

Teil II

Ergebnisse

6 Einfluss der Phospholipidanaloga auf Hautzellen

6.1 Keratinozyten

6.1.1 Substanzinduzierte Zytotoxizität

Die Charakterisierung von Inositol-C2-PAF als mögliches antiproliferativ wirkendes Agens erfordert die Bestimmung der Zytotoxizität. Diese wurde zunächst *in vitro* an HaCaT- und SCC-25-Zellen und Primärfibroblasten getestet. Angegeben ist die letale Konzentration des jeweiligen Analogons, bei der die Hälfte der Zellen nicht mehr vital ist (LC_{50}).

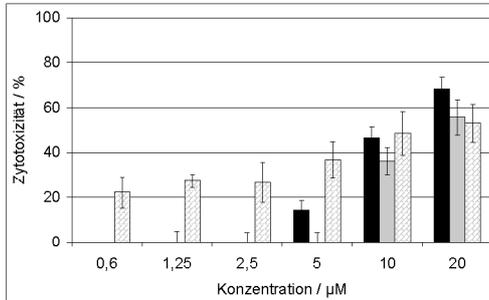
Über die Freisetzung des cytosolischen Proteins Lactat-Dehydrogenase (LDH) und einer anschließenden Farbreaktion in einer Mikrotiterplatte, wurde die substanzinduzierte Toxizität ermittelt. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Medium inkubiert werden, diese werden als 0% Zytotoxizität gewertet. Zellen, die mit einer 2%igen Triton X-100 Lösung lysiert wurden, dienen der Positiv-Kontrolle und werden als 100% Zytotoxizität gewertet. Die gemessene Toxizität ist sehr stark von der Zellzahl und dem Inkubationszeitraum abhängig, deswegen werden bei konstanter Zellzahl (10^4 Zellen/Well einer Mikrotiterplatte) drei Inkubationszeiten (2h, 24h und 48h) untersucht. Man findet konzentrationsabhängige Zunahme der Toxizität. Der LC_{50} -Wert der 2h- und 24h-Inkubation ergibt Werte zwischen $10\mu M$ - $15\mu M$. Der LC_{50} -Wert für die 48stündige Inkubation beträgt $10\mu M$ (Abb. 6.1, oben links).

Für die Inkubation mit HePC ergeben sich folgende Werte: LC_{50} 2h grösser als $20\mu M$, LC_{50} für 24h- und 48h-Inkubation kleiner als $10\mu M$ (Abb. 6.1, oben rechts). Auch hier sieht man eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Toxizität.

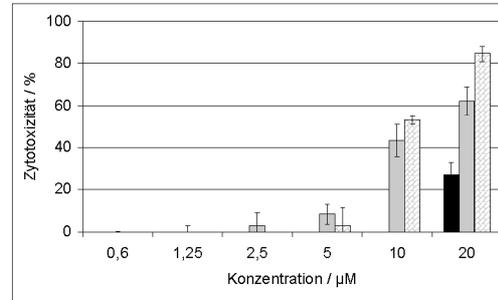
Auf SCC-25-Zellen übt Inositol-C2-PAF bei einer Inkubation von 24h einen ähnlichen Effekt wie in HaCaT-Zellen aus. Nach 48h Inkubation ist die Zytotoxizität gegenüber HaCaT-Zellen deutlich erhöht, folgende Werte wurden gemessen: der LC_{50} 2h sowie der LC_{50} 24h Wert sind grösser als $20\mu M$ und der LC_{50} 48h Wert ist kleiner als $0,6\mu M$ (Abb. 6.1, unten

HaCaT-Zellen

Inositol-C2-PAF

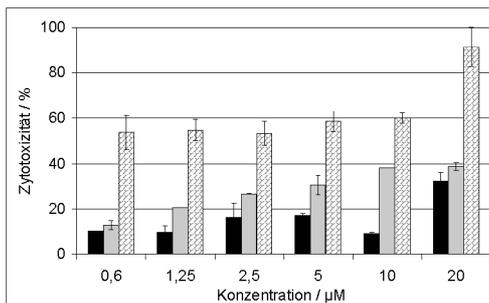


HePC

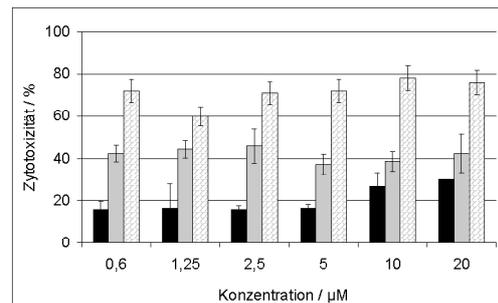


SCC-25-Zellen

Inositol-C2-PAF



HePC



Legende:



Abbildung 6.1: Substanzinduzierte Zytotoxizität

10^4 HaCaT-/SCC-25-Zellen/96Well werden in $200\mu L$ Keratinozyten-Wachstumsmedium ausplattiert und 24h inkubiert. Nach dem Erneuern des Mediums wird mit $100\mu L$ der indizierten Konzentration die Inkubation im Brutschrank für den jeweiligen Zeitraum fortgesetzt. Für die Auswertung werden $100\mu L$ des Überstands zellfrei in eine MTP übertragen, mit $100\mu L$ des Reaktionsgemischs für 30min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch am ELISA-Reader bei 492nm ausgemessen. Die Experimente wurden mindestens dreimal als Vierfach-Bestimmung durchgeführt, davon werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet.

links).

In SCC-25-Zellen zeigt die Inkubation mit HePC keinen Unterschied zur Inkubation mit

Ino-C2-PAF. Auch hier steigt die Toxizität im Gegensatz zur Inkubation von HaCaT-Zellen an. Es resultieren folgende Daten: der LC_{50} 2h sowie der LC_{50} 24h Wert sind grösser als $20\mu M$ und der LC_{50} 48h Wert ist kleiner als $0,6\mu M$ (Abb. 6.1, unten rechts).

6.1.2 Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Zell-Proliferation

Schon seit den 70er Jahren ist bekannt, dass modifizierte Phospholipide das Zellwachstum hemmen (Kudo et al., 1987). Um den Einfluss auf die Proliferation zu messen, wird der Einbau des Thymidinanalogen 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA verfolgt.

Abb. 6.2 zeigt die Abhängigkeit der Inhibition der Proliferation von der Inkubationsdauer bei einer Inositol-C2-PAF Konzentration von $2,5\mu M$. Erst nach 48h ist eine signifikante Inhibition der Zell-Proliferation zu beobachten. Als Kontrolle dienen HaCaT-Zellen, die nur mit Keratinozyten-Wachstumsmedium inkubiert werden.

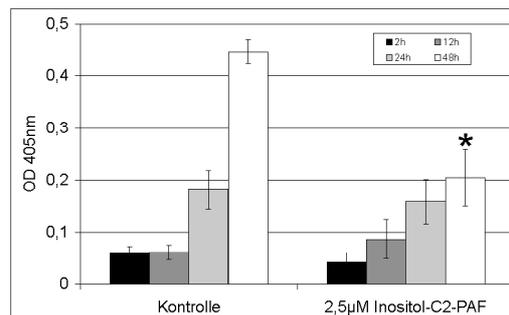


Abbildung 6.2: Zeitabhängige Inhibition der Proliferation von HaCaT-Zellen durch Inositol-C2-PAF

10^4 HaCaT-Zellen/Well werden für die indizierten Zeiträume mit $2,5\mu M$ Inositol-C2-PAF und mit $10\mu M$ BrdU im Brutschrank inkubiert. Für die Ermittlung der 48h-Werte wird die Inkubation mit BrdU erst während der letzten 24h begonnen. Anschließend werden die Zellen gewaschen, fixiert, permeabilisiert und für 90min mit dem Peroxidase gekoppelten anti-BrdU-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen werden $100\mu L$ der Tetramethylbenzidin-Färbelösung dazupipettiert und die MTP für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgt photometrisch am ELISA-Reader bei 405nm. Es werden drei unabhängige Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung bestimmt.

Aus der konzentrationsabhängigen Inkubation der HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF ergibt sich ein IC_{50} -Wert von circa $1,8\mu M$ (Abb. 6.3, oben links).

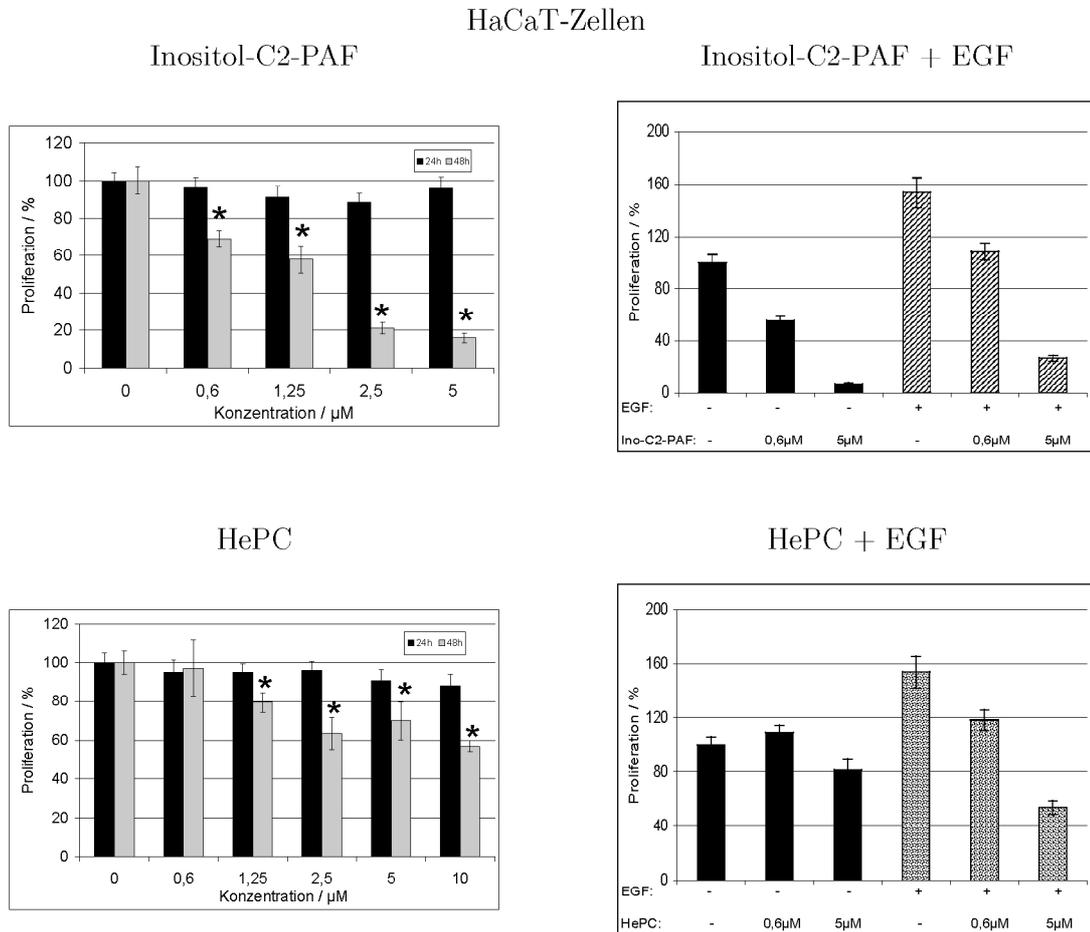


Abbildung 6.3: Einfluss der Analoga auf die Zell-Proliferation

10^4 HaCaT-Zellen/Well werden für 24h oder 48h mit den indizierten Konzentrationen von Inositol-C2-PAF oder HePC (in den rechten Grafiken zusätzlich mit $100ng/mL$ hEGF) inkubiert. Es werden drei unabhängige Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterscheiden.

Dieser inhibierende Effekt wird durch die Gabe des humanen, epithelialen Wachstumsfaktors (EGF) bei geringen Konzentrationen von Inositol-C2-PAF vollständig und bei hohen Konzentrationen von Inositol-C2-PAF teilweise aufgehoben (Abb. 6.3, oben rechts).

Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC zeigt, dass HePC die Proliferation weniger hemmt als vergleichbare Konzentrationen von Inositol-C2-PAF. Der IC_{50} Wert nach 48h

liegt bei circa $10\mu M$ (Abb. 6.3, unten links).

In Abb. 6.3 (unten rechts) ist die gleichzeitige Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC und EGF gezeigt. EGF ist nicht in der Lage, bei hohen Konzentrationen von HePC die antiproliferative Wirkung aufzuheben.

Auch in der Zelllinie SCC-25 wurde untersucht, ob der proliferationsinhibierende Effekt zu beobachten ist. Hierbei handelt es sich um epitheliale Zellen eines Zungenbodenkarzinoms. Der hemmende Effekt der Inkubation mit Inositol-C2-PAF ist bereits nach 24h zu beobachten und nach 48stündiger Inkubation ist der Effekt genauso ausgeprägt wie in HaCaT-Zellen. Es wurden folgende IC_{50} -Werte bestimmt: der IC_{50} 24h Wert von $5\mu M$ und IC_{50} 48h Wert von circa $1,5\mu M$ (Abb. 6.4, links).

Die Wirkung von HePC auf SCC-25-Zellen wurde ebenfalls untersucht. Hier tritt die hemmende Wirkung ebenfalls bereits nach 24h ein, aber es zeigt sich kein Unterschied zwischen einer 24stündigen und einer 48stündigen Inkubation. Es wurden folgende Werte bestimmt: IC_{50} 24h Wert und IC_{50} 48h Wert betragen jeweils $1,25\mu M$ (Abb. 6.4, rechts).

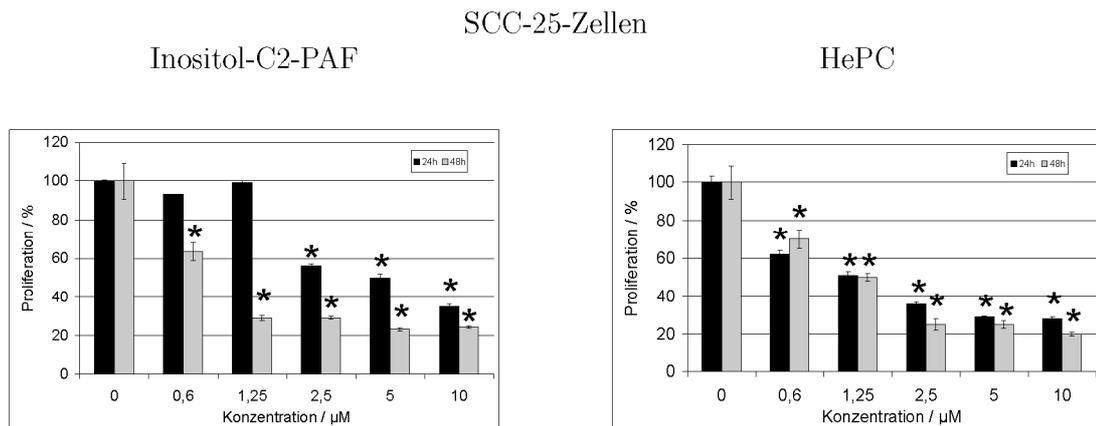


Abbildung 6.4: Einfluss der Analoga auf die Zell-Proliferation von SCC-25-Zellen
 10^4 SCC-25-Zellen/Well werden für 24h oder 48h mit den indizierten Konzentrationen von Inositol-C2-PAF oder HePC inkubiert. Es werden drei unabhängige Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterscheiden.

6.1.3 Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf den Zellzyklus und die Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein aktiver, physiologischer Prozess, der durch diverse Stimuli eingeleitet werden kann. Mit Hilfe eines komplexen Regelmechanismus werden verschiedene molekulare und biochemische Reaktionskaskaden ausgelöst, an deren Ende sich „apoptotische Körper“ bilden. Diese werden anschließend von benachbarten Zellen phagozytiert, ohne eine Entzündung auszulösen. Das unterscheidet Apoptose grundlegend von dem nekrotischen Zelltod (Darzynkiewicz et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die Hemmung der Proliferation auf Induktion der Apoptose beruht, wurden HaCaT- und SCC-25-Zellen mit den Analoga inkubiert und auf Apoptose-Marker untersucht.

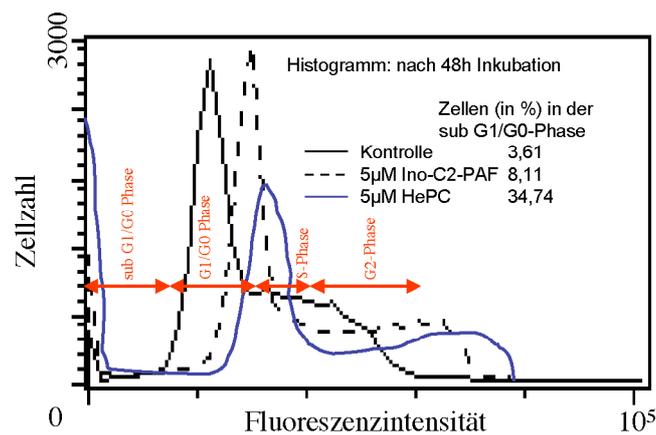
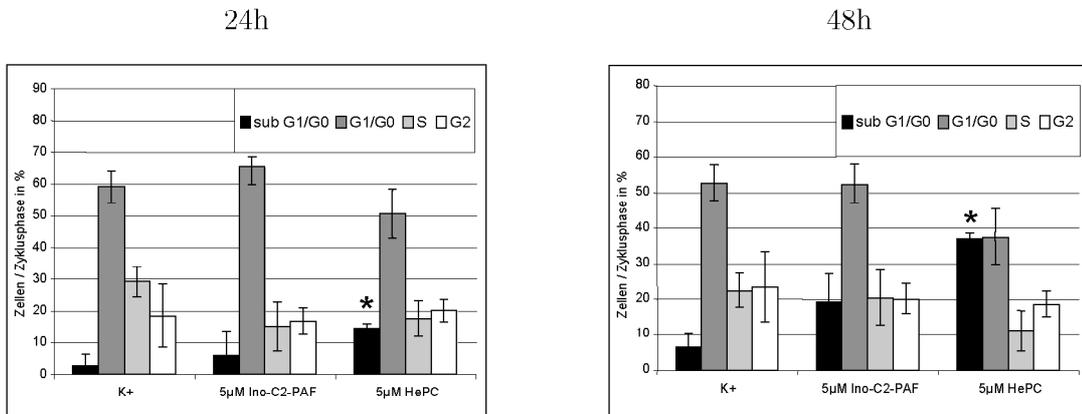


Abbildung 6.5: FACS Analyse der Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF oder HePC in HaCaT-Zellen nach 48h

Propidiumiodid ist in der Lage, in die DNA-Doppelstränge zu interkalieren. Die Charakteristik der Zellen nach Größe und Form sowie die Menge des interkalierten Propidiumiodids geben Hinweise auf die jeweilige Zellzyklusphase. Der Zellzyklus wird in die vier Phasen G1/G0, S, G2 und M eingeteilt. In der Gap0-Phase teilen sich Zellen nur selten, in der Gap1-Phase wächst die Zelle durch Neusynthese von Zellbestandteilen. Während der Synthese-Phase wird die DNA repliziert, daran schließt sich die Gap2-Phase, die zur Vorbereitung der Mitose dient, an. In der kurzen Mitose-Phase finden die Chromosomentrennung und die Zellteilung statt. Die durch Propidiumiodid erzielte Fluoreszenzintensität korreliert mit der DNA-Menge pro Zelle, so dass entlang der X-Achse eines FACS-Diagrammes der Verlauf des Zellzyklus verfolgt werden kann. Dabei stellen sich apoptotische Zellen als Zellen dar, die aufgrund der Kernfragmentation eine geringere Fluoreszenzintensität zeigen (Nicoletti et al., 1991; Gong et al., 1994). Mit dieser Methode erfasst man Zellen, die sich bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befinden. Der zahlenmässig grösste Anteil der Zellen befindet sich in der G1/G0-Phase. Dieser Anteil ist durch eine höhere Propidiumiodid-vermittelte Fluoreszenzintensität, als sie apoptotische Zellen aufweisen, gekennzeichnet. Daran schließen sich die Zellen der S- und G2-Phase an, die zahlenmässig deutlich vermindert sind, aber aufgrund der DNA-Replikation wiederum höhere Propidiumiodid-vermittelte Fluoreszenzintensitäten aufweisen. Abb. 6.5 soll diesen Verlauf verdeutlichen, der für unbehandelte, aber auch für Inositol-C2-PAF- oder HePC-behandelte HaCaT-Zellen gezeigt ist. Die roten Pfeile indizieren die jeweilige Zellzyklusphase für unbehandelte Kontrollzellen.

HaCaT-Zellen



SCC-25-Zellen

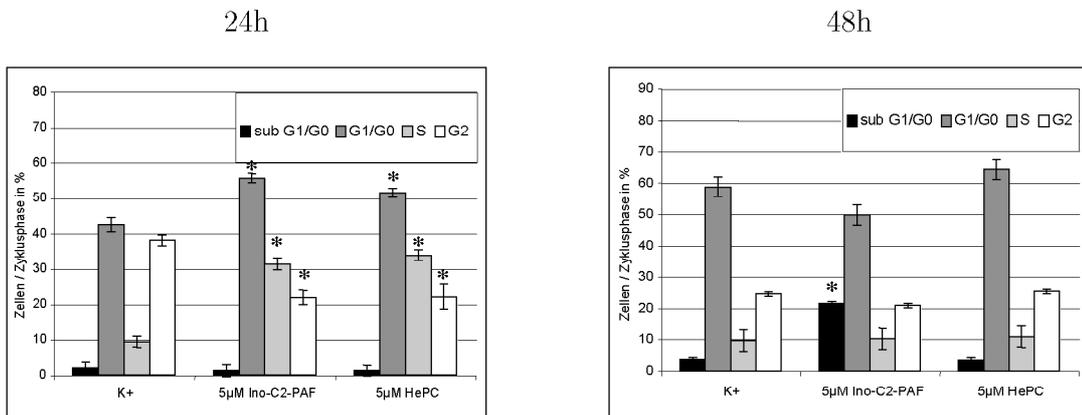


Abbildung 6.6: Einfluss der Analoga auf den Zellzyklus von HaCaT- und SCC-25-Zellen
 HaCaT- oder SCC-25-Zellen werden zu $2,5 \times 10^6$ Zellen/10cm Ø Schale ausgesät und für 2d in Keratinozyten-Wachstumsmedium kultiviert. Nach der Inkubation (24h bzw. 48h) mit Inositol-C2-PAF oder HePC (je $5 \mu M$) werden die Zellen mit $1 mL$ 70%igem Ethanol über Nacht bei $-20^\circ C$ fixiert und permeabilisiert. Nach dem Waschen mit PBS wird das Pellet mit $500 \mu L$ Propidiumiodid-Mix über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Der Mix enthält $10 \mu g/mL$ Propidiumiodid, $10 \mu g/mL$ DNase freie RNase und $2 mM$ EDTA. Die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils 20.000 Zellen ausgewertet.

Eine 24stündige Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF führt zu Veränderungen im Zellzyklus (Abb. 6.6, oben links). Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Keratinozyten-Wachstumsmedium inkubiert wurden. Die sub G1/G0-Phase wird von 3% auf 6% und die G1/G0-Phase von 60% auf 70% erhöht. Dahingegen wird die S-Phase von 30% auf 15% und die G2-Phase um 6% erniedrigt. Aber diese Ergebnisse weisen keine statis-

tische Signifikanz bei $\alpha=0,05$ auf. Bei der Inkubation mit HePC wird die sub G1/G0-Phase von 3% auf 15% gesteigert (Signifikanz bei $\alpha=0,05$, indiziert mit *). Die G1/G0-Phase wird von 60% auf 50% und die S-Phase von 30% auf 18% vermindert, wohingegen die G2-Phase um 11% erhöht wird. Auch diese Ergebnisse weisen keine statistische Signifikanz bei $\alpha=0,05$ auf.

Verlängert man die Inkubationszeit auf 48h (Abb. 6.6, oben rechts), führt die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer Erhöhung der sub G1/G0-Phase um 292%. Dahingegen werden die G1/G0-Phase nur um 2%, die S-Phase um 10% und die G2-Phase um 13% vermindert. Diese Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant ($\alpha=0,05$). Trotzdem beträgt der Anteil apoptotischer Zellen an der gesamten Zellpopulation bei den mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen nur 20%. Bei der Inkubation mit HePC steigt die sub G1/G0-Phase signifikant von 6% auf 37%. Die G1/G0-Phase wird um 28%, die S-Phase um 50% und die G2-Phase um 17% gesenkt. Auch diese Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant ($\alpha=0,05$). Der Anteil apoptotischer Zellen an der gesamten Zellpopulation steigt auf circa 40%. Die signifikanten Ergebnisse sind mit * gekennzeichnet.

Auch bei der Inkubation von SCC-25-Zellen zeigt sich, dass weder Inositol-C2-PAF noch HePC innerhalb von 24h Apoptose auslösen. In SCC-25-Zellen ist jedoch ein deutlicher Einfluss auf die Zellzyklusverteilung zu sehen, es kommt durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einem Anstieg der Zellen in den Phasen G1/G0 um 33%. Der Anteil der S-Phase steigt von 9% auf 31%, bei gleichzeitiger Abnahme der Zellen aus der G2-Phase von 38% auf 22%. Innerhalb dieses Zeitraums löst Inositol-C2-PAF keine apoptotischen Prozesse aus. Die Inkubation mit HePC führt dazu, dass die G1/G0-Phase um 21% und die S-Phase von ebenfalls von 9% auf 31% gesteigert wird, die G2-Phase um 12% gesenkt (Abb. 6.6, unten links).

Bei Verlängerung der Inkubation auf 48h zeigen sich deutliche Unterschiede. Die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zeigt, dass die apoptotische Zellpopulation signifikant von 3% auf 21% ansteigt, wohingegen die G1/G0-Population um 15% und die G2-Population um 13% erniedrigt ist. Hierbei ist nur der Anstieg der sub G1/G0-Phase statistisch signifikant ($\alpha=0,05$). Der Anteil apoptotischer Zellen an der gesamten Zellpopulation beträgt auch hier nur 20% (Abb. 6.6, unten rechts). Die Inkubation mit HePC löst keine apoptotischen Prozesse aus und die Zellzyklusverteilung ist ähnlich der von unbehandelten Kontrollzellen. Die signifikanten Ergebnisse sind mit einem * gekennzeichnet.

6.1.4 Einfluss auf die integrinabhängige Zell-Matrix-Adhäsion

Die Fähigkeit zur Interaktion mit den extrazellulären Matrixproteinen der Basalmembran bestimmt entscheidend die Morphologie, die Viabilität und die Differenzierungsfähigkeit von Keratinozyten. Die Bindung an die extrazelluläre Matrix wird durch Integrine vermittelt. Dabei handelt es sich um oberflächenständige Heterodimere, die durch Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix die oben genannten Prozesse entscheidend beeinflussen können. Die Basalmembran wird in folgende Schichten unterteilt: *Basalzell-Plasmamembran*, *Lamina lucida*, *Lamina densa* und *sub-Lamina densa Fibrillen*. Fibronektin und Laminin sind spezifische Bestandteile der *Lamina lucida*, wohingegen Collagen IV spezifisch für die *Lamina densa* ist (McMillan et al., 2003).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die synthetischen Phospholipid-Analoga integrinabhängige Prozesse zu modulieren vermögen. Dazu werden die behandelten HaCaT-Zellen auf Fibronektin, Laminin oder Collagen IV ausgebracht. Die Stärke der Adhäsion wird durch Färbung der adhärenen Zellen mit Kristallviolett bestimmt. Um die Effekte elektrostatischer und integrinunabhängiger Wechselwirkungen zwischen den Zellen und den Matrixproteinen auszuschließen, wurde die Adhäsion der Zellen auf Poly-L-Lysin gemessen. Poly-L-Lysin ist eine unphysiologische Matrix, die viele positive Ladungen trägt.

Eine 2stündige Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF führt zu einer deutlichen Steigerung der integrinabhängigen Matrixadhäsion. Am deutlichsten ausgeprägt ist dieser Effekt auf Laminin mit einer Adhäsionssteigerung um 60% bei $5\mu M$. Auf den Matrices Collagen IV und Fibronektin führen $2,5\mu M$ Inositol-C2-PAF zu einer maximalen Steigerung der Adhäsion um 50% bzw. 30% (Abb. 6.7, oben links). Verlängert man den Inkubationszeitraum auf 24h, so ist die generelle Adhäsion auf Collagen IV und Fibronektin im Vergleich zur Adhäsion nach 2h verringert. Aber $2,5\mu M$ Inositol-C2-PAF führt trotzdem zu einer Steigerung der Adhäsion um 25% auf Collagen IV bzw. 12% auf Fibronektin. Auf Laminin unterscheiden sich die einzelnen Konzentrationen nicht (Abb. 6.7, oben rechts). Bei der 48stündigen Inkubation ist eine maximale Steigerung der Adhäsion auf Collagen IV bei $2,5\mu M$ mit 80% erreicht. Auf den Matrices Fibronektin und auf Laminin wird die Adhäsion um 57% bzw. um 48% gesteigert. Die integrinunabhängige Adhäsion auf Poly-L-Lysin wird dahingegen nicht beeinflusst (Abb. 6.7, unten links).

Inositol-C2-PAF/HaCaT-Zellen

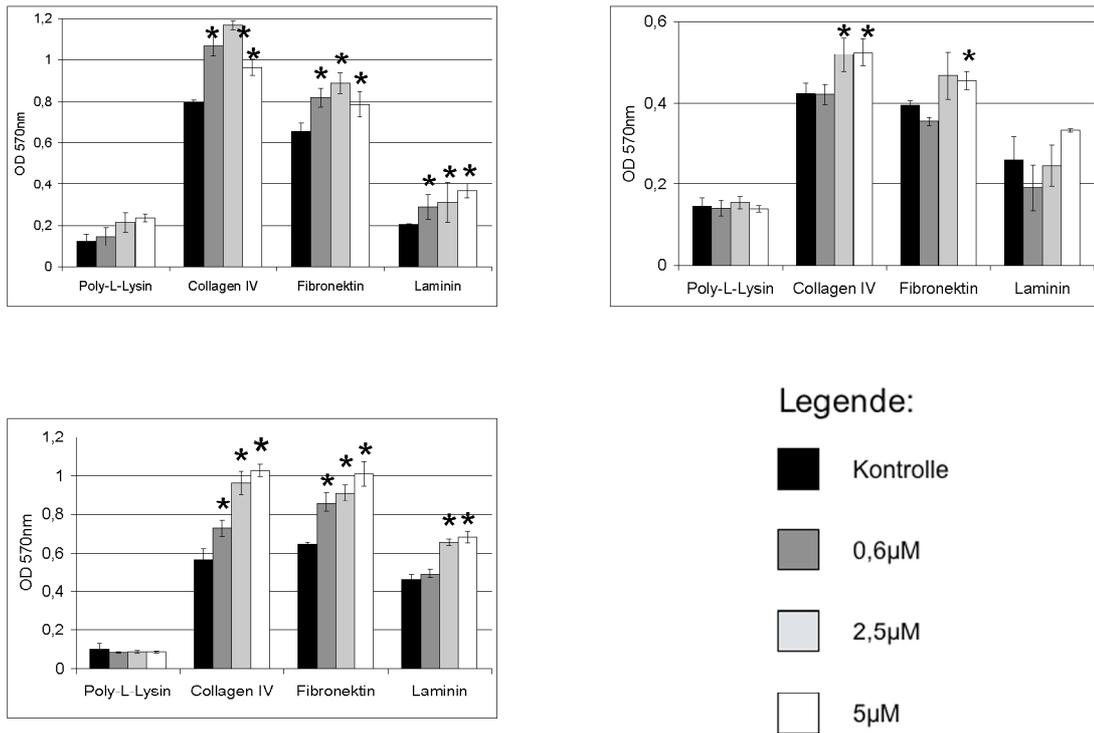


Abbildung 6.7: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Adhäsion von HaCaT-Zellen
 Nach Beendigung der Inkubation mit dem indizierten Phospholipid wird mit PBS gewaschen und für 2h mit serumfreiem Keratinozytenmedium inkubiert. 5×10^4 Zellen/96Well werden auf die mit Matrixproteinen vorbeschichteten Wells ausgesät. Für gleichmäßige Adhäsionsbedingungen wird die 96Well-Platte 15min bei 4°C und anschließend 90min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen und Fixieren werden die Zellen mit einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nach dem anschließenden Waschen wird die Platte für 5-6h mit einer 0,5%igen Triton X-100 Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgt photometrisch am ELISA-Reader bei 570nm. Es wurden mindestens drei unabhängige Tests mit jeweils vierfach Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterscheiden.

Nach 2stündiger Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC zeigt sich nur auf der Matrix Collagen IV eine geringfügige Steigerung der Adhäsion um 12%. Auf die Adhäsion der Zellen auf den Matrices Fibronektin und Laminin hat die Inkubation mit HePC keinen Einfluß (Abb. 6.8, oben links). Bei Verlängerung der Inkubation auf 24h nimmt HePC nur Einfluss auf die Adhäsion auf Fibronektin, diese wird um 10% gesteigert, sowohl die Adhäsion auf Collagen IV als auch auf Laminin bleibt unbeeinflusst (Abb. 6.8, oben rechts). Ein deutlicher Einfluss auf das Adhäsionsverhalten zeigt sich erst nach 48stündiger Inkubation. Am geringsten ausgeprägt ist der Effekt auf Collagen IV, die Steigerung beträgt hier 15%. Auf Fibronektin ist die Adhäsion um 37% verstärkt. Mit einer Steigerung von 310% ist der Einfluss auf die Adhäsion auf Laminin am deutlichsten zu sehen. Auch bei der Inkubation mit HePC ist die Konzentration von $2,5\mu M$ diejenige, die die deutlichste Steigerung der Adhäsion auslöst (Abb. 6.8, unten links).

HePC/HaCaT-Zellen

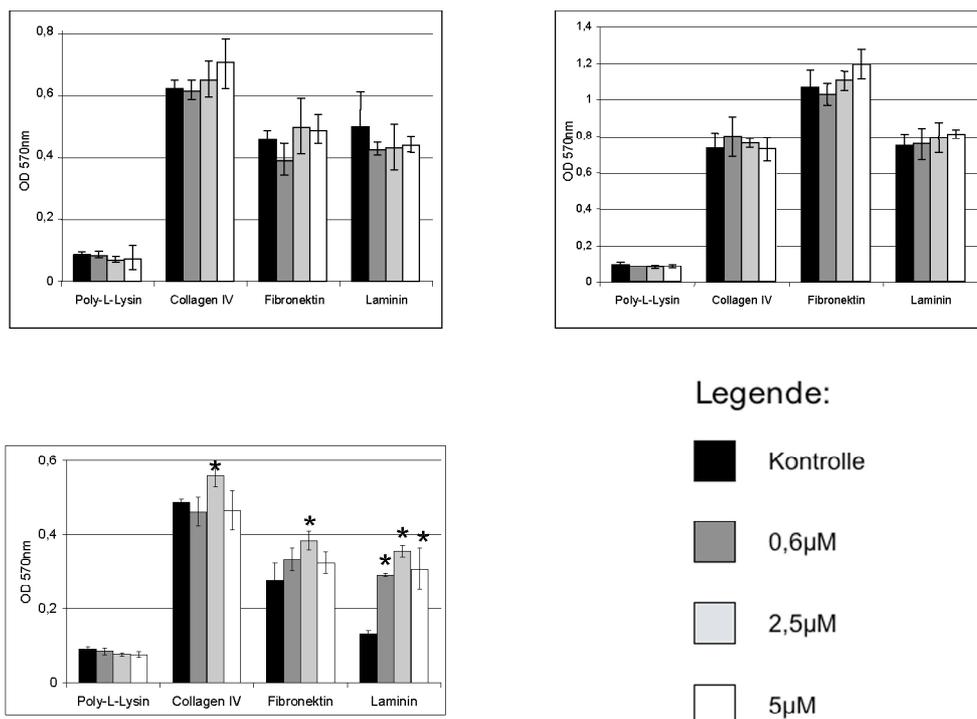


Abbildung 6.8: Einfluss von HePC auf die Adhäsion von HaCaT-Zellen
 Es wurden mindestens drei unabhängige Tests mit jeweils vierfach Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterschieden.

Im Gegensatz zur Inkubation von HaCaT-Zellen bleiben SCC-25-Zellen durch eine 2stündige Inkubation mit Inositol-C2-PAF in ihrer integrinabhängigen Matrixadhäsion unbeeinflusst. Die Integrin-unabhängige Adhäsion auf Poly-L-Lysin ist im Gegensatz zu HaCaT-Zellen erhöht, wird aber nicht durch Inositol-C2-PAF beeinflusst (Abb. 6.9, oben links). Verlängert sich die Inkubation auf 24h, kommt es bei Konzentrationen von $0,6\mu M$ Inositol-C2-PAF zur Erhöhung der Adhäsion auf Collagen IV um 32% und auf Fibronektin um 19%. Gleichzeitig wird die Adhäsion auf Laminin nicht beeinflusst. Bei der Inkubation mit $5\mu M$ Inositol-C2-PAF nimmt die Adhäsion auf Collagen IV, Fibronektin und Laminin um 41%, 32% bzw. 42% ab (Abb. 6.9, oben rechts). Nach 48h sieht man, dass die Adhäsion auf Laminin um 60% steigt und der zytotoxische Effekt bleibt erhalten (Abb. 6.9, unten links).

Inositol-C2-PAF/SCC-25-Zellen

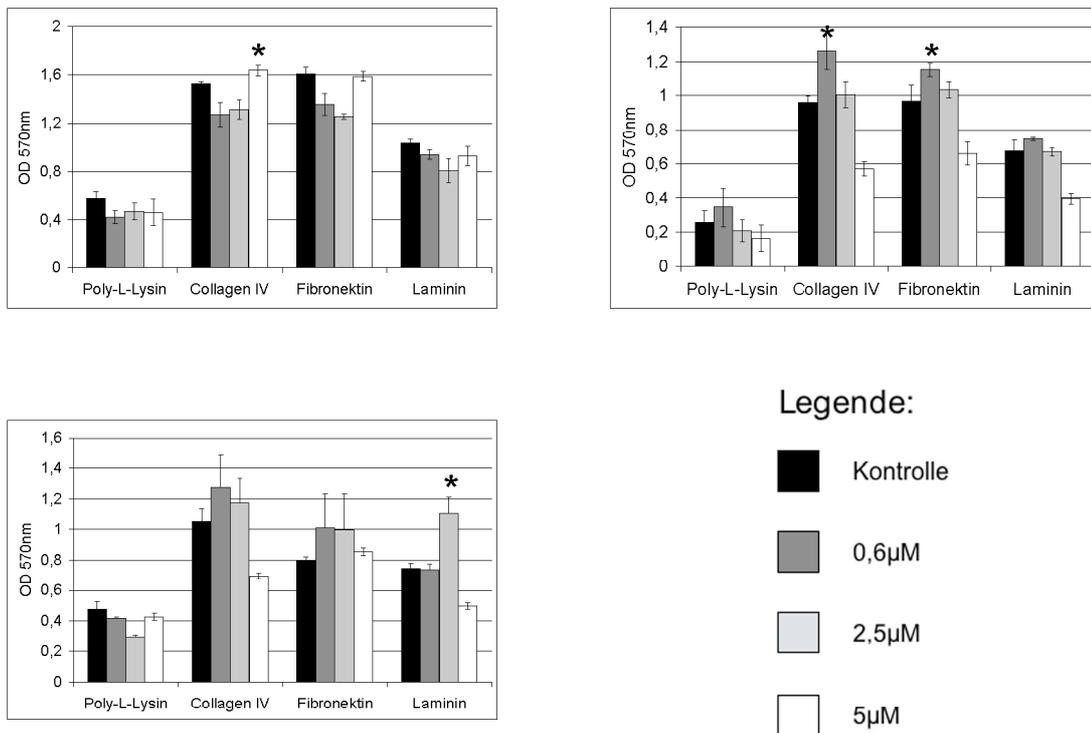


Abbildung 6.9: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Adhäsion von SCC-25-Zellen
 Es wurden mindestens drei unabhängige Tests mit jeweils vierfach Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterschieden.

Durch eine 2stündige bzw. 24stündige Inkubation mit HePC lässt sich die Zell-Matrix-Adhäsion von SCC-25-Zellen nicht beeinflussen (Abb. 6.10, oben links bzw. rechts). Nach 48h sieht man, dass nur auf Fibronektin die Adhäsion um 20% gesteigert werden kann, auch hier ist die Konzentration von $2,5\mu M$ diejenige, die die deutlichsten Effekte hervorruft (Abb. 6.10, unten links). Die Zell-Matrix-Adhäsion auf Collagen IV und Laminin bleibt unbeeinflusst.

HePC/SCC-25-Zellen

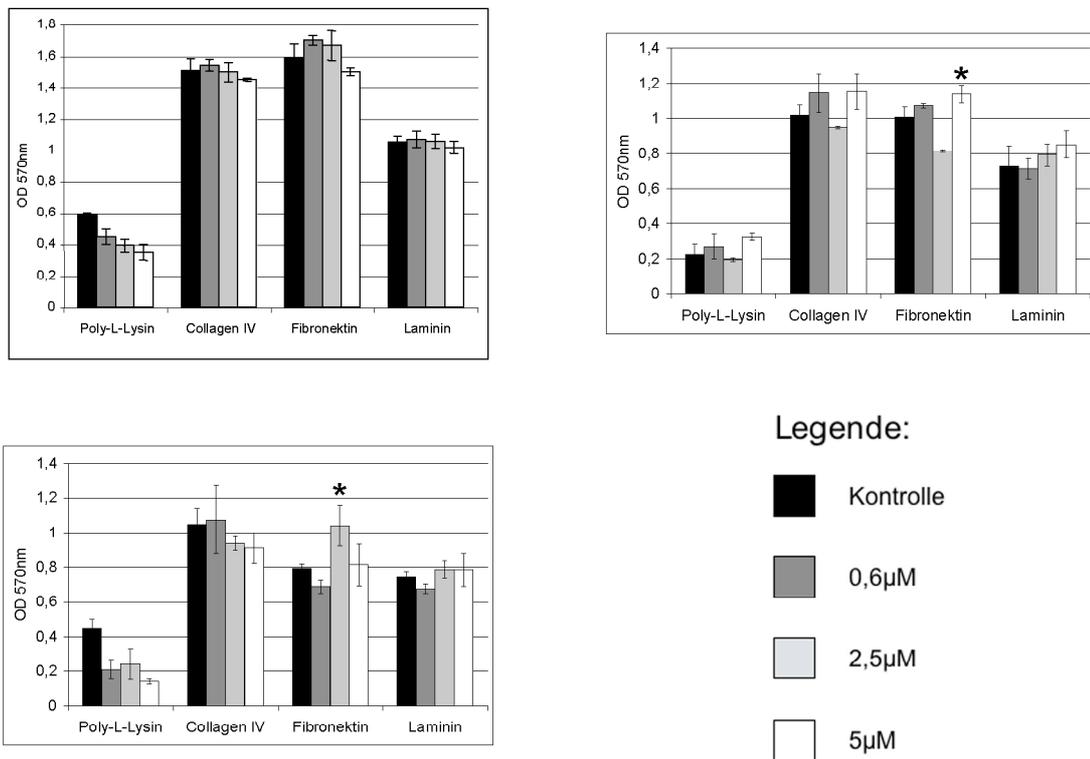


Abbildung 6.10: Einfluss von HePC auf die Adhäsion von SCC-25-Zellen

Es wurden mindestens drei unabhängige Tests mit jeweils vierfach Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterschieden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Inositol-C2-PAF schon nach kurzer Stimulation die Adhäsion von HaCaT-Zellen auf den Matrices Collagen IV, Fibronectin und Laminin verstärkt, wohingegen dieser Effekt bei der Inkubation mit HePC erst nach 48h auftritt. Die Konzentration, die die maximale Adhäsionssteigerung auslöst, ist jeweils $2,5\mu M$. Die Steigerung der Zell-Matrix-Adhäsion durch die Phospholipidanaloga ist in SCC-25-Zellen geringer ausgeprägt. Wobei HePC nur nach 48h Inkubation in der Lage ist, die Adhäsion auf Fibronectin zu steigern (Tab. 6.1).

Tabelle 6.1: Einfluss auf die Adhäsion nach 48h Inkubation

Adhäsion bei $2,5\mu M$	auf Collagen IV	auf Fibronectin	auf Laminin
HaCaT/Inositol-C2-PAF	71%	38%	47%
HaCaT/HePC	16%	40%	310%
SCC-25/Inositol-C2-PAF	-	-	50%
SCC-25/HePC	-	26%	-

6.1.5 Einfluss auf die Zell-Migration

Die Migration von Zellen spielt eine wichtige Rolle für viele physiologische Vorgänge wie Embryogenese, Neurogenese oder die Transmigration von Leukozyten zu Entzündungsherden. Für Keratinozyten ist die Migrationsfähigkeit besonders für die Wundheilung von Bedeutung (Entschladen et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob die Phospholipidanaloga die Migration beeinflussen, wurden Transwell-Migrationsassays durchgeführt. Dabei sind die Zellen von der Collagen IV-Matrix durch eine Membran mit definierter Porengröße getrennt. Nach einer bestimmten Migrationsdauer werden die Zellen, die entlang eines Collagen IV-Gradienten durch die Membran gewandert sind, fixiert, Kristallviolett gefärbt und ausgewertet.

Um eine optimale Migrationsdauer zu bestimmen, wurden HaCaT-Zellen 2h mit $2,5\mu M$ Inositol-C2-PAF inkubiert. Daran schlossen sich drei unterschiedlich lange Zeiten der Migration (6h, 18h und 24h) an. Durch Inositol-C2-PAF erfolgt eine Hemmung der Migration, die mit zunehmender Migrationsdauer deutlicher wird (Abb. 6.11). Bei einer Migrationsdauer von 6h wird die Migration um 14% gehemmt und bei einer Migrationsdauer von 24h um 37%.

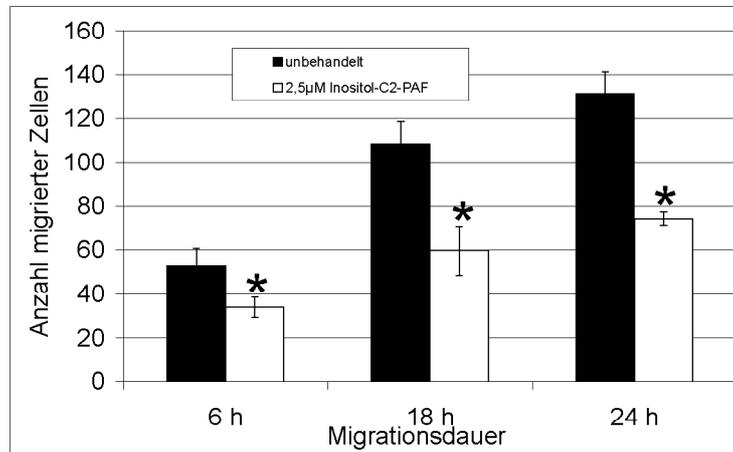


Abbildung 6.11: Einfluss der Migrationsdauer auf die Migration von HaCaT-Zellen

Die Unterseite des Filters wird mit $50\mu\text{L}$ Collagen IV/PBS ($20\mu\text{g}/\text{mL}$) beschichtet. In die Außenkammer der Filterkammer werden $500\mu\text{L}$ serumfreies Keratinozytenmedium vorgelegt, 5×10^4 Zellen/Transwell-Filter werden in die Filterinnenkammer pipettiert und für 6h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Migrationszeit wird mit einem Wattestäbchen vorsichtig die Innenseite des Filters abgerieben, danach werden die Zellen in $500\mu\text{L}$ einer 3,8%iger PFA-Lösung mit 0,025% Saponin fixiert und permeabilisiert. Nach dem Waschen wird 30min in $500\mu\text{L}$ 0,1%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nach dem abschließenden Waschen werden 4 Felder des Filters am Mikroskop bei 20facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von den jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen unterscheiden.

In Anlehnung an die in Abb. 6.11 beschriebenen Versuche, wurde als nächstes der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Migrationsfähigkeit untersucht. Abb. 6.12 zeigt den Effekt der Stimulation mit Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Migration von HaCaT-Zellen nach 6stündiger Migration. Bei einer Inkubationszeit von 2h hemmt Inositol-C2-PAF die Migration stärker als HePC. Die Hemmung der Migration durch Inositol-C2-PAF ist bei der kürzeren Inkubationszeit von 2h deutlicher ausgeprägt als bei längeren Inkubationszeiten von 48h. Gegenläufig verhält sich die Inkubation mit HePC, bei Verlängerung der Inkubation zeigt sich, dass HePC die Migration stärker hemmt als Inositol-C2-PAF und dass die Verlängerung der Inkubationszeit mit einer Verstärkung des anti-migratorischen Effekts einhergeht.

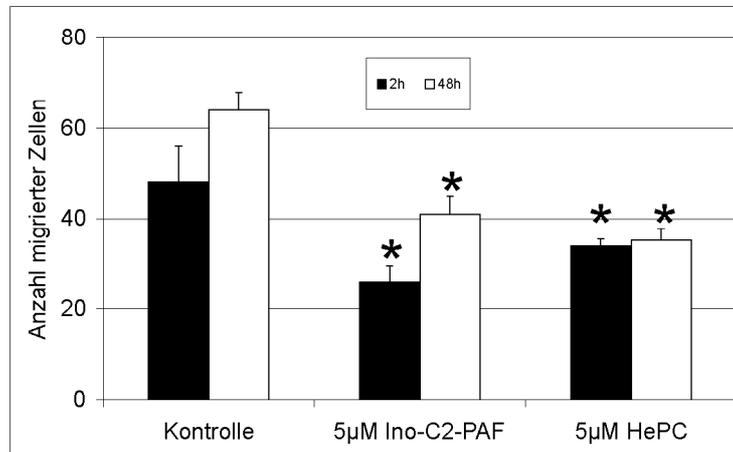


Abbildung 6.12: Einfluss von Inositol-C2-PAF und HePC auf die Migration von HaCaT-Zellen

Es wurden mindestens vier unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von unbehandelten Kontrollzellen unterschieden.

Abschließend sind die Ergebnisse der Migrationsstudien mit HaCaT-Zellen nochmals in einer Tabelle zusammengefasst (s. Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Hemmung der Migration von HaCaT-Zellen

Stimulationsdauer (h)	5µM Inositol-C2-PAF	5µM HePC
2	-48%	-32%
48	-30%	-50%

Es wurde auch die haptotaktische Migration entlang eines Laminin-Gradienten untersucht. Aber es zeigte sich, dass ein Laminin-Gradient HaCaT-Zellen innerhalb der getesteten Zeiträume nicht zur Migration stimuliert (Daten nicht gezeigt).

Bei der Inkubation von SCC-25-Zellen mit Inositol-C2-PAF erfolgt eine gleichbleibende Hemmung der Zell-Migration um jeweils circa 25%. HePC vermindert die Zell-Migration von SCC-25-Zellen nicht signifikant (Abb. 6.13).

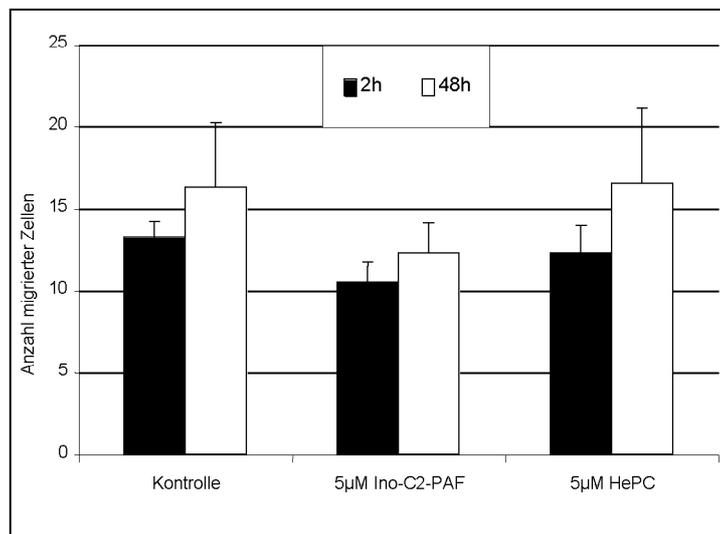


Abbildung 6.13: Einfluss von Inositol-C2-PAF und HePC auf die Migrationsfähigkeit von SCC-25-Zellen

Es wurden mindestens vier unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Mittelwerte bestimmt.

Die Tabelle 6.3 fasst diese Ergebnisse noch einmal zusammen.

Tabelle 6.3: Hemmung der Migration von SCC-25-Zellen

Stimulationsdauer (h)	5µM Inositol-C2-PAF	5µM HePC
2	-23%	-8%
48	-25%	-

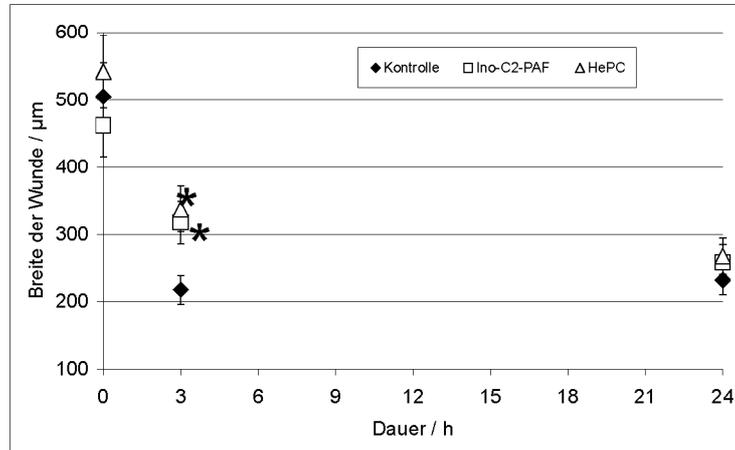


Abbildung 6.14: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen

Es wurden vier unabhängige Versuche mit je zwei Wunden pro Ansatz durchgeführt. Von jeder Wunde wurden 3 Distanzen der Wundbreite ausgemessen. Davon wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen, zum jeweiligen Zeitpunkt, unterscheiden.

Wundheilungs-Assays stellen ein Modell für die *in vitro* Migration von Keratinozyten dar. Dafür lösen die Keratinozyten ihre stabile Verbindung zur Basalmembran auf und migrieren über eine provisorische, Laminin-5-reiche Matrix, um die Wunde zu verschließen (Zhang und Kramer, 1996; O’Toole et al., 1997).

Um einen Einfluss der Phospholipidanaloga auf diesen Vorgang zu untersuchen, werden HaCaT-Zellen so kultiviert, dass sich eine geschlossene Zellschicht bildet. Diese Zellschicht wird anschließend verwundet und die Zellen beim Verschließen dieser Wunde überwacht.

Abb. 6.14 verdeutlicht noch einmal die migrations-verzögernden Eigenschaften von Inositol-C2-PAF und HePC. Während unbehandelte Kontrollzellen die Wunde schon nach 3h zu 57% geschlossen haben, beträgt die Wundheilung in Inositol-C2-PAF behandelten Zellen nur 31% und in HePC behandelten Zellen nur 48%. Eine Verlängerung des Inkubationszeitraums hat auf die Migrationsrate unbehalteter Kontrollzellen keinen Einfluss. Die Inkubation mit Inositol-C2-PAF jedoch verzögert den weiteren Verschluss der Wunde deutlich. Nach 24h ist die Wunde nur zu 42% geschlossen, wohingegen HePC-behandelte Zellen die Wunde ähnlich wie Kontrollzellen bereits zu 52% geschlossen haben.

Abbildung 6.15 zeigt den Fortschritt der Wundheilung von HaCaT-Zellen auf einer Collagen IV Matrix nach 3h. Die Zellen wurden mit $5\mu M$ Inositol-C2-PAF oder $5\mu M$ HePC inkubiert. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff H0 gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In den Wunden, die mit den Phospholipidanaloga behandelt wurden, befinden sich deutlich weniger Zellen, die aktiv in die Wunde hinein migriert sind.

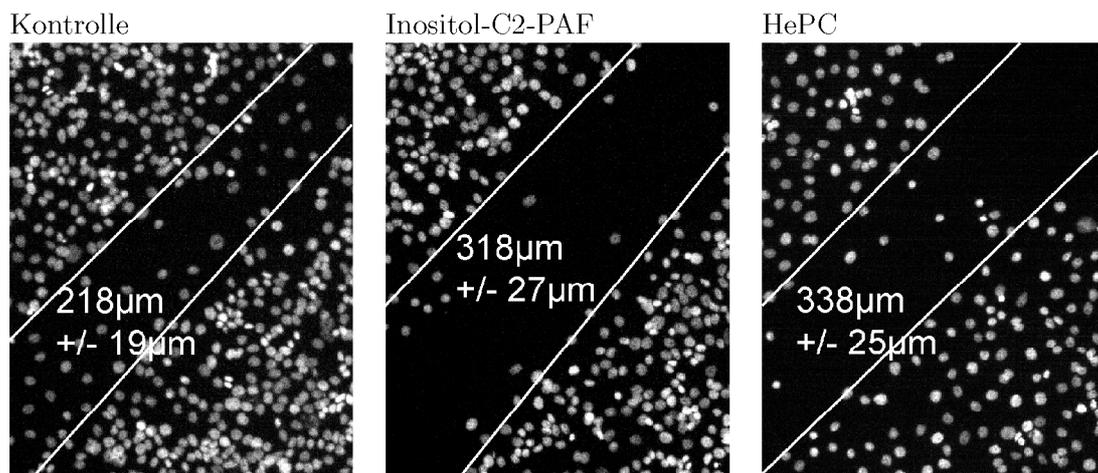


Abbildung 6.15: Wundheilung von HaCaT-Zellen nach 3h

Es wurden vier unabhängige Versuche mit je zwei Wunden pro Ansatz durchgeführt. Von jeder Wunde wurden 3 Distanzen der Wundbreite ausgemessen. Davon wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der Kernfärbung bei 11,6facher Vergrößerung.

6.1.6 Einfluss auf die Verteilung der Integrinuntereinheiten auf der Zelloberfläche

Über Veränderungen der Verteilung oder der Expression von Integrinen kann sowohl die

Zell-Adhäsion wie auch die Zell-Migration reguliert werden.

Um zu überprüfen, ob durch die Inkubation mit den Phospholipiden die Oberflächenverteilung der Integrine beeinflusst wird, werden die Zellen mit verschiedenen, spezifischen anti-Integrin-Antikörpern markiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse am FACS-Gerät ausgewertet.

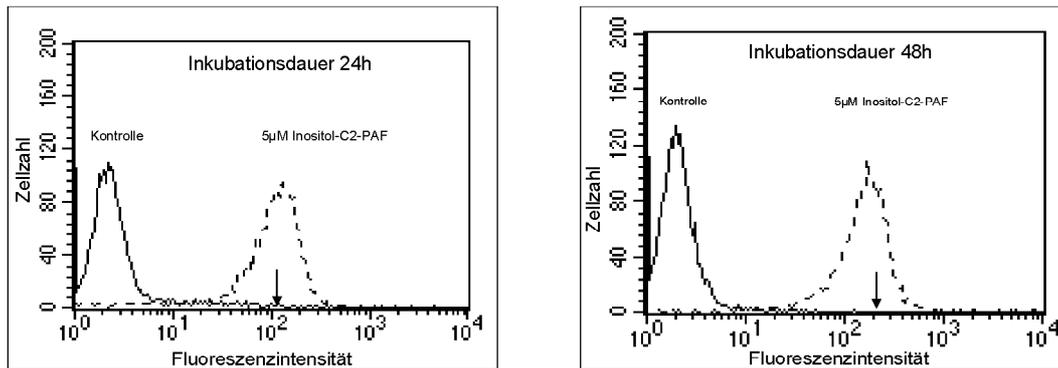


Abbildung 6.16: FACS-Analyse der Oberflächenexpression der β_1 -Integrinuntereinheit auf HaCaT-Zellen nach 24h und 48h Inkubation mit Inositol-C2-PAF

Um Serumartefakte zu vermeiden, wird nach Beendigung der Inkubation mit dem indizierten Phospholipidanalogon mit PBS gewaschen und für 2h mit serumfreiem Keratinozytenmedium inkubiert. Die Zellen werden mit 1xTrypsin-Lösung abgelöst. 5×10^5 HaCaT-Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit dem jeweiligen anti-Integrin-Antikörper für 45min auf Eis inkubiert. Im Falle unkonjugierter Primärantikörper erfolgt eine zweite Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenz-gekoppelten Antikörper. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils 10^4 Zellen am FACS-Gerät ausgewertet.

Abb. 6.16 zeigt Originalhistogramme einer FACS-Analyse, die die Auswirkung der Inkubation mit Inositol-C2-PAF auf die β_1 -Integrinverteilung auf HaCaT-Zellen zeigen. Die Expression der β_1 -Integrinuntereinheit ist durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF unverändert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen, die mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert wurden, der Pfeil entlang der X-Achse zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle an. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden.

Die Expression der β_4 -Integrin-Untereinheit wird durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF erhöht, wie in Abb. 6.17 zu sehen ist. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen, die mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert wurden, der Pfeil entlang der X-Achse zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle an. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden.

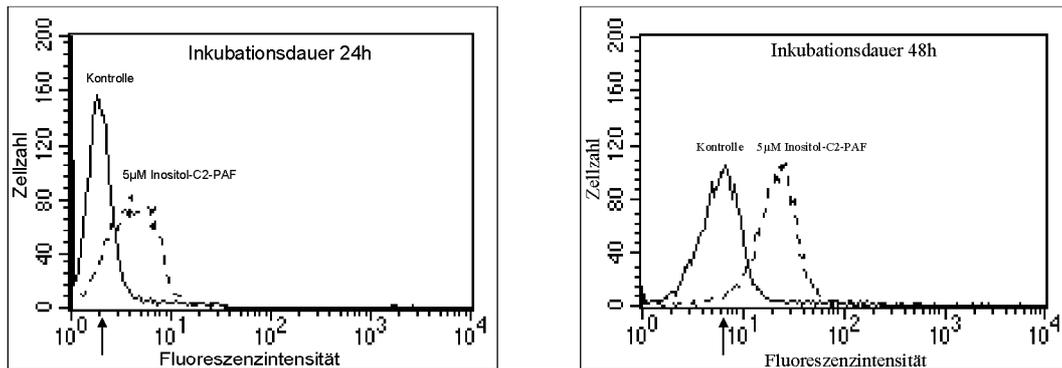


Abbildung 6.17: FACS-Analyse der Oberflächenexpression der β_4 -Integrinuntereinheit auf HaCaT-Zellen nach 24h bzw. 48h Inkubation mit Inositol-C2-PAF

Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils 10^4 Zellen am FACS-Gerät ausgewertet.

Für die folgenden Balkendiagramme wurde die mittlere Fluoreszenzintensität, die durch die Inkubation mit dem jeweiligen anti-Integrin-Primär- und Sekundärantikörpern erhalten wurde, unbehandelter Zellen gleich 100% gesetzt.

Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF führt zu einer steten Zunahme der α_6 -Integrin-Untereinheit um 75% und β_4 -Integrin-Untereinheit um 62%, wohingegen die Expression der α_3 -Integrin-Untereinheit mit zunehmender Inkubationszeit leicht erniedrigt wird. Zusammengefasst sind die Ergebnisse noch einmal in Abb. 6.18.

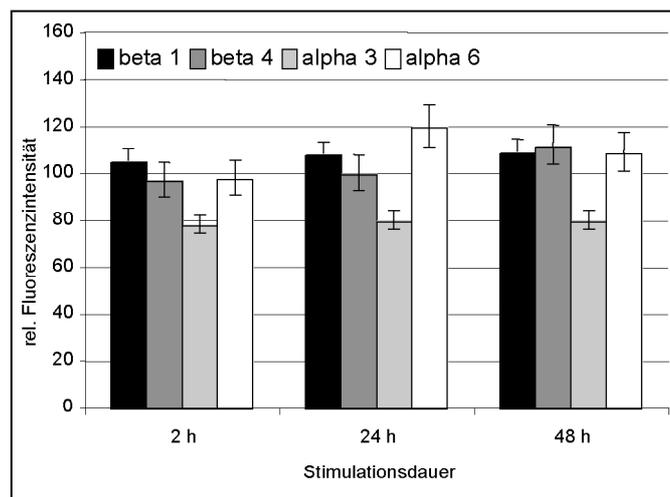
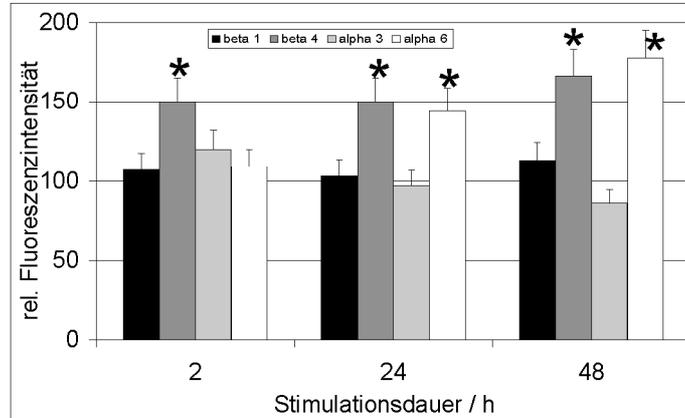


Abbildung 6.18: Einfluss von $5\mu M$ Inositol-C2-PAF (oben) oder $5\mu M$ HePC (unten) auf die Oberflächenexpression verschiedener Integrin-Untereinheiten in HaCaT-Zellen

Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils 10^4 Zellen am FACS-Gerät ausgewertet. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität und die Standardabweichung der Mittelwerte. Die mittlere Fluoreszenzintensität unbehandelter Kontrollzellen wurde jeweils auf 100% gesetzt. Mit einem * sind Ergebnisse indiziert, die sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen unterschieden.

HePC hat keinen Einfluss auf die Verteilung der β_1 - und β_4 -Integrin-Untereinheiten (Abb. 6.18). Die Expression der α_3 -Integrin-Untereinheit wird um 20% erniedrigt. Die Expression der α_6 -Integrin-Untereinheit ist nach 24h um 20% erhöht.

Um zu überprüfen, ob das veränderte Adhäsionsverhalten nach Stimulation mit den Phospholipidanaloga möglicherweise durch eine geänderte Verteilung der Integrine auf der Zelloberfläche herbeigeführt wird, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierfür werden HaCaT- oder SCC-25-Zellen auf Collagen IV ausplattiert und 24h bzw. 48h kultiviert. Nach dem Fixieren der Zellen wurde das Zytoskelett mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin und die β_1 -Integrinuntereinheit mit Hilfe eines spezifischen, Thiocyanat-markierten Antikörpers angefärbt.

Eine 24stündige Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF führt zum vermehrten „clustering“ der β_1 -Integrine und somit zur verstärkten Bildung der „fokalen Adhäsionen“. Nach 48h Inkubation ist dieser Effekt noch verstärkt. Außerdem zeigt sich ein Einfluss auf das Aktinzytoskelett. Inositol-C2-PAF stimulierte HaCaT-Zellen weisen kaum noch zelldurchspannende Aktinfasern auf. Im Gegenzug wird die Bildung kortikalen Aktins in der Zellperipherie gefördert (Abb. 6.19).

Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC hat einen geringeren Effekt auf das Aktinzytoskelett als Inositol-C2-PAF. Selbst nach 48 stündiger Inkubation sind in HaCaT-Zellen noch zelldurchspannende Aktinfasern zu beobachten. Auch HePC induziert ein vermehrtes „clustering“ der β_1 -Integrine (Abb. 6.20).