the innate immune system is based on recognition of carbohydrates [3]. Furthermore, it plays an important role in cell-cell and cell-matrix interactions. At this, there is evidence that glycocalyx elements have influence on the endocytic capacity of monocytes [4] and are modulated during adhesion [5, 6]. As adhesion of peripheral blood monocytes to endothelial cells initiates the differentiation program of monocytes into phagocytes [7], this process may also cause reorganization of sugar residues at the cell surface.

To investigate the glycosylation pattern of monocytes, which undergo differentiation to macrophages, the human monocytic leukemia cell line THP-1 was chosen, which was established by Tsuchiya et al. and exhibits stable monocytic characteristics [8]. Additionally, treatment with various agents such as DMSO, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (VD3), retinoic acid or cytokines results into differentiation along the monocytic lineage [9-11]. In summary, it was shown that macrophage-like cells which mimic native monocyte-derived macrophages in several aspects are obtained with phorbol esters [12], whereas with DMSO or retinoic acid cells exhibit more characteristics of neutrophils [13].

In the present study, differentiation was carried out with PMA following Park et al. [14]. In comparison to primary human monocytes, THP-1 cells are characterized by homogeneity, accessibility and a higher transfection efficiency, which makes them a reliable cell model.

To identify and characterize the glycocalyx elements of both untreated and differentiated THP-1 cells, lectins were used representing carbohydrate binding proteins which recognize distinct sugar structures at the cell surface. In order to cover a broad range of sugar residues at the cell surface several plant lectins with diverse carbohydrate specificities were applied: Wheat germ agglutinin (WGA) and *Solanum tuberosum* lectin (STL) were used to identify *N*-acetyl-D-glucosamine structures and in case of WGA also sialic acid residues. The lectin from *Sambucus nigra* (SNA) specifically recognizes sialic acid (2, 6)Gal/GalNAc sequences, and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) binds to mannose residues. Peanut agglutinin (PNA) was used to detect galactosamine moieties, *Dolichos biflorus* agglutinin for *N*-acetyl-D-galactosamine structures, and *Ulex europaeus* isoagglutinin I (UEA) specifically binds to fucose structures.

Ongoing from this characterization and comparison of the pericellular matrices of both cell types, the internalization of WGA was studied in detail. This lectin had already shown to enhance the phagocytic and bactericidal activity of murine peritoneal macrophages [15], and hence might be a suitable candidate for drug targeting purposes.

Materials and methods

Chemicals

Fluorescein-labeled lectins from *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin (WGA); molar ratio fluorescein/protein (F/P)=2.9), *Solanum tuberosum* (STL; F/P=3.1), *Sambucus nigra* (SNA, F/P=7.2), *Lens culinaris* (LCA; F/P=3.8), *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin (PNA); F/P=5.2), *Dolichos biflorus* (DBA; F/P=2.2) and *Ulex europaeus* (UEA; F/P=2.7) were purchased from Vector laboratories (Burlingame, CA, USA). For the immunofluorescence analysis, FITC-labeled antibodies were obtained from Beckman Coulter (Krefeld, Germany). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) unless other specified.

Cell culture

Human THP-1 monocytic leukemia cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/ml in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated FCS (Biochrom AG, Berlin, Germany), 200 mM L-glutamine and 104 U/ml penicillin, and 104 μ g/ml streptomycin and maintained at $3-8 \times 10^5$ cells/ml in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Differentiation into macrophages was achieved by resuspending the cells at 3×10^5 cells/ml in growth medium with addition of phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA; 8 nM in DMSO) over 48 h. To analyze the surface marker CD14 by immunofluorescence, cells were incubated with PMA also for 24 h and 72 h.

Viability of cells was determined by trypan blue exculsion and counting of viable cells using a Bürker-Türk hemocytometer. Adherence of differentiated cells was examined with the same setup by determining the amount of unattached and adherent cells. Unattached cells were collected by centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4°) of the supernatant, whereas adherent cells were detached with 0.25% EDTA in PBS followed by centrifugation.

Immunofluorescence analysis of surface antigen CD14

Untreated THP-1 cells were harvested by centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4°C) and resuspended in RPMI medium at a concentration of 5×10^6 cells/ml.

Differentiated cells were detached and collected as described above and resuspended at the same concentration as untreated cells.

50 μ l cell suspension (5×10^6 cells/ml) were incubated with 210 μ l of the FITC-labeled antihuman CD14 monoclonal antibody solution (MY4-FITC, diluted 1:20 in PBS with 2% FCS) for 30 min at 4°C. After incubation, cells were spun down (1000 rpm, 5 min, 4°C), and the supernatant was discarded. Then, 100 μ l PBS were added, and this washing step was repeated to remove any unbound antibody. Finally, cells were resuspended in 1 ml particle free PBS, and the mean cell-associated fluorescence intensity (MFI) was determined by flow cytometry (Epics XL-MCL, Coulter, FL, USA).

To detect any non-specific antibody binding, additional cells were treated with an adequate isotypic control (MsIgG2b-FITC) or with PBS before analysis.

Lectin binding capacity

Untreated and differentiated cells were harvested as described above and processed immediately. 50 μ l cell suspension (5×10^6 cells/ml) were incubated with a dilution series of fluorescein-labeled lectins (3.125-100 pmol in PBS, 50 μ l) for 15 min at 4°C. Then, cells were washed and prepared for flow cytometry as previously described. Negative controls containing PBS instead of the lectin solution were included in all experiments and considered for all calculations. As a control to estimate non specific-binding, samples were prepared as above but using a dilution series of fluorescein-labeled bovine serum albumin (BSA, (F/P=10)) instead of the lectins.

Specificity of the lectin binding

To determine if the binding of the lectins occurs via carbohydrate moieties at the surface of untreated and differentiated THP-1 cells, 50 μ l cell suspension (5×10^6 cells/ml), 100 μ l of a dilution series of the respective complementary carbohydrate and 50 μ l of a solution containing 12.5 pmol fluorescein-labeled lectin were incubated for 15 min at 4°C. The subsequent processing was again performed as described above. Table I displays the respective inhibitory carbohydrate for each lectin and the amounts used in the study. According to preliminary results, UEA-I and DBA exhibited no binding to either of the cell lines. Hence, no specificity studies were carried out for these lectins. For availability reasons, the specific interaction of SNA to THP-1 cells was not determinable via its corresponding carbohydrate sialic acid α 2,6 Gal/GalNAc.

Internalization of surface bound WGA

To evaluate the internalization of surface bound WGA, 50 μ l cell suspension (5×10^6 cells / ml) of untreated and differentiated cells were incubated with 50 μ l WGA solution containing 12.5 pmol lectin for 15 min at 4°C (pulse incubation). Unbound lectin was removed by centrifugation and washing with 150 μ l PBS. Subsequently, cells were further incubated for 0-240 min at either 4°C or 37°C (chase incubation) and then prepared for flow cytometry. After determination of the MFI values, 40 μ l monensin solution (2.4 mM in EtOH) were added and cells were incubated for 3 min at room temperature. Finally, the MFI was assessed again.

Flow cytometry

Data acquisition was performed using an Epics XL-MLC analytical flow cytometer (Coulter, FL, USA). In order to exclude any dead cells, debris, and aggregates, viable cells were gated

according to their forward versus side scatter properties. From each sample, 3000 cells were acquired within this gate. Fluorescence emission of the fluorescence labeled single cell population was measured at 525 nm (10 nm bandwidth) after excitation at 488 nm. Data analysis was conducted using Coulter System II Software 3.0.

Statistics

Statistical analyses were carried out using the Microsoft Excel[®] integrated analysis tool. The hypothesis test among two data sets was made by comparing two means from independent (unpaired) samples (t-test). Values of $p < 0.05$ were considered significant. All experiments were performed at least in triplicate.

Results

PMA-induced differentiation of THP-1 monocytes to macrophages

After treatment of THP-1 cells with 8 nM PMA for 48 h, adherence and morphology were examined by microscope. Analysis of cell adherence by counting after trypan blue exclusion revealed that >90% of the cells were attached to the surface after PMA treatment. As to morphology adherent THP-1 cells became more flattened and elongated indicating the macrophage phenotype as compared to the untreated cells which remained round and in suspension albeit partly aggregated in clusters.

To further ensure differentiation to macrophages, CD14 expression was investigated as the upregulation of this surface molecule has been reported for maturing monocytes [10, 16]. Flow cytometric analysis demonstrated an increase of CD14 as compared to untreated THP-1 cells. The mean cell-associated fluorescence intensity (MFI) was 0.5 ± 0.3 in case of untreated cells, 0.8 ± 0.0 MFI were detected for cells treated for 24 h, 9.9 ± 0.5 after 48 h and 26.0 ± 0.5 MFI in case of cells treated for 72 h. MFI values of the isotype control were 0.52 in case of untreated cells and 0.57 in case of differentiated cells and subtracted from all data quoted.

Lectin binding capacity of THP-1 cells

Plant lectins with different carbohydrate specificities were used to estimate the glycosylation pattern of untreated and differentiated THP-1 cells. For comparison of the data, MFI values of each lectin were related to an apparent conjugation number of 1 mol fluorescein per mole lectin. For both, untreated and differentiated THP-1 cells WGA yielded the highest binding capacity with MFI values between 1.0 ± 0.0 and 17.1 ± 0.2 (untreated cells) and $0.7 \pm <0.1$ and 16.6 ± 0.4 (differentiated) respectively. In case of untreated THP-1 cells, lectin binding was also observed for STL (MFI values up to 10.3 ± 0.5), PNA (up to 1.0 ± 0.1) and SNA (up to $0.3 \pm <0.1$) (Fig. 1a). LCA revealed only very low MFI values scarcely above the autofluorescence of

the cells ($0.1 \pm <0.1$). For both cell types, binding of UEA-I, DBA as well as BSA, which served as a control for non-specific protein-membrane interactions, were not detectable. Comparison of the two different THP-1 types exhibited for differentiated THP-1 cells also a distinct interaction with STL (MFI values up to 5.8 ± 0.2) and SNA ($1.2 \pm <0.1$) (Fig. 1b). Interestingly, a notably higher interaction occurred with LCA ($2.4 \pm <0.1$ MFI at 100 pmol) as compared to untreated THP-1 cells, whereas no binding capacity for PNA was observed. Fig. 2 compares the results at a lectin concentration of 100 pmol. Fig. 2 compares the results at a lectin concentration of 100 pmol. At this concentration, no significant differences ($p>0.05$) were evaluated for WGA, whereas for all other lectins p-values <0.01 were observable.

Specificity of the lectin-THP-1 interaction

Specific interaction between the plant lectins and THP-1 cells was verified by competitive inhibition with appropriate sugars (Table I). For both untreated and differentiated cells, addition of increasing amounts of corresponding carbohydrates resulted in a decrease of the respective cell-bound lectin. The results are shown exemplarily for differentiated cells in Fig.3 and indicate the specificity of the lectin-cell interactions. Based on the control sample without any sugar addition representing 100%, the percentage of inhibition was calculated. At this, inhibition values of more than 85% were achieved for WGA, STL, and LCA, which points to a highly specific binding of the respective lectin to the cellular structures. In case of untreated cells, similar results were obtained for WGA and STL with inhibition values of about 90% in the same concentration range (data not shown). Instead of LCA, which had not shown a relevant binding capacity to untreated THP-1, the specificity of the PNA-cell interaction was assessed, which also turned out to be specific as represented by more than 90% inhibition at a concentration of 1 μmol galactosamine/reaction (data not shown).

Internalization of surface bound WGA

Fig.4 depicts the results of the internalization experiments concerning differentiated THP-1 cells. After the pulse incubation at 4°C, MFI values of surface-bound WGA amounted to a total of 41.5 ± 0.9 . During chase incubation at 37°C, a time-dependent decrease in fluorescence intensities was observed resulting in 15.8 ± 0.5 MFI after 240 min. In case of non differentiated THP-1 cells (data not shown), MFI values yielded 40.6 ± 2.0 after pulse incubation and bated to 14.2 ± 1.1 upon incubation at 37°C for 240 min. After adding monensin to these WGA pretreated cells, the reduced fluorescence values were restored and approached the same level as the control samples at 4°C.

In addition, the same assays were performed for both cell lines also at 4°C where no considerable differences between the MFI values prior and after monensin addition were observable.

Discussion

The rationale behind the present study was given by the fact that Sabri et al. regarded modulation of glycocalyx components by phagocytic cells as a physiological means of regulating cell adhesion [6], which is also considered as initial step towards differentiation [7]. Thus, a systematic characterization of the glycosylation pattern of untreated and PMA treated THP-1 cells was performed with lectins to investigate possible changes after the differentiation process and the potential applicability of lectins at both stages. For untreated as well as for differentiated THP-1 cells, the highest binding capacity was found for WGA, a lectin specific for *N*-acetyl-D-glucosamine and sialic acid structures. Regarding the MFI values at 100 pmol, no significant difference ($p>0.05$) between the two cell types was detected. The second-best binding for both untreated and differentiated cells was observed for STL, which also recognizes *N*-acetyl-D-glucosamine residues. In contrast to the binding capacity of WGA, significant differences were determined over the whole concentration range depending on PMA treatment. This might be attributed to an increase of sialic acid moieties present at the cell surface of differentiated cells also in accordance with the binding characteristics of SNA, a lectin, which specifically binds to α 2,6-linked sialyl groups and yielded a higher binding capacity in case of differentiated THP-1 cells too ($p<0.01$). Significant differences in the lectin binding pattern were also identified for PNA and LCA. In case of untreated cells, galactosamine residues were assessed via PNA, whereas differentiated cells only showed a binding scarcely above the autofluorescence. In contrast, binding of LCA to mannose structures was very low in case of untreated cells, whereas PMA-treated cells revealed a notably higher interaction with the cell surface. Accessible fucose residues, traceable via UEA, and *N*-acetyl-D-galactosamine moieties, which should be detected with DBA, were neither found on monocytes nor on monocyte-derived macrophages.

Sabri et al. [7] demonstrated that increased adhesiveness of stimulated THP-1 cells resulted in decreased cell coat thickness, at which O-linked carbohydrates are presumably most affected.

Regarding the binding capacity of PNA, which binds to Gal β 1-3-GalNAc, the core 1 structure of the O-linked chains, a significant decrease was detectable during differentiation of THP-1 cells to macrophages which correlates with the aforementioned observation. Additionally, PMA differentiation also had an effect on N-linked sugar residues. α 2, 6-linked sialyl groups, detected via SNA, are a motif on N-linked oligosaccharides and the trimannosyl core groups LCA specifically binds to, are also found on N-linked sugars. For both lectins a significant higher binding capacity was determined on differentiated cells as compared to untreated ones ($p < 0.01$). This observation might be a consequence of the upregulation of the CD14 receptor expression during differentiation. CD14 has four potential N-linked glycosylation sites with a carbohydrate content amounting to 20% of the total molecular mass [17]. Increased binding of SNA and LCA might occur via these structures.

For targeting approaches, not only a high binding rate, but also the specificity of the interaction is an important parameter. Thus, specificity of lectin binding was ascertained yielding inhibition values of at least 85% for each individual lectin.

Uptake of the targeter, often a convenient feature in targeted drug delivery, was observed for WGA. For this lectin, the enhancement of the phagocytic and bactericidal activity had been demonstrated with murine macrophages [15]. In our studies, WGA displayed a high binding capacity together with a high specificity for both untreated and differentiated THP-1 cells. In case of a selective approach towards either monocytes or macrophages, LCA might be a suitable candidate, as this lectin exhibited an explicit binding only in case of differentiated THP-1 cells. Likewise PNA could be used for monocytic cells. However, this lectin showed to diminish the macrophage phagocytic activity in a former study with murine peritoneal macrophages suggesting that O-glycosylation is altered during activation of the cells [18]. This observation correlates with our results and thus, the application as a drug targeter does not seem advisable.

The cellular fate of WGA was investigated over a period of 4 h at 4°C and 37°C, respectively. As shown in Fig. 4 the incubation temperature exerted a significant influence on the MFI values:

upon chase incubation at 4°C they remained constant indicating an irreversible binding without any evidence for detachment or internalization of the cell-bound lectin. In contrast, at 37°C the fluidity of the cell membrane increases and active transport processes can occur. Regarding the MFI values of WGA at this temperature, the observed continuous decrease points to internalization of the lectin and enrichment within acidic compartments, since the fluorescence emission of fluorescein is known to be reduced at acidic pH. Thus, monensin, a carboxylic ionophore which can compensate the pH-gradient between the cytoplasm and acidic compartments was added to the cells to verify this assumption. After monensin treatment the MFI was assessed again and revealed that the obviously pH-dependent quench of the acid-sensitive label was fully restored (Fig. 4). As analyses of the supernatants yielded no detached WGA, calculation of the fraction of WGA entering the lysosomal pathway was possible [19]. In case of untreated THP-1 cells, about 15% of primarily surface bound WGA were accumulated after 10 min, in case of differentiated 25%. The emplacement rate at the end of incubation after 240 min amounted to 64% in case of untreated THP-1 cells and 74% in case of differentiated THP-1 cells respectively. These results indicate that PMA treatment of THP-1 cells resulted in a faster and higher phagocytic activity. Nevertheless, for both cell types a high internalization rate was assessed and thus, WGA seems to be an appropriate candidate for drug targeting purposes to differentiated as well as non differentiated cells.

In summary, the glycosylation pattern of THP-1 cells shows significant changes before and after differentiation with PMA demonstrating a reorganization of sugar residues at the cell surface. Additionally, the potential of WGA as a targeting vehicle to monocytes and macrophages was evaluated. Following on from this work, the application of WGA-grafted drug delivery systems might be an interesting approach, e.g. in treatment of diseases involving monocytes and macrophages such as infectious diseases evoked by parasites, facultative intracellular bacteria or viruses such as HIV.

Figures and Tables

Fig. 1

Lectin binding to untreated (A) and differentiated (B) THP-1 cells at 4°C. The fluorescein-labeled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean ± SD, n = 3).

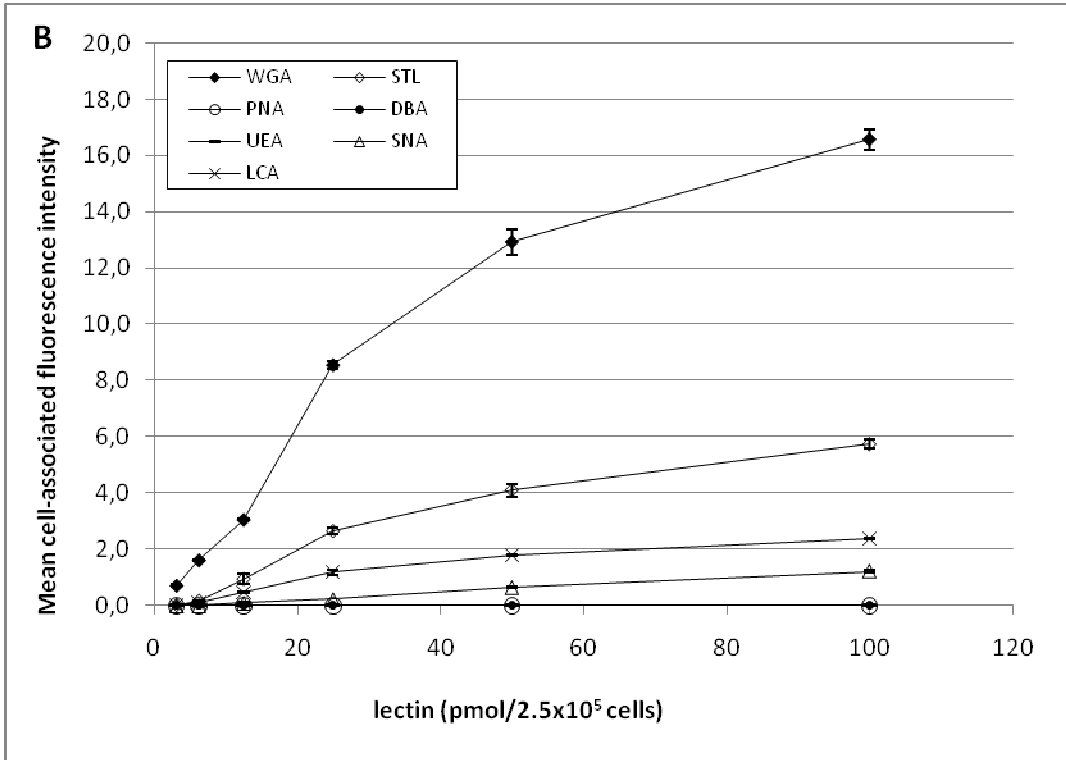
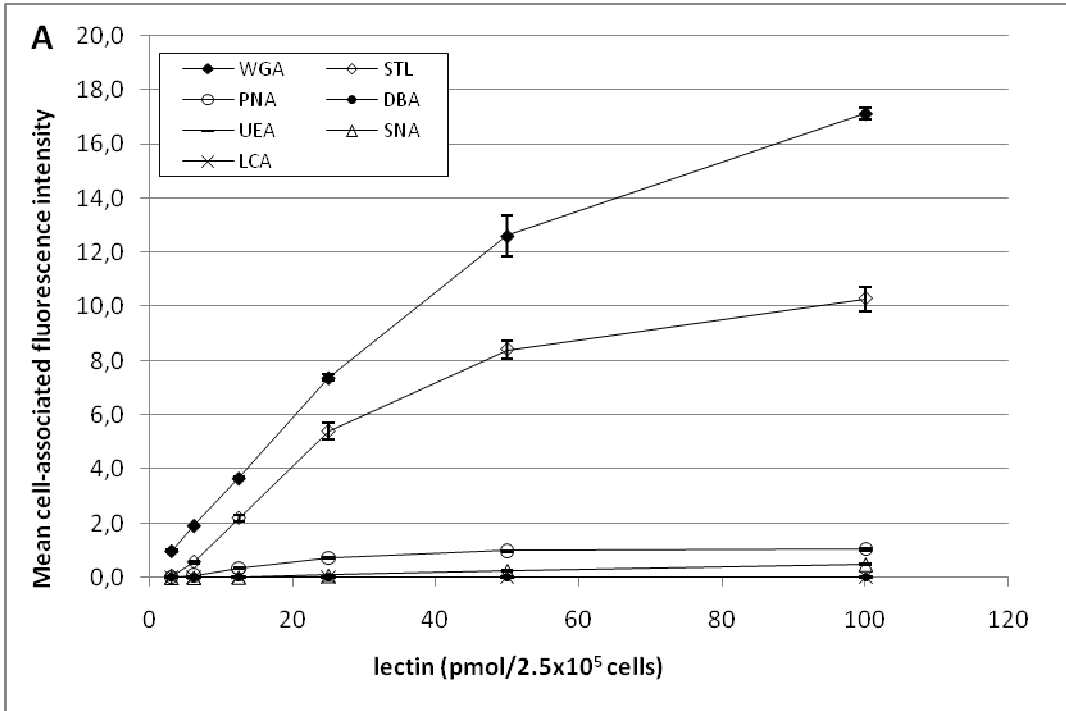


Fig. 2

Comparison of the lectin-binding capacities of untreated and differentiated THP-1 cells using a lectin concentration of 100 pmol (mean \pm SD, $n=3$). Statistical significant differences were determined by student's t-test: **= $p<0.01$.

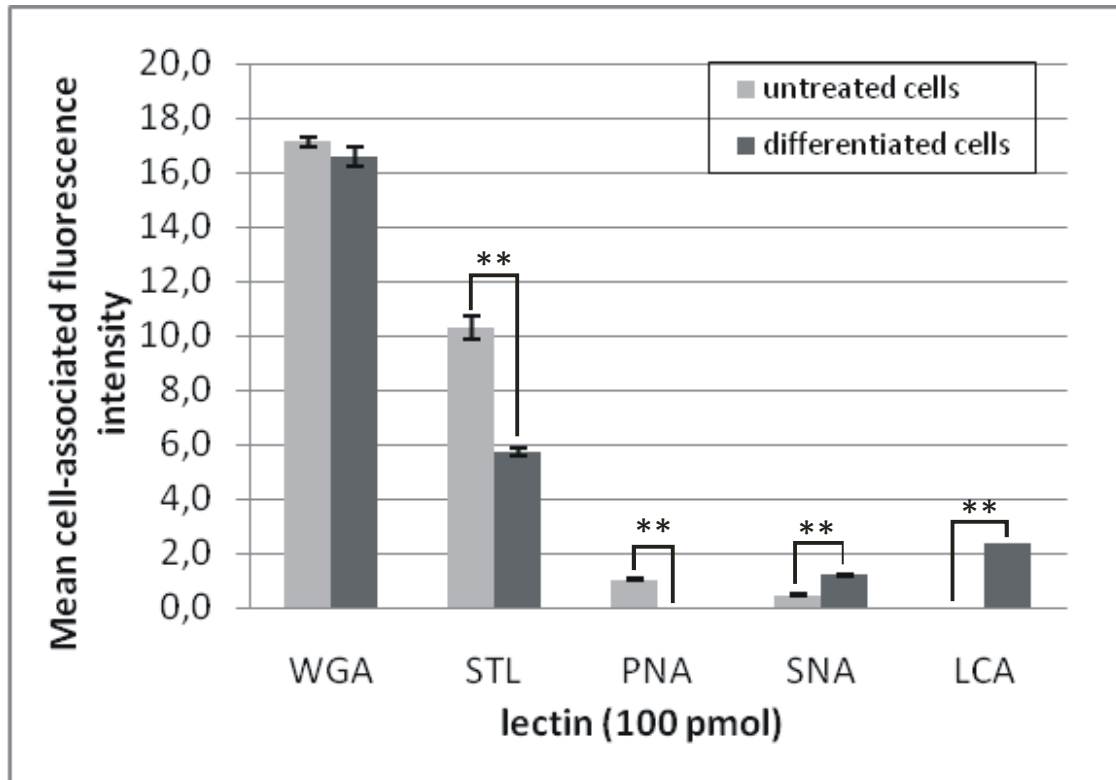


Fig. 3

Competitive inhibition of lectin binding (WGA, STL and LCA) to differentiated THP-1 cells by addition of increasing amounts of complementary carbohydrate (mean \pm SD, $n=3$).

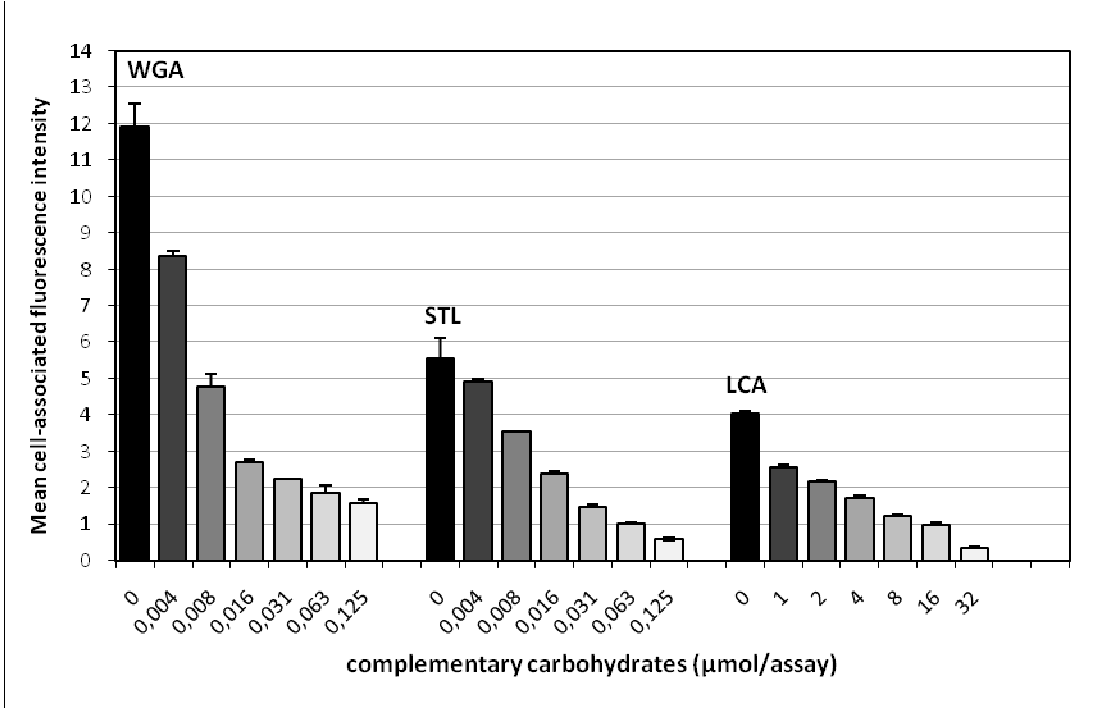


Fig. 4

Mean cell-associated fluorescence intensities of WGA-loaded differentiated THP-1 cells prior and after monensin addition during incubation (0-240 min) at both 4°C and 37°C (mean \pm SD, $n=3$).

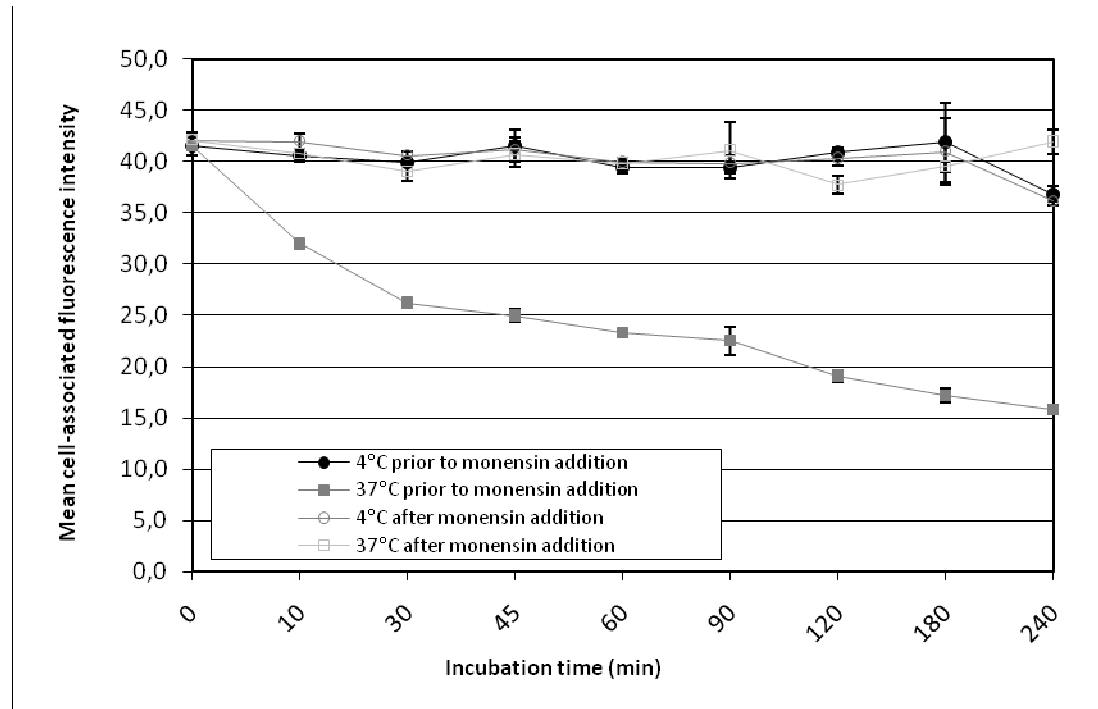


Table I

Specificity of the lectins used in the competitive binding assays

| Lectin | MW | Carbohydrate specificity | Inhibitory sugar | Sugar [c] in $\mu\text{mol}/\text{reaction}$ (untreated/differentiated) |
|--------------|---------|---|--|--|
| WGA | 36 000 | GlcNAc, sialic acid | N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose | 0.004-0.125 |
| STL | 100 000 | GlcNAc | N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose | 0.004-0.125 |
| PNA | 110 000 | β -D-Gal-D-GalNAc, β -D-GalNAc, Gal | D-galactosamine | 0.031-1/n.d. |
| DBA | 120 000 | α -D-GalNAc, Gal | N-acetyl-D-galactosamine | n.d. |
| UEA-I | 63 000 | α -L-Fuc | L-fucose | n.d. |
| SNA | 150 000 | Sialic acid α (2,6)Gal/GalNAc | - | n.d. |
| LCA | 49 000 | α -Man, α -Glc, α -GlcNAc | D-mannose | n.d./1-32 |

GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; α -Glc, α -glucose; α -D-GalNAc, *N*-acetyl- α -galactosamine; Gal, galactose; α -L-Fuc, α -L-fucose; α -Man, α -mannose; n.d.: not determined

References

- [1] H.S. Bennett (1963) Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 11, 14-23.
- [2] Carr I., Everson G., Rankin A., Rutherford J. (1970) The fine structure of the cell coat of the peritoneal macrophage and its role in the recognition of foreign material. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 105, 339-349.
- [3] Hounsell EF (2000) Glycobiology of the immune system, In: Ernst B, Hart GW, Sinaÿ P (eds) *Carbohydrates in chemistry and biology, part II, vol 4.* Wiley-VCH New York
- [4] P.A. Videira, I.F. Amado, H. J. Crespo, M.C. Algueró, F. Dall'Olio, M.G. Cabral, H. Trindade, Surface α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis, *Glycoconj J* (2008) 25: 259-268.
- [5] M. Soler, C. Merant, C. Servant, M. Fraterno, C. Allasia, J.C. Lissitzky, P. Bongrand and C. Foa, Leukosialin (CD43) behavior during adhesion of human monocytic THP-1 cells to red blood cells, *J Leukocyte Biology* 61 (1997) 609-618.
- [6] S. Sabri, M. Soler, C. Foa, A. Pierres, A.M. Benoliel, P. Bongrand, Glycocalyx modulation is a physiological means of regulation cell adhesion, *J Cell Science* 113 (2000) 1589-1600.
- [7] S. Thomas-Ecker, A. Lindecke, W. Hatzmann, C. Kaltschmidt, K.S. Zänker, Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells, *PNAS* 104 (2007) 5539-5544.
- [8] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int J Cancer* 26 (1980) 171-176.

- [9] Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K, Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, *Cancer Research* 42 (1982) 1530-1536.
- [10] Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P, Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, *J Leukoc Biol* 59 (1996) 555-561.
- [11] Q. Chen, A.C. Ross, Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells, *Experimental Cell Research* 297 (2004) 68-81.
- [12] J. Auwerx, The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Experientia* 47 (1991) 22-31.
- [13] M. Kubin, J.M. Chow, G. Trinchieri, Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α , and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells, *Blood* 83 (1994) 1847-1855.
- [14] E.K. Park, H.S. Jung, H.I. Yang, M.C. Yoo, C. Kim, K.S. Kim, Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli, *Inflamm Res* 56 (2007) 45-50.
- [15] R. Gallily, B. Vray, I. Stain, N. Sharon, Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages, *Immunology* 52 (1984) 679-686.
- [16] Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolne AW, Shapira L: Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB., *Infect Immun.* 1999, 67(11):5573-8.

- [17] D.L. Simmons, S. Tan, D.G. Tenen, A. Nicholson-Weller, B. Seed, Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein, *Blood* 73 (1989) 284-289.
- [18] Maldonado G, Porras F, Fernández L, Vázquez L, Zenteno F, Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity, *Immunol Invest.* 1994, 23 (6-7): 429-436.
- [19] M. Wirth, C. Kneuer, C.M. Lehr, F. Gabor, in: C.M. Lehr (Ed.), *Cell culture models of biological barriers*, Taylor and Francis, London and New York, 2002, pp. 62-93.

Lebenslauf

Engleder Elisabeth Teresa

Persönliche Angaben

| | |
|----------------------------|-----------------|
| <i>Staatsangehörigkeit</i> | Österreich |
| <i>Geburtstag</i> | 24.Oktober 1982 |
| <i>Geburtsort</i> | Linz |

Ausbildung

| | |
|---------------------|--|
| <i>1989 – 1993</i> | Volksschule in Walding |
| <i>1993 – 1997</i> | Hauptschule in Ottensheim |
| <i>1997 – 2002</i> | Bundesbildungsanstalt für Kindergartenpädagogik Honauerstraße in Linz |
| <i>Oktober 2002</i> | Inskription für Pharmazie an der Universität Wien |

Berufserfahrung

| | |
|-------------------------------------|--|
| <i>Juli 1997</i> | Reinigungspersonal BBRZ (Berufliches Bildungs- und Rehabilitationszentrum) Linz (2 Wochen) |
| <i>Juli 1999</i> | Kinderbetreuung: Kinderlager der Kinderfreunde Linz in Kirchschlag (2 Wochen) |
| <i>Juli 2002 / August 2003</i> | Hortleitung im Sommerhort des Eltern – Kind - Zentrums (TIPI) in Walding (jeweils 4 Wochen) |
| <i>August 2005 / August 2006</i> | Ferialpraktikum in der Centralapotheke in Linz (jeweils 4 Wochen) |
| <i>März 2007</i> | Tutorium an der Universität Wien „Grundpraktikum aus der Pharmazeutischer Technologie“ (3 Wochen) |
| <i>August 2007</i> | Ferialpraktikum in der Lindwurmapotheke Wien (5 Wochen) |
| <i>Oktober 2007</i> | Tutorium an der Universität Wien „Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie“ (1 Woche) |
| <i>September 2007 – Jänner 2008</i> | 2/10 in der Leonhardus Apotheke am Hochstädtplatz in Wien |
| <i>Oktober 2007 – Mai 2008</i> | Diplomarbeit am „Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ (Althanstraße 14) |
| <i>März 2008</i> | Tutorium an der Universität Wien „Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie“ (1 Woche) |
| <i>Oktober 2008</i> | 1.5/10 in der Lindwurmapotheke |
| <i>November 2008</i> | 2.5/10 in der Lindwurmapotheke |