

4. Diskussion

In den durchgeführten Experimenten mit der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT werden die Auswirkungen zweier Vertreter der neuartigen antiproliferativen Wirkstoffklasse, Glyceroglycophospholipid (Glc-PC) und 1-O-octadecyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-sn-glycero(3) (Glc-PAF) auf physiologische Vorgänge untersucht. Dazu gehört vornehmlich der Einfluss auf die Proliferation, der von der Zytotoxizität abzugrenzen ist.

Neben der generellen Charakterisierung dieser glucosidierten Phospholipide ist auch die Bedeutung der Strukturunterschiede der einzelnen Phospholipide von Interesse. So zeigt sich bei den Versuchen zur Zytotoxizität, dass der Strukturunterschied zwischen Glc-PAF und Glc-PC erhebliche Auswirkung im zytotoxischen Potential ausmacht. Im Hinblick auf eine eventuell spätere pharmazeutischen Verwendung dieser Substanzgruppe ist es wichtig eine möglichst große biologische Wirksamkeit zu erreichen, die nicht mit einer erhöhten Toxizität einhergeht.

4.1. Einfluss auf die Zytotoxizität

Die Zytotoxizität wird zunächst mit der Trypanblaumethode untersucht. Mit ihr werden Zellmembrandefekte angefärbt und damit abgestorbene Zellen erkannt. Mit dieser Methode kann mit HaCaT-Zellen sowohl nach 2h als auch nach 48h Inkubation mit 5 μ M Glc-PAF bzw. 10 μ M Glc-PC keine Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden. Sie entspricht der von unbehandelten Zellen. In der Literatur ist die LD₅₀ nach 6h Inkubation in HaCaT-Zellen für Glc-PC mit 17 μ M und für Glc-PAF mit 9 μ M angegeben⁵³. Es wurde dabei eine Methode verwendet, die auf der Messung der alkalischen Phosphatase basiert. Die für die Trypanblauassays gewählten Konzentrationen liegen unter diesen angegebenen LD₅₀-Werten, aber es sollte auch schon hier ein zu erkennender Einfluss auf die Zellviabilität zu beobachten sein.

Die Trypanblaumethode erscheint somit für die Zytotoxizitätsbestimmung zu ungenau und wird durch die sensitivere Methode der quantitativen LDH-Messung ersetzt. Für Glc-PC kann so eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität beobachtet werden. In HaCaT-Zellen liegt die LD₅₀ nach einer Inkubationszeit von 48h bei 17 μ M. Nach 2h Inkubation kann auch bei einer Konzentration von 20 μ M Glc-PC noch keine erhöhte LDH-Freisetzung festgestellt werden. Auch mit Glc-PAF kann eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität festgestellt werden. Nach 48h Inkubation wird die LD₅₀ in HaCaT-Zellen für Glc-PAF mit 3,5 μ M bestimmt. Nach 2h Inkubation liegt der LD₅₀-Wert bei 8,8 μ M bestimmt. Es zeigt sich somit eine deutliche Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Inkubationszeit. Die Differenz mit den Literaturdaten kann durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden und die Wahl anderer Inkubationszeiten erklärt werden. Ein direkter Vergleich dieser Daten ist daher nicht möglich.

Untersuchungen mit anderen synthetischen Phospholipiden ergeben bei 48 Stunden Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC eine LD₅₀ von 7 μ M. Für die 48stündige Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF ist die mit LD₅₀ 15 μ M angegeben¹¹⁷.

Für die 24stündige Inkubation mit Glucosimid-PAF liegt der angegebene LD₅₀-Wert bei 5-6 μ M, und für Glucosamin-PAF bei 30 μ M¹¹⁸. Sowohl HePC als auch Inositol-C2-PAF wurden mit der gleichen Methode wie Glc-PC bzw. Glc-PAF untersucht. Glc-PC weist dabei die geringste Zytotoxizität auf, gefolgt von Inositol-C2-PAF. Glc-PAF ist mit dem LD₅₀-Wert von 3,5 μ M am toxischsten. Die Werte von Glucosimid-PAF und Glucosamin-PAF können in

diesem Zusammenhang nicht gedeutet werden, da auch hier Inkubationszeit und Methode nicht mit der in dieser Arbeit verwendeten übereinstimmen.

Welche Ursache der Zytotoxizitätsunterschied zwischen den Substanzen hat, ist weitestgehend unklar. Als zugrunde liegenden Mechanismus der Zytotoxizität von synthetischen Phospholipiden wird vermutet, dass durch die Einlagerung von Phospholipiden in die Zellmembran die Anordnung der integralen Proteine, der tight junctions oder deren Verbindungen zu ihren zytoskelettalen Partnern gestört ist und es somit zur Formation von Poren kommt^{119,120}. Desweiteren ist Glc-PAF metabolisch stabiler als Glc-PC, das durch endogene Esterasen abgebaut werden könnte.

4.2. Einfluss auf die Proliferation

Sowohl Glc-PAF als auch Glc-PC haben in HaCaT-Zellen eine antiproliferative Wirkung. Nach 24h Inkubation ergibt sich für Glc-PAF eine IC_{50} von $3\mu M$. Für Glc-PC liegt der Wert bei $8,8\mu M$. Bei der Verwendung der zweiten Zelllinie, den SCC-25-Zellen, wird deutlich, dass verschiedene Zelltypen je nach Rezeptorverteilung und Wachstumsverhalten unterschiedlich auf die Substanzen reagieren. Dieser sehr viel schneller proliferierende Zelltyp kann auch stärker durch die synthetischen Phospholipide im Wachstum gehemmt werden. Bei beiden sinkt die IC_{50} auf niedrigere Werte. Bereits bei $0,6\mu M$ Glc-PAF ist die halbmaximale Hemmkonzentration erreicht. Glc-PC muss in einer Konzentration von $5,5\mu M$ eingesetzt werden, um die IC_{50} zu erreichen.

Für HePC kann in HaCaT-Zellen eine IC_{50} von $4,5\mu M$ ermittelt werden. Beim Einsatz von HePC in SCC-25-Zellen sinkt dieser Wert auf $1,5\mu M$.

Werden HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF für 48h inkubiert, so ergibt sich ein IC_{50} -Wert von $1,8\mu M$. Auch hier kann eine Zunahme des antiproliferativen Effektes bei der Verwendung von SCC-25-Zellen festgestellt werden. Die IC_{50} sinkt bei 48h Inkubation mit Inositol-C2-PAF auf $0,6\mu M$ ¹¹⁷. Sowohl Glucosimid-PAF als auch Glucosamin-PAF sind nur in HaCaT-Zellen auf ihre antiproliferative Wirkung hin untersucht worden. Glucosimid-PAF weist nach 72h Inkubation eine maximale Abschwächung der Proliferation um 28% auf. Bei Glucosamin-PAF kann ein zeitabhängige Einfluss auf die Proliferation beobachtet werden. 48h Inkubation mit $8\mu M$ Glucosamin-PAF führen zu einer Minderung der Proliferation um 16%. 24h Inkubation mit $8\mu M$ führen dagegen zu einer Zunahme um 30%¹¹⁸.

In der Literatur wird bei der Verwendung von HaCaT-Zellen für Glc-PC eine IC_{50} von $3\mu M$ und für Glc-PAF von $5\mu M$ angegeben⁵³. Für HePC soll die IC_{50} bei $3\mu M$ liegen¹²¹. Der Unterschied zwischen den in der Literatur angegebenen Daten und den aus den BrdU-Proliferationsassays gewonnenen Ergebnissen kann nicht eindeutig erklärt werden. Es ist möglich, dass die einzelnen Substanzen zu unterschiedlichen Versuchsbedingungen untersucht worden sind. So ist bei diesen Versuchen zum Beispiel die eingesetzte Zellzahl von großer Bedeutung. Bei einer sehr hohen Zellzahl wird die Substanz schneller metabolisiert und damit inaktiviert. Es kann außerdem bei konfluent wachsenden Zellen zur zelllichteabhängigen Proliferationshemmung, der Kontaktinhibition, kommen. Um dies zu verhindern, werden die Zellen in den 96 well Mikrotiterplatten mit einer Zellzahl von 10^4 /well subkonfluent ausplattiert. Eine Proliferation der Zellen während der Versuchsdauer wird somit berücksichtigt.

In den ersten Versuchen zur Antiproliferationshemmung, die mit FCS-haltigen Serum durchgeführt werden, kann eine starke Wirkungsabschwächung der synthetischen Phospholipide beobachtet werden. Dabei kann auch in sehr hohen Konzentration keine Proliferationshemmung beobachtet werden. Das die Wirkung von Phospholipiden durch Serum beeinflusst werden kann, belegen auch Arbeiten von Wieder und Mitarbeitern. In

Gegenwart von 10% Rinderserum steigt der IC₅₀-Wert von HePC auf 27,4µM¹²¹. Die Struktur der meisten synthetischen Phospholipide besteht aus einem Glycerolgrundgerüst mit einem langkettigen Substituenten am C1, einem kurzkettigen Substituenten am C2 und der Phosphocholinkopfgruppe am C3. Bereits relativ geringe Strukturunterschiede scheinen einen großen Einfluss auf das Ausmaß der antiproliferativen Wirkung zu haben. So besteht der Unterschied zwischen Glc-PAF und Glucosamin-PAF bzw. Glucosimid-PAF lediglich im Austausch einer OH-Gruppe gegen eine Aminogruppe am Glucosemolekül am C2. Glucosamin-PAF bzw. Glucosimid-PAF zeigen aber im Vergleich mit Glc-PAF einen sehr viel geringeren antiproliferativen Effekt auf.

Ein weiteres Beispiel ist das schon in der Einleitung erwähnte ET-18-OCH₃. Es weist am C2 des Glycerolgrundgerüsts, wo Glc-PAF Glucose enthält, als Substituenten eine Methylgruppe auf. Der in Brustkarzinomzellen ermittelte IC₅₀-Wert liegt bei 2µM.

Am Beispiel von HePC kann dagegen gezeigt werden, dass das Glycerolgrundgerüst keine Voraussetzung für den antiproliferativen Effekt darstellt¹²².

Die antiproliferative Wirkung von synthetischen Phospholipiden wird in der Literatur als die Blockade mitogener Stimuli diskutiert. Es ist vorstellbar, dass durch die Einlagerung der Phospholipide in die Zellmembran deren Zusammensetzung und Fluidität verändert wird¹²². Dieser Effekt könnte sich auch auf den Transport zytosolischer Proteine zur Zellmembran sowie deren Verankerung an der Zellmembran auswirken. Ein Angriffspunkt der synthetischen Phospholipide scheint die Hemmung des Transports zur Zellmembran von Raf-1 bzw. dessen beschleunigte Dissoziation von der Membran zu sein. Infolge dessen werden die Kinasen Mitogen-Activated (MEK)/Extracellular Signal-Regulated Kinase und Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) nicht phosphoryliert. Im weiteren Verlauf wird die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und c-fos gehemmt und es kommt damit zur Proliferationshemmung¹²³.

Insgesamt kann der Schluss gezogen werden, dass die Wirkungen von synthetischen Phospholipid Substanzen zunächst von der verwendeten Zelllinie abhängen. Glc-PC und Glc-PAF wirken unterhalb ihrer LD₅₀ auf beide Zelllinien antiproliferativ. In SCC-25-Zellen wirken sie schon in sehr viel geringeren Konzentrationen als in HaCaT-Zellen.

4.3. Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsion und Integrinexpression

Sowohl Glc-PC als auch Glc-PAF führen zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Zunahme der Zell-Matrix-Adhäsion. Bereits nach 2h Inkubation in HaCaT-Zellen auf den Matrixproteinen Kollagen IV, Fibronectin und Laminin kommt es zu einem Anstieg der Adhäsion. Besonders hervorstechend ist dabei der Anstieg auf Fibronectin, der um ein Vielfaches stärker ist, als auf Kollagen IV oder Laminin. Unter normalen Bedingungen ist die Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Kollagen IV am stärksten. Sie kann aber scheinbar durch die Phospholipide nicht so sehr aktiviert zu werden wie für Fibronectin. Nach 24h Inkubation ist die Steigerung der Adhäsion geringer ausgeprägt. Nach 48h Inkubation ist durch Glc-PC und Glc-PAF kein Einfluss auf die Adhäsion mehr zu beobachten.

Die Proliferation, die Differenzierung und auch die Funktion der Zelle werden in erheblichem Ausmaß von der Adhäsion von Zellen an anderen Zellen oder die extrazelluläre Matrix gesteuert und beeinflusst. Unter Adhäsion versteht man einen rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Molekülen der extrazellulären Matrix und Aktinfasern des Zytoskelett. Die Zelle wird so im Zellverband oder der Matrix verankert und erhält Signale zur Steuerung von fundamentalen Lebensprozessen. Die Untersuchung zum Adhäsionsverhalten unter Einfluss der glucosidierten Phospholipide soll somit Rückschlüsse auf Veränderungen von Zellfunktionen geben. Die Extrazelluläre Matrix ist ein sehr komplexes Makromolekül-

Geflecht, das den größten Teil des extrazellulären Raumes im Gewebe ausfüllt. Der Grundaufbau dieses Gewebes besteht u.a. aus Fibroblasten, die in großer Menge fibrilläre Proteine in einem extrazellulären Netzwerk produzieren. Dieses ist in ein hydriertes Gel aus Glyksaminoglykanen eingebettet. Glyksaminoglykane sind große unverzweigte Polypeptidketten aus Disaccharideinheiten. Sie sind negativ geladen und sehr hydrophil. Durch kovalente Bindung an Proteinen bilden sich Proteoglykane, welche in der Lage sind große Hydrationsräume aufrecht zu erhalten¹⁰³. Zu diesen Proteinen gehören Kollagen, Fibronectin und Laminin. In den durchgeführten Adäsionsassays dienen Kollagen IV, Fibronectin und Laminin als extrazelluläre Matrix. Der Kontakt zwischen Zelle und Zellmatrix wird von Proteinen der Zelloberfläche vermittelt. Die Integrine bilden die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie. Sie sind hauptverantwortlich für die Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix¹⁰¹⁻¹⁰³. Integrine sind transmembrane heterodimere Glykoprotein. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die α -Untereinheit ist mit ca. 1100 Aminosäuren größer als die β -Untereinheit und besteht meist aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Beide Untereinheiten bestehen in der Membran aus ca. 20-30 Aminosäuren und besitzen eine zytoplasmatische Region (C-Terminus) von etwa 20-50 Aminosäuren. Über diesen C-Terminus sorgt die β -Untereinheit über intrazelluläre Proteine, wie Talin oder Vinculin, für eine Bindung an das Aktinskelett der Zelle. Die Focal Adhesion Kinase (FAK) ist ein mit der β 1-Untereinheit assoziiertes Enzym¹¹⁶. Sie kann nach Aktivierung weitere Signalmoleküle, wie c-SRC, PI-3K u.a. binden. Über eine SH2- Bindungsdomäne kann Grb-2 und damit die MAPK-Kaskade aktiviert werden¹¹⁷. Durch die Bindung von Integrinen findet also sowohl Signalübertragung in die Zelle als auch die Bindung zur Matrix statt. Da, wie oben geschildert die Zell-Matrix-Adhäsion in vielen Fällen über Integrine vermittelt wird, liegt die Vermutung nahe, von der beobachteten Adhäsionssteigerung entweder auf eine verstärkte Integrinexpression oder zumindest auf eine Aktivierung derer zu schließen. Eine Aktivierung kann durch verschiedene integrinassoziierte Membranproteine ausgelöst werden und so zu einer stärkeren Affinität sowie Avidität führen. Desweiteren kann die Adhäsion auch über die Beweglichkeit der Integrine beeinflusst werden. Man unterscheidet dabei die passive, diffusionsgetriebene, ligandeninduzierte Adhäsionsverstärkung von der aktiven, ligandenunabhängigen Adhäsionsverstärkung¹²⁴. Die Einlagerung von Phospholipiden in die Zellmembran könnte zur verbesserten Diffusion von Integrinen führen. Dadurch könnten sie sich im Rahmen einer aktiven Mikroclusterbildung vermehrt zusammenlagern und somit die Adhäsion verstärken^{125,126}. HaCaT-Zellen exprimieren α 2, α 3, α 4, α 6, α v, β 1 und β 4. Die Bindung der Zelle an Kollagen IV erfolgt über α 2 β 1 oder α 3 β 1, an Fibronectin über α 4 β 1, α 5 β 1 und α v β 1. Laminin wird über α 6 β 4 gebunden¹²⁷.

Um die Vermutung einer eventuell erhöhten Expression weiter zu untersuchen, wird die Methode der Durchflußzytometrie angewendet. Damit ist es möglich eventuell stattfindende Veränderungen der Zelloberflächenproteine zu erfassen. HaCaT-Zellen weisen in großer Konzentration β 1, β 4, und α 3-Untereinheiten auf. Somit richten sich die weiteren Untersuchungen zunächst darauf. Für β 1 und α 3 kann unter Einfluss von Glc-PC und Glc-PAF keine erhöhte Expression nachgewiesen werden. Nur für β 4 konnte bei 5 μ M Glc-PC ein leichter Anstieg vermerkt werden. In sehr hoher Konzentration kommt es vermutlich wegen toxischer Effekte zu einer Abnahme aller untersuchten Integrinuntereinheiten auf der Zelloberfläche.

Auch Inositol-C2-PAF führt in HaCaT-Zellen zu einer Steigerung der Adhäsion auf Kollagen IV, Fibronectin und Laminin¹¹⁷. Dieser Effekt ist zeit- und konzentrationsabhängig und ist im Gegensatz zu Glc-PC und Glc-PAF auch noch nach 48h nachzuweisen. Es kann desweiteren gezeigt werden, dass es nach Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer verstärkten Expression von β 4- und α 6-Integrinuntereinheiten kommt. Damit ließe sich die verstärkte Adhäsion auf

Laminin erklären. Für $\beta 1$ -Integrinuntereinheiten kann keine verstärkte Expression nachgewiesen werden. In Immunfluoreszenzanalysen kann jedoch ein vermehrtes Clustern von $\beta 1$ -Integrinen beobachtet werden. Die durch Inositol-C2-PAF ausgelöste Adhäsionssteigerung könnte somit durch eine erhöhte Avidität der $\beta 1$ -Integrine erklärt werden^{117,128}.

Um die durch Glc-PAF und Glc-PC ausgelöste Adhäsionssteigerung auf Fibronectin zu untersuchen, sollten auch die bis jetzt unberücksichtigt gebliebenen $\alpha 5$ und αv -Untereinheiten untersucht werden. Sie stellen die Hauptrezeptoren für Fibronectin dar. $\alpha 5$ -Untereinheiten werden besonders in fokalen Kontakten exprimiert und können durch Aktivierung der Proteinkinase C (z.B. durch den Phorbolster TPA oder PMA) auf Proteinebene hochreguliert werden. Dadurch weisen die fokalen Kontakte eine stärkere Adhäsion auf¹⁰⁷. Ob es zu einer PKC-Aktivierung und damit zu einem Inside-Out-signaling kommt, wird in weiteren Adhäsionsversuche unter Einfluss spezifischer Inhibitoren untersucht. U73122 ist ein Inhibitor der PLC und Wortmannin hemmt die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die PLC kann über den klassischen PLC vermittelten Signalweg (Spaltung von PIP2 in IP3 und DAG) eine Aktivierung der PKC auslösen. Diese kann die Bindungsaktivität der Integrine modulieren. Die Inhibition der PLC und auch der PI3 Kinase, welche die PLC-Aktivität stimulieren¹⁰⁸, führt jedoch zu keiner stärkeren Adhäsionsinhibition als dies bei unbehandelten Zellen der Fall gewesen ist. Das heißt, dass entweder die PKC über einen völlig anderen Weg aktiviert wird, andere Integrine beteiligt sind oder völlig andere Mechanismen die gesteigerte Adhäsion verursachen.

4.4. Einfluss auf die Morphologie und das Zytoskelett

Unter Einfluss der glucosidierten Phospholipide kommt es zu einer Veränderung der Zellform, die auch nach 48 h Inkubationszeit noch unverändert geblieben ist. Die äußere Gestalt der Zellen schwankt häufig erheblich. In der Regel ist sie für den jeweiligen Zelltyp charakteristisch, wobei Umgebung und Funktion starken Einfluss auf die Zellmorphologie ausüben. Die jeweils typische Zellform formiert sich normalerweise erst im Gewebeverband. Typische Bestandteile aller eukaryoten Zellen sind Mikrotubuli, Mikrofilamente und intermediäre Filamente. Zusammen bilden sie das Zytoskelett. Alle Teile des Zytoskeletts fügen sich zu einem strukturierten, dynamische Netzwerk zusammen, das für die Gestalt der Zelle, für Bewegungsvorgänge und für den Transport von Organellen und Vesikeln eine große Bedeutung hat. Änderungen in der Zellmorphologie sind somit mit einem Ansprechen des Zytoskelettes verbunden. Um die an der Veränderung beteiligten Strukturen weiter identifizieren zu können, werden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Sie beschränken sich zunächst auf das F-Aktin-Zytoskelett. Aktinfilamente sind sehr feine, vernetzte Fäden von 1 μ m Länge, die häufig mit der Kern- oder Zellmembran in Verbindung stehen. Das Aktinnetzwerk hat einerseits die Aufgabe, die Zelle zu stabilisieren und andererseits reorganisatorische Umbauprozesse zu unterstützen. Ausgehend von den Integrinen, die den äußeren Kontakt zur extrazellulären Matrix herstellen, kommt es über Verbindungsglieder zu einer Verknüpfung mit Aktin-Fasern. Der gesamte Komplex aus Integrinen, Verbindungsproteinen und Aktinfasern, wird als fokaler Kontakt bezeichnet. In dieser Region kommt es zu einer lokalen Verdichtung der an der Oberfläche verteilten Integrine (Cluster). Die Ergebnisse der mit Phalloidin durchgeführten Immunfluoreszenzen bestätigen die mit dem Lichtmikroskop beobachteten Morphologieänderungen. In der Aktinfärbung kann die unregelmäßige Einziehung der Plasmamembran, und die Verkleinerung der Zelle mit einer corticalen Verdichtung der Aktin- Fasern in Zusammenhang gebracht werden. Desweiteren kommt es zu einer punktförmigen Verdichtung der Aktinfasern. Die verstärkte Adhäsion und

die Veränderungen im Zytoskelett stehen somit in deutlichem Zusammenhang. Über welchen Signalweg dies jedoch ausgelöst wird, muss noch näher untersucht werden. Ein Ansatzpunkt wären sicherlich die Untersuchung der kleinen GTP- bindenden Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen. Rho ist an der Bildung von Spannungsfasern und fokalen Adhäsionskomplexen beteiligt. Desweiteren können die Rho-Kinasen ROCKI und II eine verstärkte Kontraktilität der Aktin-myosinfasern vermitteln. Nach einer Modellvorstellung kommt es nach Phosphorylierung der Myosinfilamente zu einer Quervernetzung der Aktinfilamente. Die Myosinfilamente üben durch Kontraktion einen Zug aus, der die Integrine in den fokalen Kontakten von innen her clustert und Aktinfilamente zu Spannungsfasern bündelt¹⁰⁹. Diese Bündelung und das verstärkte Clustern, wie es nach Rho-Aktivierung entsteht, ist nach Behandlung von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF beobachtet worden¹¹⁷. Ob auch Glc-PC und Glc-PAF dies verursachen, muss in weiteren Immunfluoreszenzanalysen noch untersucht werden.

4.5. Einfluss auf die Migration

Nach 2h und 24h Inkubation mit 20 μ M Glc-PC nimmt die Migration von HaCaT-Zellen in einem Transwell-Assay ab. In geringerer Konzentration kann kein Einfluss auf die Migration festgestellt werden. Die Abnahme der Zellmigration bei 20 μ M Glc-PC korreliert mit der beobachteten Zunahme der Adhäsion. Mit Glc-PAF kann dagegen kein Einfluss auf die Migration beobachtet werden.

Die Gabe von Inositol-C2-PAF vermindert die Anzahl migrierender HaCaT-Zellen schon nach 2h Inkubation drastisch. Auch HePC hemmt die Migration von HaCaT-Zellen¹¹⁷. In durchgeführten Wundheilungsstudien mit HaCaT-Zellen sieht man desweiteren eine durch Inositol-C2-PAF verursachte verzögerte Wundheilung¹¹⁷.

Dagegen führt die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Glucosimid-PAF und Glucosamin-PAF nach 3h bzw. 24h Inkubation zu einer Zunahme der Migration¹¹⁸.

Die Zellmigration ist bei Keratinozyten im Rahmen der Wundheilung sehr gut untersucht worden. Ungefähr 24h nach der Verwundung machen basale Keratinozyten, stimuliert durch Wachstumsfaktoren aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, einen Proliferationsschub durch. Dieses Wachstum löst die Migration aus. Dazu müssen die Verankerungen zur Basalmembran gelöst werden. Die wichtigsten Bestandteile der Basalmembran sind Laminin und Kollagen IV an die die Basalkeratinozyten über $\alpha 6\beta 4$ und $\alpha 2\beta 1$ -Integrine gebunden sind. Um die Adhäsion zur Basalmembran zu lösen, werden die Integrine proteolytisch abgebaut. Metalloproteinasen, die in hoher Konzentration am Wundort zu finden sind (MMP-9, MMP-1), können dann Bestandteile der extrazellulären Matrix verdauen, so dass Zellen über die provisorische Wundmatrix kriechen können¹⁰⁶. Während der Migration entstehen an der Spitze der wandernden Zelle, also in den Filopodien und den Lamellipodien kleinere fokale Komplexe, die als unreife fokale Kontakte angesehen werden können. In diesen werden neue Integrine exprimiert, womit die Zelle eine Bodenhaftung erhält. Durch Aktivierung der PKC kommt es zu einer Hochregulation von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinuntereinheiten, wodurch die fokalen Kontakte eine stärkere Adhäsion aufweisen. Dies ist die Grundlage für eine matrixabhängige Zellmigration¹⁰⁷. Die fokalen Kontakte bewegen sich mit Vorwärtsbewegung der Zelle nach hinten. Dafür müssen die Komplexe wieder aufgelöst werden. Dies wäre durch Aufhebung der durch Rho-induzierten Spannungsfasern oder der Aktin-Myosin-Interaktionen möglich¹²⁹. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Wundheilung epithelialer Zellen durch die Transfektion mit konstitutiv aktivem RhoA stark verzögert ist. Die Ausrichtung der Zellen am Wundrand ist verzögert und es bilden sich keine

„Führerzellen“. Im Gegensatz dazu führt sowohl die Transfektion von dominant negativem RhoA als auch die Rho-Kinasen-Inhibition mit Y-27632 zur Ausbildung von sogenannten Führerzellen, die grosse Lammellipodien in den Wundbereich erstrecken¹²⁸.

Neben der Bildung und Auflösung von Zell-Matrixkontakten sind kontraktile Kräfte und Zugfestigkeit für die Fortbewegung essentiell. Dabei haben die einzelnen Bestandteile des Zytoskelett verschiedene Aufgaben. Die Mikrofilamente sorgen für die Vorwärtsbewegung, während die aus Keratin bestehenden Intermediärfilamente die Adhäsion bedingen. Die Mikrotubuli schließlich sorgen für den Transport der Adhäsionsmoleküle an den Wundrand⁷⁸. Die Migration wird gestoppt, wenn die offene Wunde mit einer einzelligen Schicht von Keratinozyten bedeckt ist (Kontaktinhibition). Basalzellen bilden Hemidesmosomen aus. $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin ist Bestandteil der Hemidesmosome und verbindet die Laminine der Basalmembran mit dem Keratinnetzwerk im Inneren der Zelle^{131,132}. Die Zellen sind somit wieder mit der Basalmembran verankert. Suprabasale Keratinozyten beginnen zu differenzieren sowie interzelluläre Adhäsionsstrukturen zu bilden, um die Epidermis wieder aufzubauen.

Die Migration ist also ein sehr komplexer Vorgang, der eng an Adhäsions- und Proliferationsvorgängen der Zelle gekoppelt ist. Über welchen Weg Glc-PAF und Glc-PC die Migration beeinflussen, muss noch untersucht werden. Für Inositol-C2-PAF gibt es Hinweise, dass es zur Aktivierung von kleinen GTPasen, wie Cdc42 kommt, die an der Spitze der migrierenden Zellen lokalisiert sind und zur Filopodienbildung führen¹¹⁷.

4.6. Veränderung des Tyrosinphosphorylierungsmuster

Mit den Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierung sollen Hinweise gewonnen werden, ob die Veränderung des Tyrosinphosphorylierungsmuster einen Einfluss auf die physiologischen Zellfunktionen haben. Die Phosphorylierung von Proteinen stellt einen häufig in Anspruch genommenen Mechanismus dar, mit dem Signalwege innerhalb der Zelle, sei es in Inside-out oder Outside-in Richtung verlaufen.

In den durchgeführten Western-Blots kann unter Einfluss von Glc-PC keine verstärkte Tyrosinphosphorylierung in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen kommt es nach 24h Inkubation mit 5 μ M Glc-PAF zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung bei einem Protein mit einem Molekulargewicht von 185kDa. Nach 48h Inkubation kann diese nicht mehr nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um eine transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten. Um welche Proteine es sich dabei handelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es könnte sich um den EGF-Rezeptor (epidermal-growth-factor-Rezeptor) handeln, dessen Molekulargewicht in diesem Bereich liegt. Der EGFR ist auf den meisten mesenchymalen und epithelialen Zellen exprimiert¹¹⁴. Eine Ligandenbindung resultiert über Signaltransduktion, die eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität beinhaltet, in Proliferation und Wachstum der rezeptortragenden Zelle^{113,114}. An der cervikalen Adenocarcinomzelllinie CAC-1 konnte gezeigt werden, dass auch andere Zellfunktionen über EGFR beeinflusst werden. Zellen, die mit EGF behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Expression des Zelladhäsionsmolekül $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin, eine Zunahme der Zellmotilität auf Kollagen und Fibronectin, sowie eine Veränderung der Zellmorphologie. Auch eine Dephosphorylierung der Focal Adhesion Kinase (FAK), ein wichtiges Enzym in der Signalkette von Integrinen konnte nachgewiesen werden¹¹⁵. Ob Glc-PAF seinen Einfluss auf HaCaT-Zellen über den EGFR ausübt, steht noch aus zu untersuchen. Dass jedoch viele der in dieser Arbeit untersuchten Zellfunktionen über diesen Rezeptor beeinflusst werden können, steht außer Frage.