

## 3.2 Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen

### 3.2.1 Adhäsion auf Fibronectin nach Stimulation mit ManNProp

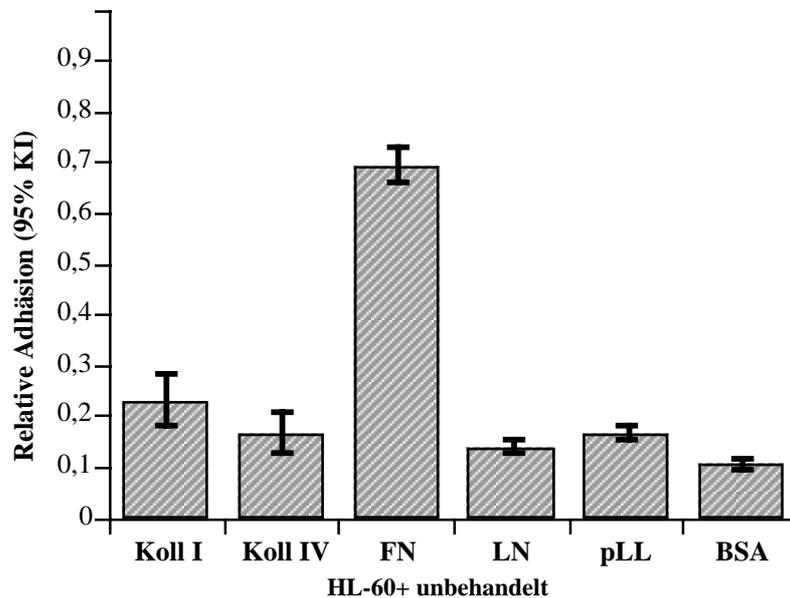
In vorherigen Messungen wurde gezeigt, daß ManNProp langfristig die intrazelluläre  $\beta$ 1-Integrinkonzentration in niedrig- und hochsialylierten HL-60-Zellen erhöht (Abb. 10). Zwar führte bereits die langfristige ManNAc-Inkubation zu einer deutlichen  $\beta$ 1-Integrinkonzentrationssteigerung, jedoch ist ManNProp aufgrund der verlängerten N-Acyl-Seitenkette ein stärkeres Stimulans. Da  $\beta$ 1-Integrine eine wichtige Adhäsionsmolekülklasse bilden, sollten folgende Adhäsionsassays dazu dienen, das Adhäsionsverhalten hochsialylierter HL-60-Zellen auf Matrixproteine nach Stimulation mit ManNProp näher zu analysieren. Zur Auswahl einer geeigneten Matrix wurden unbehandelte hochsialylierte HL-60-Zellen auf Platten, die mit Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Fibronectin oder Laminin beschichtet wurden, verteilt und die Anzahl adhärenter Zellen nach 1 h mittels enzymatischer Farbreaktion photometrisch quantifiziert. Um unspezifische Adhäsionskräfte durch Oberflächenladungen zu messen, wurden BSA und Poly-L-Lysin als Kontrollmatrices benutzt. Der Versuch zeigt, daß unbehandelte hochsialylierte HL-60-Zellen stärker auf Fibronectin als auf Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Laminin und die beiden Kontrollmatrices adhären (Abb. 12), obwohl die absolute Zahl adhärenter Zellen in unstimulierter Form niedrig ist (Abb. 14).

Deshalb wurden zur Messung einer zeitabhängigen, adhäsionsinduzierenden Wirkung von ManNAc und ManNProp auf hochsialylierte HL-60-Zellen folgende Adhäsionsassays auf Fibronectin durchgeführt. Dabei bezieht sich die Zeitabhängigkeit auf die Inkubation der mit ManNAc, ManNProp und ohne Zusatz in Suspension befindlichen Zellen vor der 1 h-Adhäsionsinkubation. Zusätzlich wurde zum Nachweis der Adhäsionsstimulierbarkeit hochsialylierter HL-60-Zellen der Phorbolster PMA eingesetzt, der bekannterweise über Proteinkinase C-Aktivierung (PKC) die Adhäsion von Zellen stimuliert. Unabhängig von der Kultivierungsdauer unbehandelter Zellen führte der Zusatz von PMA während der Adhäsionszeit zu dichtstehenden, adhären Zellen (Abb. 14), so daß sich diese Fraktion als Positivkontrolle bzw. 100%-Referenzbereich für den Wirkungsvergleich unbehandelter sowie ManNAc- und ManNProp-behandelter hochsialylierter HL-60-Zellen eignete (Abb. 13). Aufgrund der geringen Anzahl adhärenter Kontrollzellen ohne ManNAc- bzw. ManNProp oder PMA-Zusatz befand sich die enzymatische Farbreaktion der Kontrolle in einem

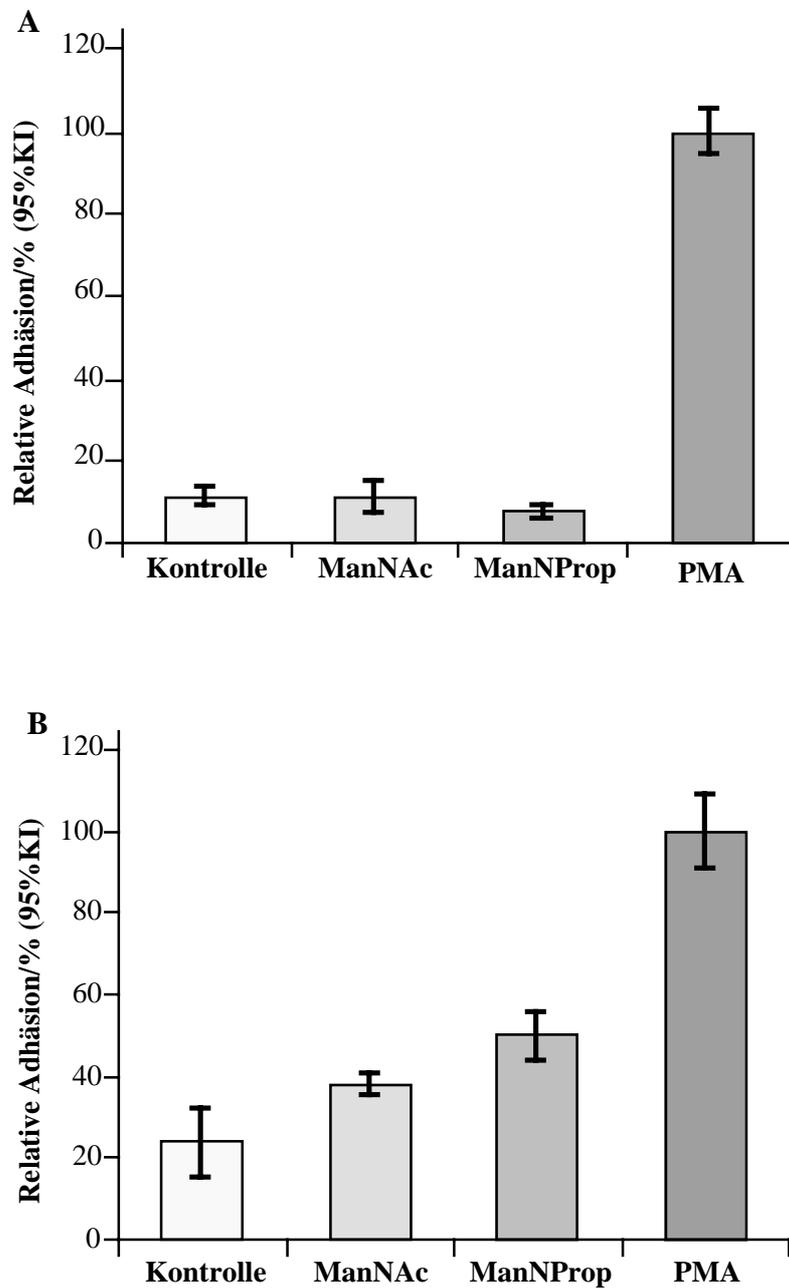
photometrisch ungenauen Bereich mit einer relativen Adhäsionsschwankung zwischen 10% bei 4 h und 25% bei 72 h.

Die Adhäsionsmessungen ergaben, daß die 72 h ManNAc- und ManNProp-Inkubation die Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen auf Fibronectin steigert, wobei der ManNProp-induzierte Effekt signifikant stärker ist (beachte, die 95%-Konfidenzintervalle in den 72 h Messungen überschneiden sich nicht). Während die 72 h ManNAc-Inkubation im Mittel 37% der PMA-induzierten Adhäsion bewirkt, erreicht die Adhäsion durch 72 h ManNProp-Inkubation im Mittel 50% (Abb. 13). Im Vergleich zur Kontrolle mit unbehandelten Zellen adhäreren nach 72 h ManNAc-Inkubation 1,5-mal und nach 72 h ManNProp-Inkubation 2-mal mehr Zellen auf Fibronectin, während PMA einen Adhäsionsfaktor von 4 erzielt.

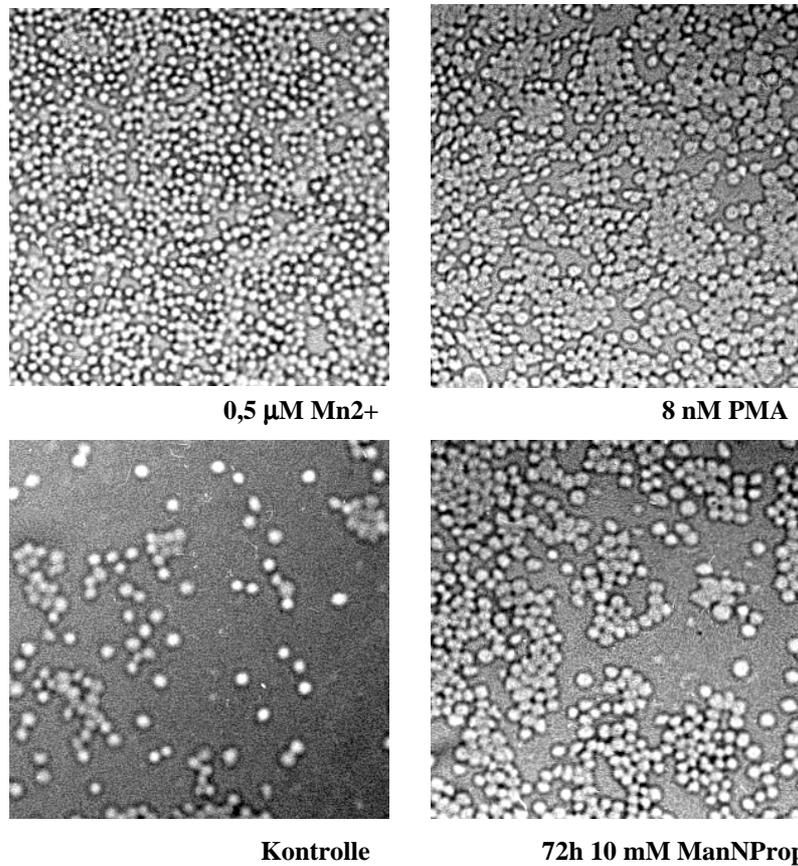
Die kurzfristige 4 h ManNAc- und ManNProp-Inkubation hochsialylierter HL-60-Zellen führt zu keiner Adhäsionszunahme, auch wenn sich die Zellen durchaus PMA-induziert zur Adhäsion anregen lassen (Abb. 13).



**Abb. 12: Adhäsion hochsialylierter HL-60 Zellen.** Es wurden  $2 \times 10^5$  HRP-markierte (20 mg/ml) Zellen pro Well auf Kollagen Typ I (Koll I), Kollagen Typ IV (Koll IV), Fibronectin (FN), Laminin (LN), Poly-L-Lysin (pLL) und BSA beschichtete Platten verteilt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nM. Abgebildet sind Mittelwerte und die 95% Konfidenzintervalle der optischen Dichte (OD) [n = 4 (n = Anzahl der Messwerte)].



**Abb. 13: Adhäsion hochsyalierter HL-60 Zellen auf Fibronectin.**  $2 \times 10^6$  hochsyalierter HL-60-Zellen wurden 4 h (A) und 72 h (B) ohne (Kontrolle) und mit 10mM ManNAc bzw. 10 mM ManNProp inkubiert. Es wurden  $2 \times 10^5$  HRP-markierte (20 mg/ml) Zellen pro Well auf Fibronectin ausplattiert. Positiv-Kontrolle ist die PMA-Fraktion (8 nM PMA). Nach 1 h Adhäsionszeit wurden die Zellen 3x gewaschen und mit Farbreaktionspuffer 30 min gefärbt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nM. Abgebildet sind Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle in Relation zu dem jeweiligen PMA-Mittelwert [ $n(4 \text{ h}) = 4$ ,  $n(72 \text{ h}) = 8$ ].

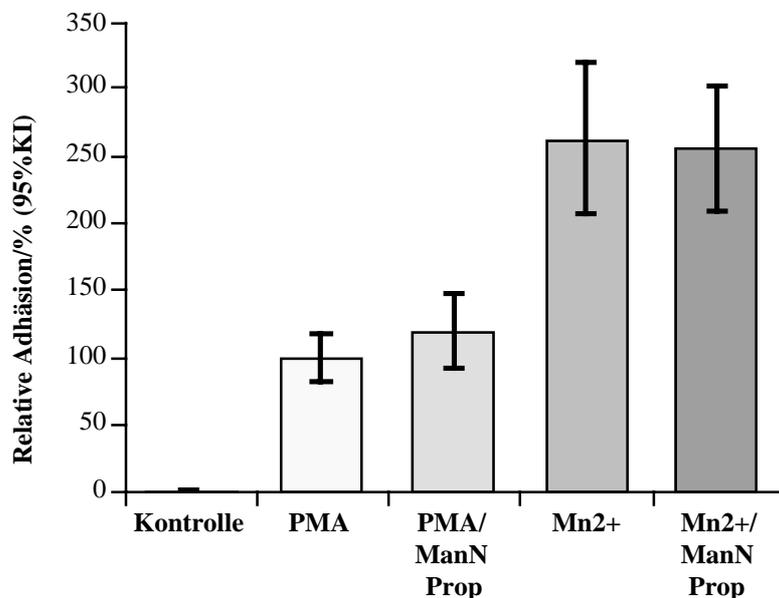


**Abb. 14: Fotografische Darstellung adhärenter hochsialylierter HL-60 Zellen auf Fibronectin.**  $2 \times 10^6$  hochsialylierte HL-60 Zellen wurden 72 h ohne (Kontrolle) und mit 10 mM ManNProp inkubiert. Es wurden  $2 \times 10^5$  HRP-markierte (20 mg/ml) Zellen pro Well auf Fibronectin ausplattiert. Positiv-Kontrolle ist die PMA-Fraktion (8 nM PMA). Nach 1 h Adhäsionszeit wurden die Zellen 3x gewaschen und über mikroskopische Vergrößerung fotografiert.

### 3.2.2 Adhäsion auf Fibronectin nach Stimulation mit PMA/ManNProp- und $Mn^{2+}$ /ManNProp-Kombination

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß durch langfristige Inkubation mit N-Acylspezifisch modifiziertem ManNProp die Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen verstärkt wird. Auch wenn der adhäsionsinduzierende Wirkungsmechanismus von ManNProp noch ungeklärt ist, sollte in folgendem Experiment gemessen werden, ob ManNProp mit den adhäsionsinduzierenden Wirkungsmechanismen vom Proteinkinase C-Aktivator PMA oder von  $Mn^{2+}$  interagiert, d.h. ob sich ein additiver Synergismus oder eine inhibitorische Interferenz zeigt.

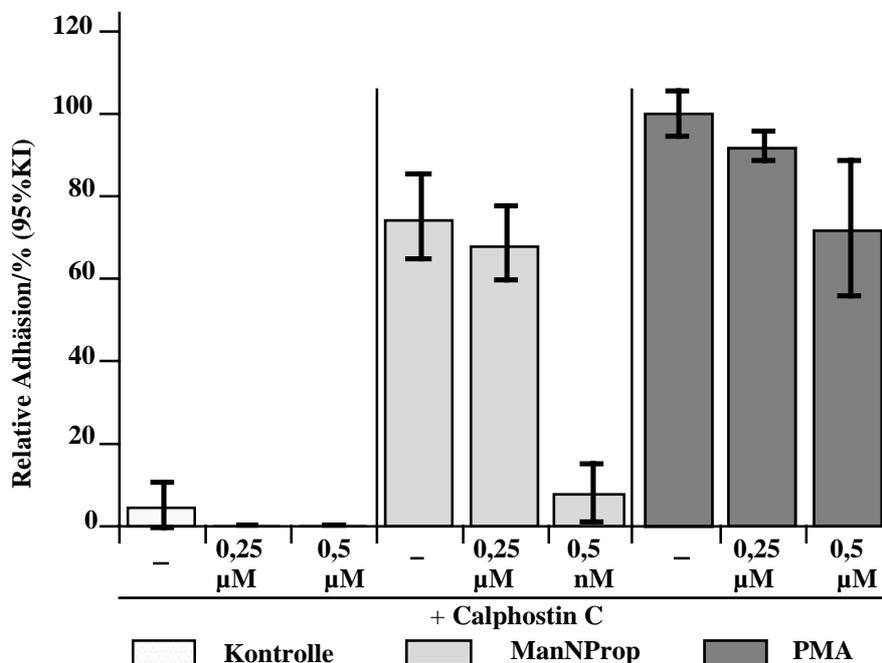
Die Messungen ergeben, daß die adhäsionsinduzierende Wirkung von  $Mn^{2+}$  stärker ist als die von PMA. Denn  $Mn^{2+}$  steigert die Adhäsion hochsialylierter HL-60 Zellen im Vergleich zu PMA auf ca. 250% (Abb. 15). Die Wirkung der Einzelsubstanzen PMA und  $Mn^{2+}$  ist der Wirkung der jeweiligen Kombinationen mit ManNProp äquivalent. Es werden weder additive Synergismen noch inhibitorische Interferenzen gemessen.



**Abb. 15: Adhäsion hochsialylierter HL-60 Zellen auf Fibronectin.**  $2 \times 10^6$  Zellen wurden 72 h ohne bzw. mit 10 mM ManNProp inkubiert. Es wurden  $2 \times 10^5$  HRP-markierte (20 mg/ml) Zellen pro Well auf Fibronectin ausplattiert. 8 nM PMA und 0,5 mM  $Mn^{2+}$  wurden der Kontrolle und der ManNProp-Fraktion 5 min vor dem Ausplattieren zugefügt. Nach 1 h Adhäsionszeit wurden die Zellen 5x gewaschen und mit Farbreaktionspuffer 30 min gefärbt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm. Abgebildet sind Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle in Relation zu dem PMA-Mittelwert [n=4].

### 3.2.3 Adhäsion auf Fibronectin nach Hemmung der Proteinkinase C

Um nachzuweisen, ob Proteinkinase C-Aktivität für das durch ManNProp veränderte Adhäsionsverhalten notwendig ist, wurden unbehandelte Kontrollen, PMA-inkubierte und ManNProp-inkubierte hochsialylierte HL-60-Zellen mit Calphostin C, einem spezifischen Proteinkinase C-Inhibitor, versetzt (Abb. 16). In der Kontrollgruppe reduziert Calphostin C die Anzahl adhätierender Zellen auf nahezu <1%. Eine Adhäsionsabnahme ManNProp-inkubierter Zellen beobachtet man bei einer Calphostin C-Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  die im Proteinkinase C-spezifischen Inhibitionsbereich liegt. Die Adhäsion sinkt von 70% (ohne Calphostin C) auf <1% (mit 0,5  $\mu\text{M}$ ) und weist auf eine Proteinkinase C-Abhängigkeit des ManNProp-induzierten Adhäsionssignalwegs hin. Die Adhäsion PMA-inkubierter HL-60-Zellen wird auf ungefähr 75% unter der Einwirkung von 0,5  $\mu\text{M}$  Calphostin reduziert. Eine stärkere Wirkungsumkehr von PMA läßt sich vermutlich aufgrund einer irreversiblen Aktivierung einer Teilmenge des Proteinkinase C-Pools nicht erreichen.

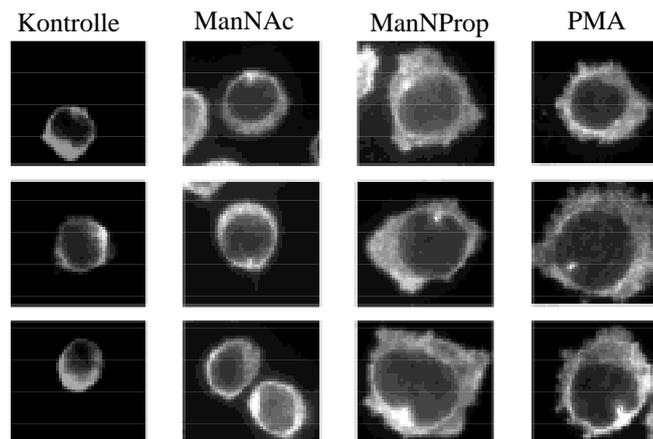


**Abb. 16: Adhäsion hochsialylerter HL-60-Zellen auf Fibronectin.**  $2 \times 10^6$  Zellen wurden 72 h ohne und mit 10 mM ManNProp inkubiert. Es wurden  $2 \times 10^5$  HRP-markierte (20 mg/ml) Zellen pro Well auf Fibronectin ausplattiert. 0,25  $\mu\text{M}$  bzw. 0,5  $\mu\text{M}$  Calphostin C wurden der Kontrolle und der ManNProp-Fraktion und der PMA-Fraktion (8 nM PMA) 5 min vor dem Ausplattieren zugefügt. Nach 1 h Adhäsionszeit wurden die Zellen 3x gewaschen und mit Farbreaktionspuffer 30 min gefärbt. Die Absorptionmessung erfolgte bei 450nm. Abgebildet sind Mittelwerte und die 95% Konfidenzintervalle in Relation zu dem PMA-Mittelwert [n = 4].

### 3.2.4 Adhäsionsmorphologie nach Stimulation mit ManNProp

Zum Nachweis von Änderungen der Zellmorphologie, die typischerweise bei der Adhäsion von Zellen auf einer Matrix auftreten, wurden in diesem Versuch hochsialylierte HL-60-Zellen nach 72h Inkubation mit ManNAc bzw. ManNProp und kurzfristiger PMA-Inkubation mittels anti-Paxillin-Antikörper markiert und mit der Kontrolle in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie verglichen (Abb. 17).

In den Abbildungen ist deutlich zu sehen, daß die HL-60-Zellen nach Stimulation mit ManNProp analog zu den PMA-stimulierten Zellen 4-mal größer erscheinen als die Kontrolle und die ManNAc-inkubierten Zellen. Während die Kontrollzellen und die ManNAc-inkubierten Zellen ein nahezu gleichmäßig rundes Paxillin-reiches helles Zytoplasma haben mit ausgesparten ungefärbtem Kern, weisen die ManNProp- und PMA-inkubierten Zellen ein breites zipfelig-ausgezogenes asymmetrisches Zytoplasma auf, so als hätten sich die offensichtlich stärker adhärennten Zellen flächiger in alle Richtungen ausgestreckt, um eine größere Kontaktfläche mit der Fibronectinmatrix zu schaffen. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis bleibt jedoch in allen Fraktionen unverändert.



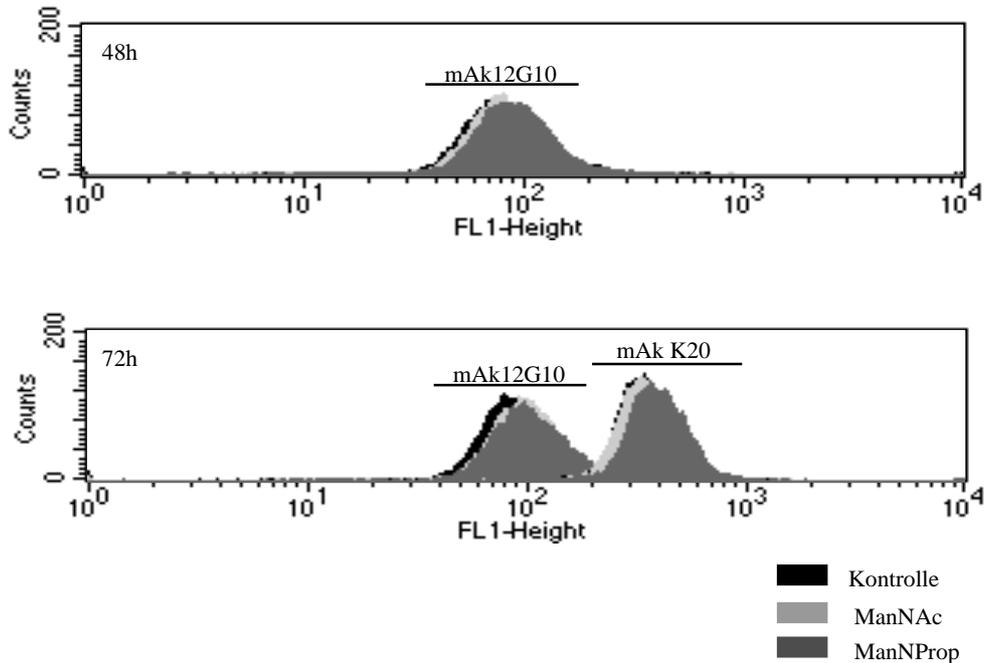
**Abb. 17: Morphologie von adhärennten hochsialylierten HL-60-Zellen auf Fibronectin.** Hochsialylierte HL-60-Zellen wurden mit und ohne 10 mM ManNAc bzw. ManNProp oder 8 nM PMA inkubiert. Die Adhäsionszeit auf Fibronectin betrug 2 h, bevor sie schließlich mit einem Anti-Paxillin-mAk markiert und mittels der Immunfluoreszenz-Mikroskopie fotografiert wurden.

### 3.2.5 Messung Liganden-induzierter Bindungsstellen der $\beta$ 1-Integrine nach Stimulation mit ManNProp

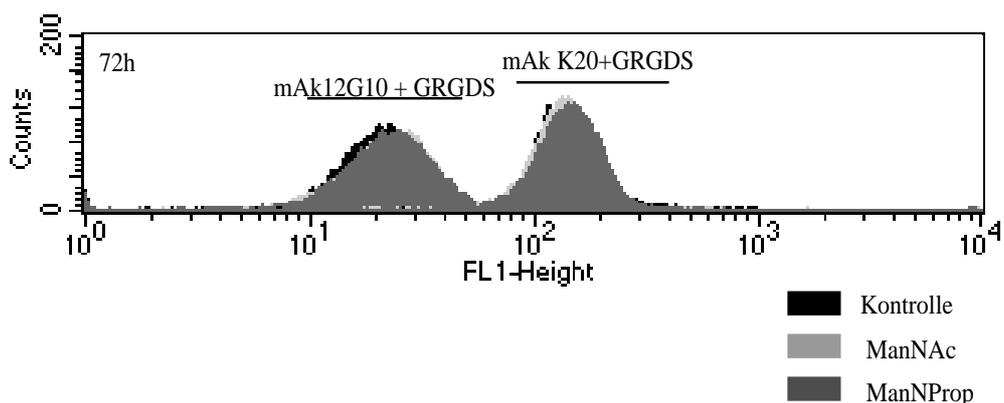
Der monoklonale Antikörper 12G10 erkennt Liganden-induzierte Bindungsstellen bei aktiver Konformationsstellung des  $\beta$ 1-Integrins. In diesem Versuch sollte anhand von FACS-Analysen gemessen werden, ob sich die Inkubation von ManNAc oder ManNProp auf die Konformation der Integrine auswirkt. Dies sollte durch Zunahme Liganden-induzierter Bindungsstellen gemessen werden. Um auszuschließen, daß es sich bei den Messungen mit 12G10 lediglich um eine Bindungssteigerung aufgrund eines Anstiegs der Rezeptorzahl handelt, wurden gleichzeitig Messungen mit dem Pan- $\beta$ 1-Antikörper K20 durchgeführt, der Schlußfolgerungen quantitativer Art über das  $\beta$ 1-Integrin ermöglicht. Die Verteilungskurven (Abb. 18) geben die Fluoreszenzintensitäten einer Population von  $10^5$  Zellen wieder. Sie verschieben sich bei ManNAc- bzw. ManNProp-behandelten Zellen sowohl in den Messungen mit dem mAk 12G10 als auch mit dem mAk K20 geringfügig nach rechts und weisen auf eine leichte Zunahme der Erkennungsdeterminanten hin.

Die Fluoreszenzintensität aller Proben beträgt für die mAk K20-Markierung 300-400 FL1-Height und für die mAk 12G10-Markierung 80-100 FL1-Height. 25% der durch mAk K20 detektierbaren  $\beta$ 1-Integrine exponieren also die von mAk 12G10 erkannten Liganden-induzierten Bindungsstellen.

Da die Exposition Liganden-induzierter Bindungsstellen auf dem  $\beta$ 1-Integrin durch die VLA-5-spezifische Erkennungsdeterminante RGD des Fibronectinmoleküls erhöht werden kann, wurden in einem weiteren Versuch (Abb. 19) ManNAc bzw. ManNProp-behandelte Zellen zusätzlich mit dem Peptid GRGDS inkubiert. So sollte der Einfluß von ManNAc und ManNProp auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion gemessen werden. Die Verteilungskurven zeigen im Vergleich zur Messung ohne GRGDS-Zusatz (Abb. 18) ein unverändertes Bild.



**Abb. 18:** Nachweis membranärer  $\beta$ 1-Integrine in aktiver Konformationsstellung hochsialylierter HL-60-Zellen mittels FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 12G10.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden 48 h und 72 h mit 10 mM ManNAc bzw. 10 mM ManNProp inkubiert, mit dem  $\beta$ 1-Integrin mAk 12G10 und K20 markiert und im FACS ausgewertet.



**Abb. 19:** Nachweis membranärer  $\beta$ 1-Integrine in aktiver Konformationsstellung hochsialylierter HL-60-Zellen mittels FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 12G10 nach Exposition mit GRGDS.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden 72 h mit 10 mM ManNAc bzw. 10 mM ManNProp inkubiert und anschließend für 30 min dem Peptid GRGDS exponiert. Auswertung erfolgte mittels FACS-Messung mit den mAk 12G10 und K20.