

anti- $\beta_1$ -Integrin-FITC

Phalloidin-TRITC

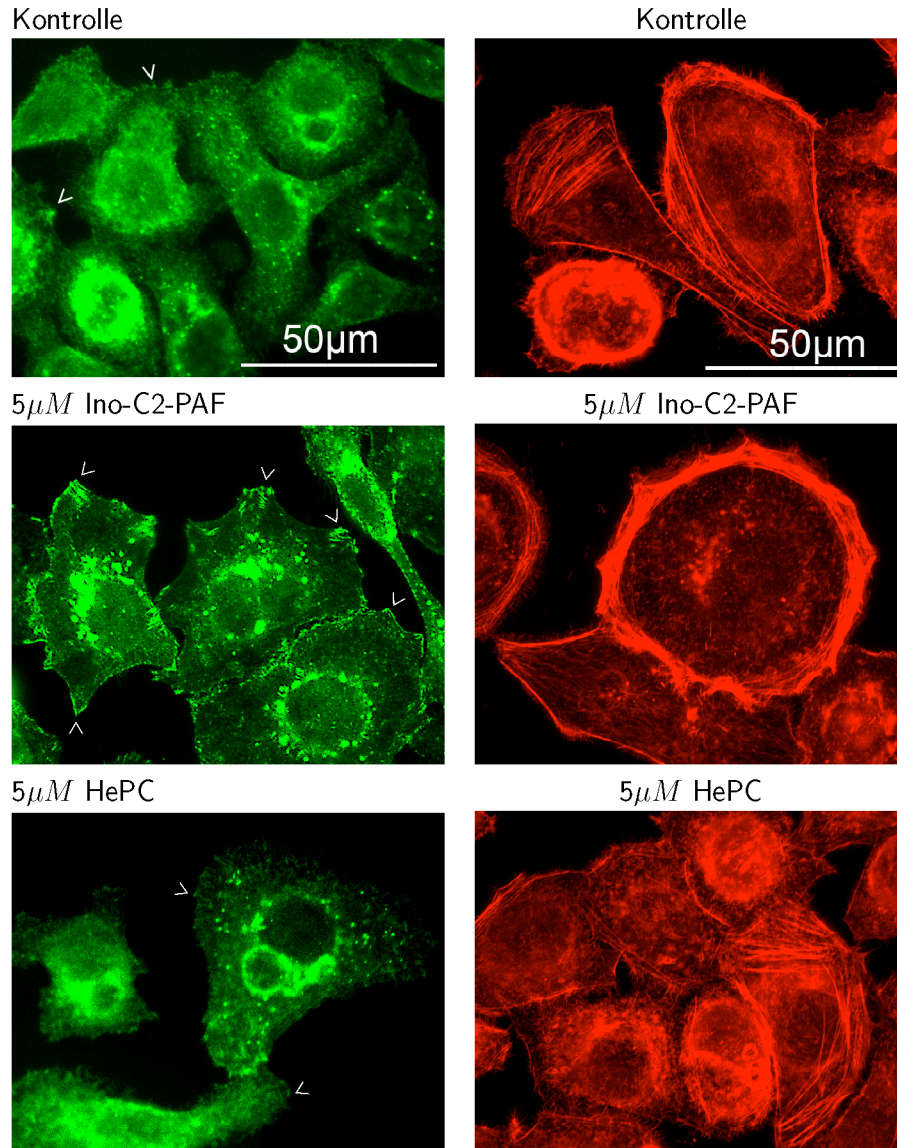


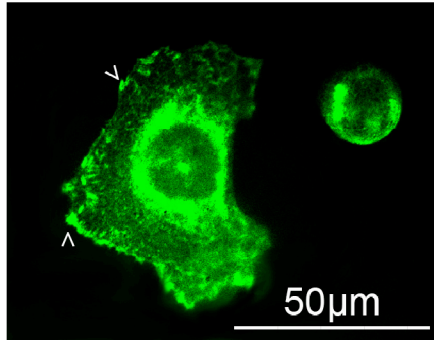
Abbildung 6.19: Immunfluoreszenzstudie mit HaCaT-Zellen auf Collagen IV nach 24h

5,5x10<sup>4</sup>Zellen/Well werden in 200  $\mu$ L Keratinozytenmedium für 90min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen wird die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mit dem spezifischen Antikörper K20-FITC gefärbt, diese Aufnahmen sind in der linken Spalte zu sehen. Das Zytoskelett wird Phalloidin-TRITC gefärbt und diese Aufnahmen sind in der rechten Spalte zu sehen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet. Die offenen Pfeile sind auf „fokale Adhäsionen“ gerichtet.

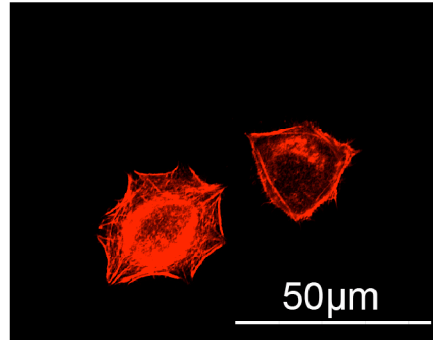
anti- $\beta_1$ -Integrin-FITC

Phalloidin-TRITC

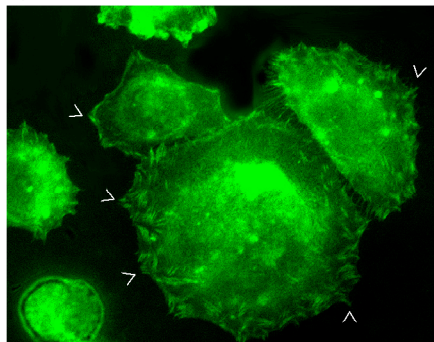
Kontrolle



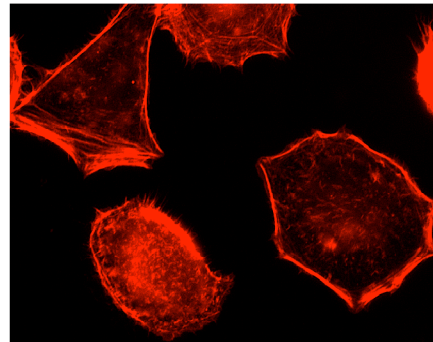
Kontrolle



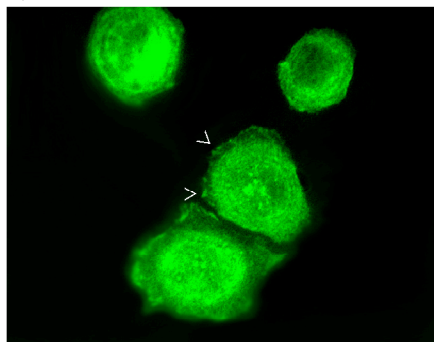
5  $\mu$ M Ino-C2-PAF



5  $\mu$ M Ino-C2-PAF



5  $\mu$ M HePC



5  $\mu$ M HePC

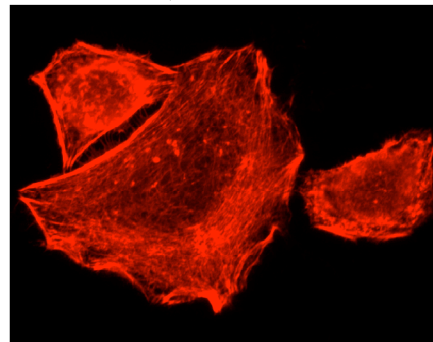


Abbildung 6.20: Immunfluoreszenzstudie mit HaCaT-Zellen auf Collagen IV nach 48h

5,5x10<sup>4</sup>Zellen/Well werden in 200  $\mu$ L Keratinozytenmedium für 90min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen wird die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mit dem spezifischen Antikörper K20-FITC gefärbt, diese Aufnahmen sind in der linken Spalte zu sehen. Das Zytoskelett wird Phalloidin-TRITC gefärbt und diese Aufnahmen sind in der rechten Spalte zu sehen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet. Die offenen Pfeile sind auf „fokale Adhäsionen“ gerichtet.

Inositol-C2-PAF hat bei der Inkubation von SCC-25-Zellen keinen Einfluss auf die oberflächenständige Verteilung der  $\beta_1$ -,  $\beta_4$ - und  $\alpha_3$ -Integrin-Untereinheiten innerhalb der ersten 24h. Die Expression der  $\alpha_6$ -Integrin-Untereinheit wird nach 48stündiger Inkubation um 30% erhöht (Abb. 6.21, oben). Die Inkubation mit HePC zeigt auch keinen Einfluss auf die Expression der getesteten Integrin-Untereinheiten, mit Ausnahme der Expression der  $\alpha_6$ -Integrinuntereinheit, die um 75% erhöht ist (Abb. 6.21, unten).

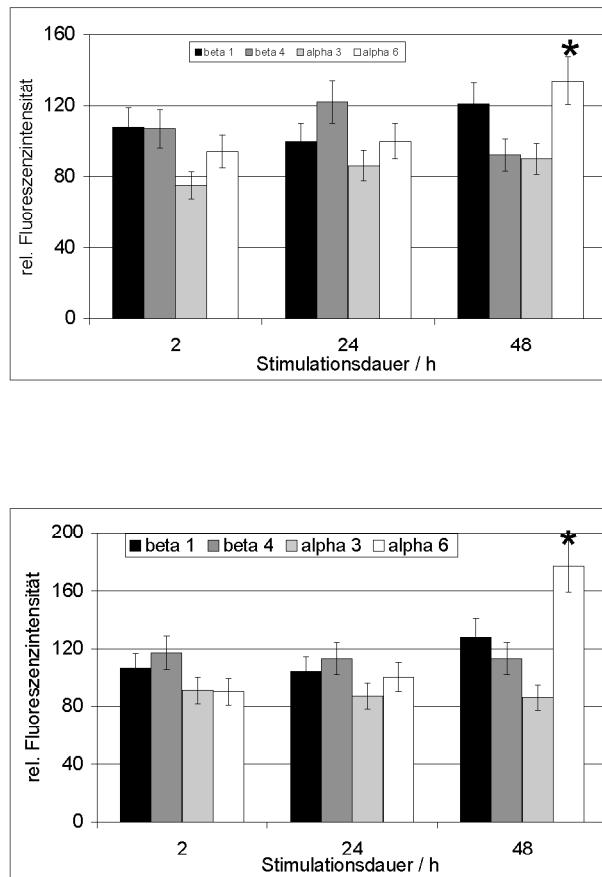


Abbildung 6.21: Einfluss von  $5\mu M$  Inositol-C2-PAF (oben) oder  $5\mu M$  HePC (unten) auf die Oberflächenexpression verschiedener Integrin-Untereinheiten in SCC-25-Zellen

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 unterscheiden.

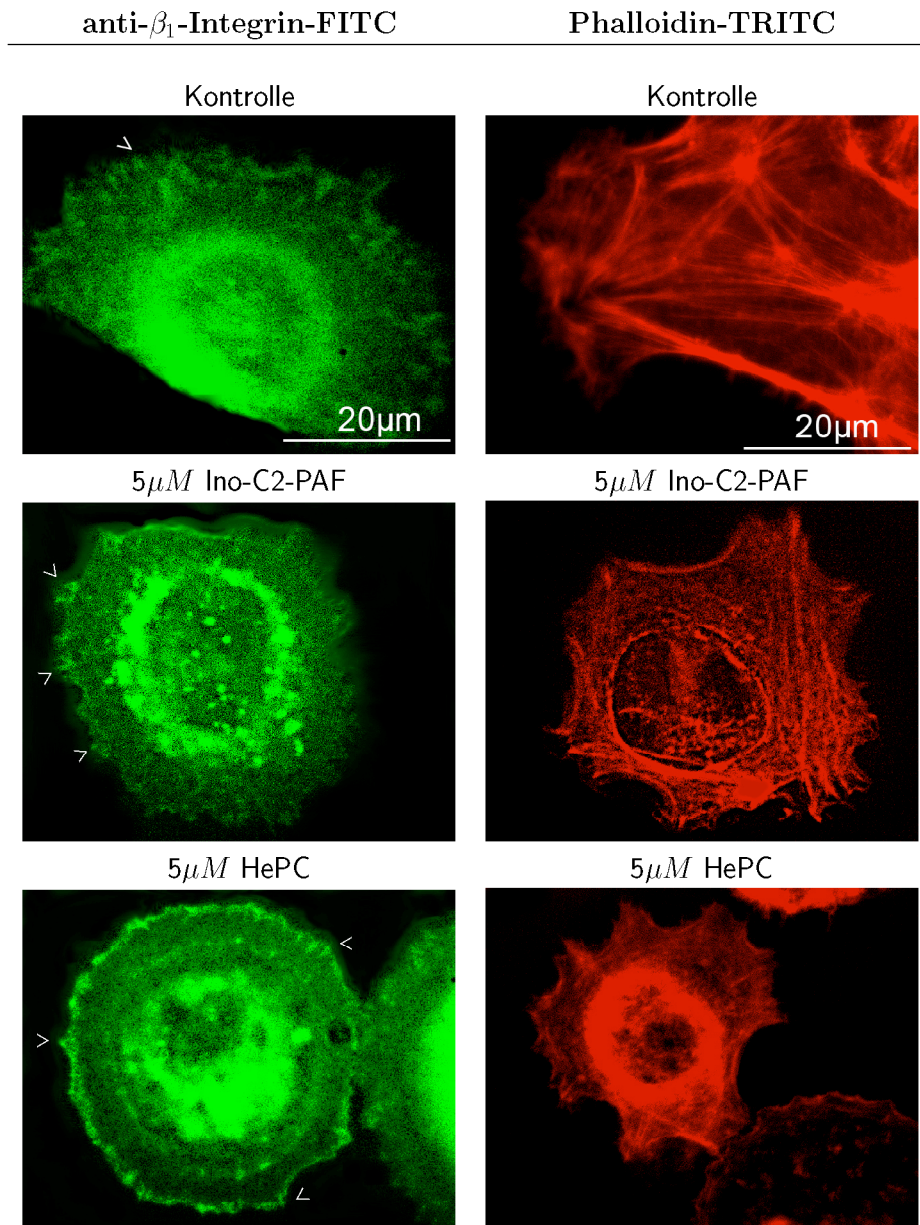


Abbildung 6.22: Immunfluoreszenzstudie mit SCC-25-Zellen auf Collagen IV nach 24h

5,5x10<sup>4</sup>Zellen/Well werden in 200 $\mu$ L Keratinozytenmedium für 90min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen wird die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mit dem spezifischen Antikörper K20-FITC gefärbt, diese Aufnahmen sind in der linken Spalte zu sehen. Das Zytoskelett wird Phalloidin-TRITC gefärbt und diese Aufnahmen sind in der rechten Spalte zu sehen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet. Die offenen Pfeile sind auf „fokale Adhäsionen“ gerichtet.

anti- $\beta_1$ -Integrin-FITC

Phalloidin-TRITC

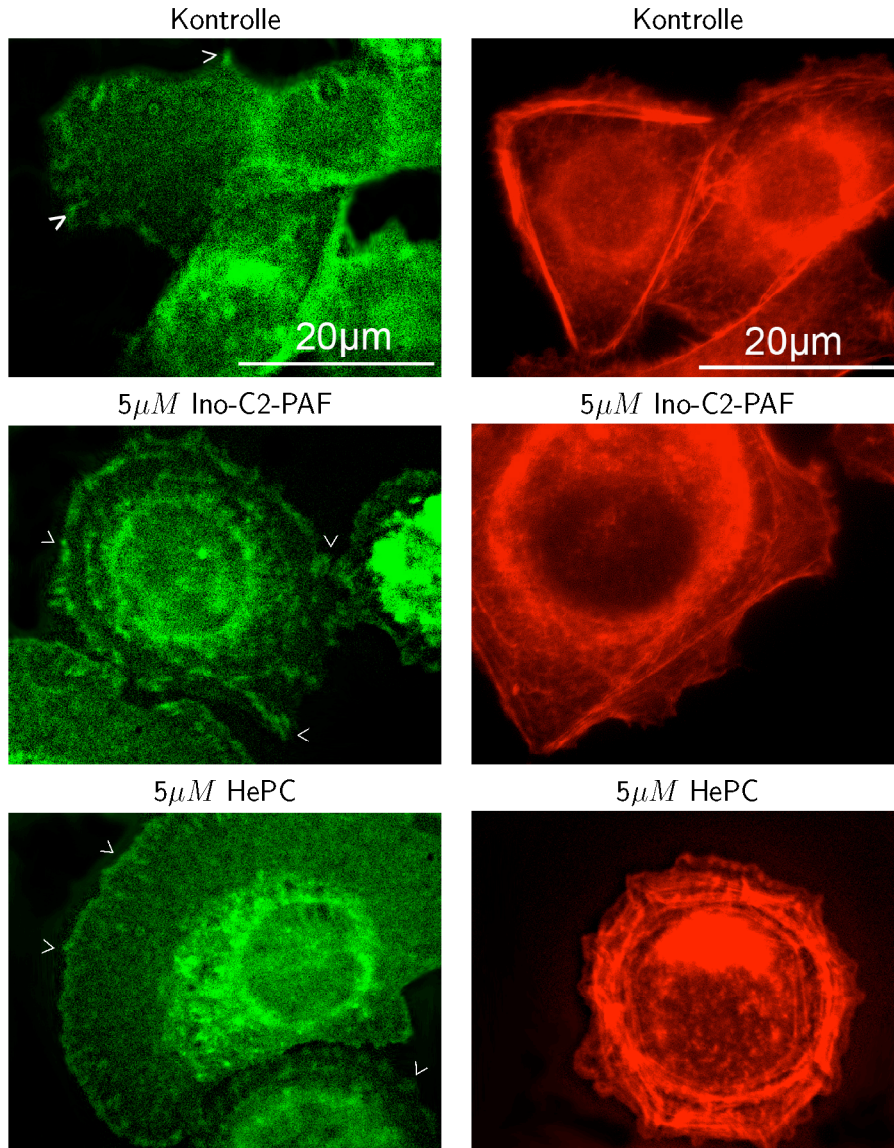


Abbildung 6.23: Immunfluoreszenzstudie mit SCC-25-Zellen auf Collagen IV nach 48h

5,5x10<sup>4</sup>Zellen/Well werden in 200 $\mu$ L Keratinozytenmedium für 90min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen wird die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mit dem spezifischen Antikörper K20-FITC gefärbt, diese Aufnahmen sind in der linken Spalte zu sehen. Das Zytoskelett wird Phalloidin-TRITC gefärbt und diese Aufnahmen sind in der rechten Spalte zu sehen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet. Die offenen Pfeile sind auf „fokale Adhäsionen“ gerichtet.

### **6.1.7 Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die kleinen GTPasen Rac1 und RhoA und auf die Migration von HaCaT-Zellen**

Die Moleküle Rac und Rho gehören zu der Familie der kleinen GTPasen. Diese sind an vielen verschiedenen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Zellzyklus, Migration und der Organisation des Zytoskeletts, beteiligt.

Der Austausch von GDP gegen GTP fungiert als molekularer Schalter zwischen der inaktiven GDP-gebundenen und der aktiven GTP-gebundenen Form. Dieser Wechsel wird von verschiedenen Regulatoren überwacht, dazu gehören Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF, guanine nucleotide exchange factors), die die Bildung der aktiven Form fördern und die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP, GTPase activating proteins), die durch Hydrolyse von GTP die inaktive Konformation begünstigen. Die Aktivierung von Rac an der Zellperipherie führt zur Ausbildung des Lamellipodiums und hat somit Einfluss auf das Aktinzytoskelett. Dahingegen führt die Aktivierung von RhoA zur Formation von Spannungsfasern und fokalen Adhäsionen. Beides ist für die gerichtete Bewegung von Zellen eine wichtige Voraussetzung (Tolias et al., 1995).

Da, wie vorangehend beschrieben, die Stimulation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF oder HePC einen Einfluss auf das Zytoskelett hat, wurde im folgenden untersucht, ob die Phospholipidanaloga einen Einfluss auf kleine GTPasen haben. Dazu wurden HaCaT-Zellen mittels Elektroporation transient mit verschiedenen Rac1-cDNA-Konstrukten transfiziert. Diese Konstrukte sind eine konstitutiv-aktive Form von Rac1 (Q61L) und eine dominant-negative Form von Rac1 (T17N). Die so behandelten Zellen wurden mit den Phospholipidanaloga inkubiert und Zell-Migrationsstudien durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Western-Blot mit circa 30% bestimmt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden die Zellen mit dem pharmakologischen Inhibitor der Rho-Kinasen, Y-27632, inkubiert. Y-27632 inhibiert die Rho-Kinasen ROCK-I und ROCK-II durch kompetitive Bindung an deren katalytische Domäne.

## Transwell-Migrationsassays

Nach Transfektion der HaCaT-Zellen mit dem Kontrollvektor führt die Behandlung mit Inositol-C2-PAF oder HePC zur Hemmung der Migration, wie schon für nicht-transfizierte Zellen gezeigt wurde. Nach der Transfektion von konstitutiv-aktivem Rac1 (61L Rac1) in HaCaT-Zellen ist dieser Effekt vollständig reversibel. Die Transfektion von dominant-negativem Rac1 (17N Rac1) in HaCaT-Zellen zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die durch Inositol-C2-PAF oder HePC verminderte Anzahl migrierender Zellen, führt aber zu einer Verminderung von 30% gegenüber unbehandelten, vektortransfizierten Zellen (Abb. 6.24).

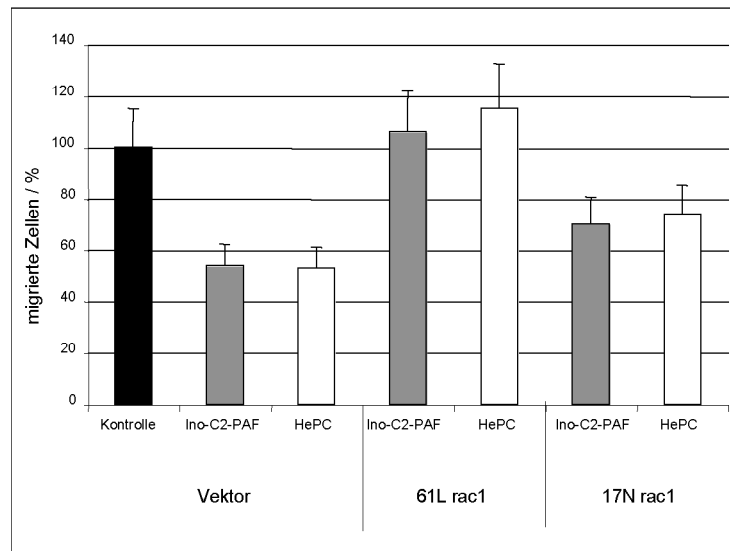


Abbildung 6.24: Einfluss der Transfektion verschiedener cDNA-Konstrukte der kleinen Rac1 auf die Transwell-Migration von HaCaT-Zellen

$5,5 \times 10^4$  transient transfizierte Zellen werden in  $150 \mu L$  Keratinozytenwachstumsmedium, mit oder ohne Inositol-C2-PAF oder HePC (je  $5 \mu M$ ), auf die Innenseite eines TransWellfilters gegeben. Die Außenseite des Filters wurde mit Collagen IV beschichtet ( $20 \mu g / mL$ ). Dieser Filter wird in eine 6Well Kammer, die mit  $500 \mu L$  Keratinozytenmedium ohne Wachstumsfaktoren gestellt und im Brutschrank für 24h inkubiert. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils vier Felder/Filter ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt.

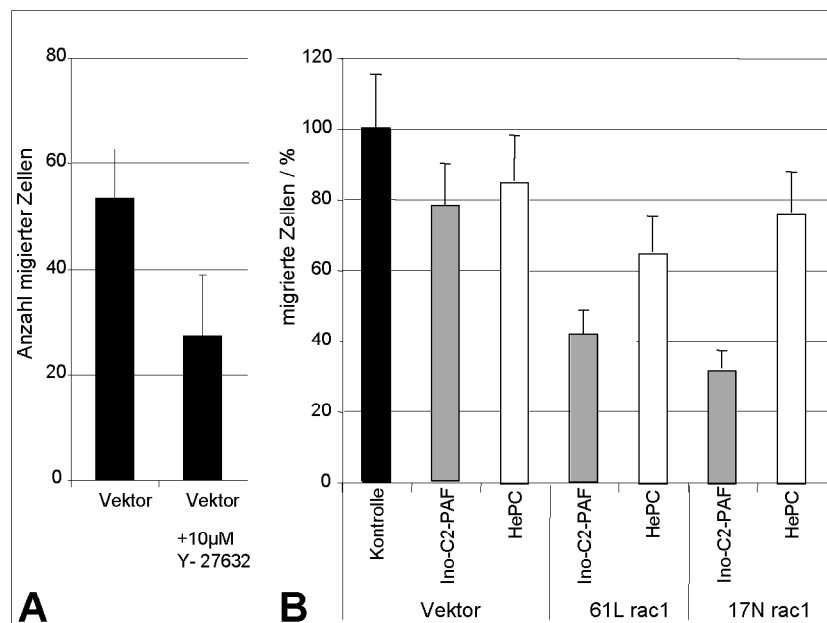


Abbildung 6.25: **A)** Einfluss von Y-27632 auf die Migration unbehandelter, transient transfizierter HaCaT-Zellen **B)** Einfluss der Transfektion der kleinen GTPase Rac1 und Hemmung des RhoA Signalweges durch 10µM Y-27632 auf die Transwell-Migration von Phospholipidanaloga-behandelten HaCaT-Zellen

Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils vier Felder/Filter ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Mittelwerte bestimmt.

Y-27632 ist ein pharmakologischer Inhibitor der Rho-Kinasen  $\alpha$  und  $-\beta$  (ROCK). Die Rho-Kinasen befinden sich in hierarchisch untergeordneter Position von RhoA und sind wichtige RhoA Effektoren. Durch die Inhibition der Rho-Kinasen wird die Signaltransduktionskaskade von RhoA gestört.

In Kontrollzellen hat die Gabe von 10µM Y-27632 zur Folge, dass sich die absolute Anzahl der migrierten Zellen um die Hälfte von 53 auf 27 verringert. Dementsprechend sind die migrationsverzögernden Eigenschaften von Inositol-C2-PAF und HePC deutlich geringer ausgeprägt. Die gleichzeitige Inkubation von Inositol-C2-PAF oder HePC mit Y-27632 in Vektor-transfizierten Zellen steigert die Anzahl migrierender Zellen um 25% auf 80% der Vektor-transfizierten Zellen. Die Kombination aus 61L Rac1 und ROCK-Inhibition führt zu einer Senkung der Anzahl migrierender Zellen bei der Koinkubation mit Inositol-C2-PAF um 60%. Die Kombination 17N Rac1/ROCK-Inhibition und Inositol-



C2-PAF führt zu einer Verminderung der Zellzahl um 70%.

Bei der Koinkubation mit HePC hingegen zeigt sich ein schwächerer, migrationsvermindernder Effekt von 38% bzw. 22% (Abb. 6.25).

### Wundheilungs-Assays

Um in Analogie zu den in Kapitel 8.1.5 beschriebenen Versuchen den Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Wundheilung zu untersuchen, werden transient-transfizierte HaCaT-Zellen so kultiviert, dass sich eine geschlossene Zellschicht bildet. Diese Zellschicht wird anschließend verwundet und die Zellen beim Verschließen dieser Wunde überwacht.

Bei der Inkubation mit dem Rho-Kinasen Inhibitor Y-27632 zeigt sich ein positiver Effekt auf die Wundheilung in Kontrollzellen. So ist die Wunde nach 3h schon zu 57% verschlossen. Eine Verlängerung der Inkubation auf 24h führt zu einem Wundverschluss von 54%. Die Inkubation mit Inositol-C2-PAF und dem Rho-Kinasen Inhibitor dagegen führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Wundheilung, nach 3h ist die Wunde erst zu 31% und nach 24h zu 44% geschlossen. Bei der Inkubation mit HePC und dem Rho-Kinasen Inhibitor ist die Wunde nach 3h erst zu 38% geschlossen, aber nach 24h beträgt der Wundverschluss schon 50% (Abb. 6.26).

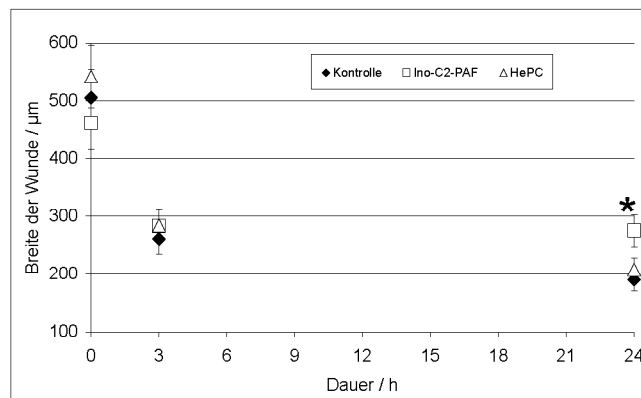


Abbildung 6.26: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen bei Hemmung des Rho-Signalweges durch Y-27632

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 der Kontrollzellen unterscheiden.

Wie aus Abbildung 6.26 hervorgeht, ist der Einfluss von Y-27632 auf die Wundheilung nach 24h am deutlichsten ausgeprägt. Deshalb ist in Abbildung 6.27 der Fortschritt der Wundheilung von HaCaT-Zellen auf einer Collagen IV Matrix nach 24h gezeigt. Die Zellen wurden mit  $10\mu M$  des Rho-Kinasen Inhibitors Y-27632 behandelt und zusätzlich mit  $5\mu M$  Inositol-C2-PAF oder  $5\mu M$  HePC. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff H0 gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In der mit Y-27632 behandelten Wunde ist an einigen Stellen ein vollständiger Wundverschluss erreicht. Im Gegensatz dazu gibt es nur sehr wenige Zellen, die aktiv in die Wunde migriert sind bei der mit Y-27632 und Inositol-C2-PAF behandelten Wunde. In der mit Y-27632 und HePC behandelten Wunde sind deutlich mehr migrierende Zellen zu erkennen.

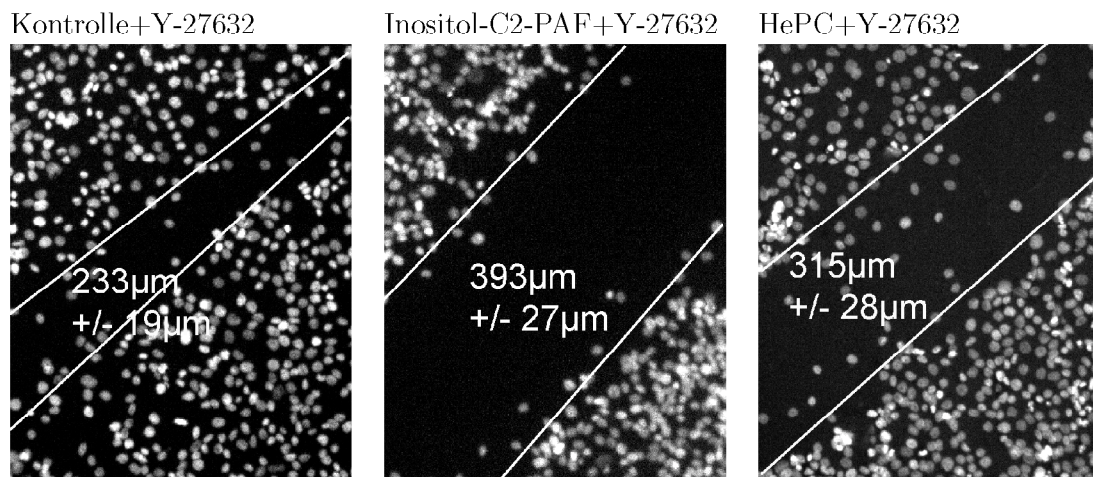


Abbildung 6.27: Wundheilung von HaCaT-Zellen nach 24h

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 einer Kernfärbung bei 11,6facher Vergrößerung.

Auch nach der transienten Transfektion von HaCaT-Zellen mit den verschiedenen Rac1-Konstrukten ist der hemmende Einfluss der Phospholipidanaloga sichtbar. In Vektor-transfizierten Kontrollzellen sieht man, dass die hemmende Wirkung der Phospholipidanaloga besonders die späte Phase der Migration zwischen 3h und 24h betrifft. In Kontrollzellen ist die Wunde nach 24h zu 75% geschlossen, unter Gabe von Inositol-C2-PAF beträgt der Wundverschluss nur 62%. HePC hemmt die Wundheilung weniger stark, nach 24h ist die Wunde zu 72% geschlossen. Die Transfektion mit 61L Rac1 führt auch in Kontrollzellen zu einer Verzögerung des Wundverschlusses, so ist nach 24h die Wunde erst zu 53% geschlos-

sen. Bei der zusätzlichen Inkubation mit Inositol-C2-PAF oder HePC kommt es jetzt aber auch noch zu einer Verzögerung der initialen Migration zwischen 0h und 3h, so ist hier die Wunde erst zu 36% geschlossen im Vergleich zu 49% bei Kontrollzellen und 43% bei HePC (Abb. 6.28).

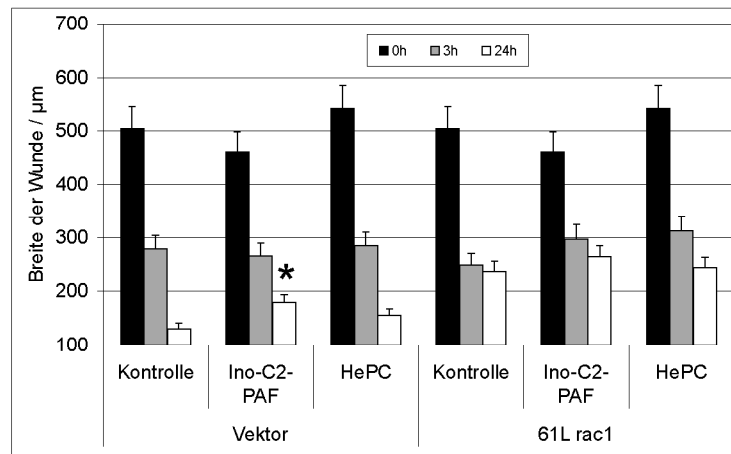


Abbildung 6.28: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen nach Transfektion von 61L Rac1

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. Das mit einem \* indizierte Ergebnis zeigt, dass Inositol-C2-PAF die Wundheilung Vektor-transfizierter Zellen signifikant verzögert, bezogen auf die Werte nach 24h.

In Kontrollzellen führt die Transfektion mit 17N Rac1 zu einer um 19% beschleunigten Migration innerhalb der ersten drei Stunden. Nach der transienten Transfektion von 17N Rac1 zeigt Inositol-C2-PAF keine hemmenden Eigenschaften innerhalb der ersten drei Stunden mehr. Dahingegen ist der migrationsverzögernde Effekt von Inositol-C2-PAF und HePC in der späten Phasen der Migration, zwischen 3h und 24h, noch erhalten. So beträgt hier die Wundheilung nur jeweils 58% im Vergleich zu 67% bei Kontrollzellen (Abb. 6.29).

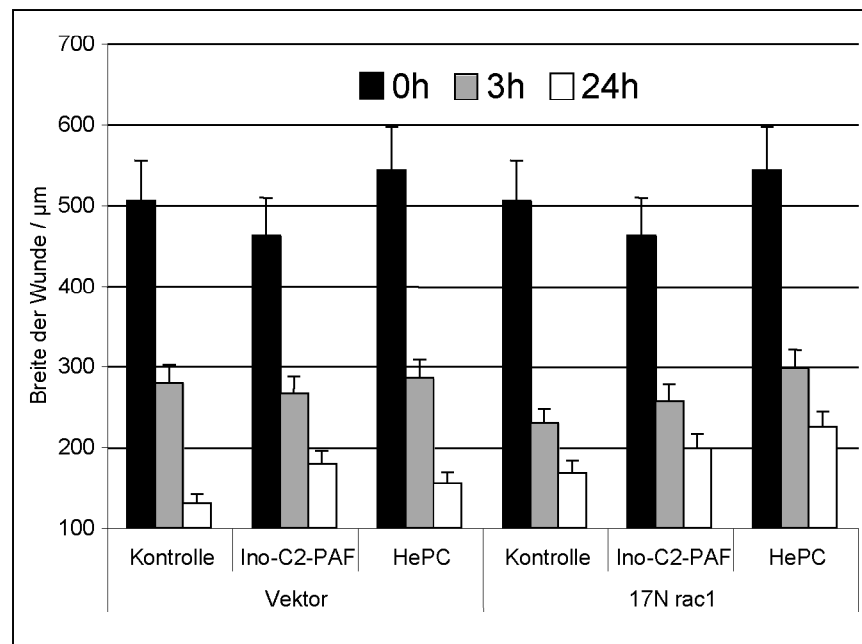


Abbildung 6.29: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen nach Transfektion von 17N Rac1

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.

Die Hemmung des Rho-Signalweges führt in Vektor-transfizierten Kontrollzellen zu einem Wundverschluss nach 3h von 44% und nach 24h von 73%. Im Gegensatz dazu ist durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF der Wundverschluss nach 3h nur zu 21% und bei der Inkubation mit HePC nur zu 39% erfolgt. Bei Verlängerung der Inkubation auf 24h beträgt der Wundverschluss 68% bzw. 74%. Die Transfektion von 61L Rac1 hat keinen Einfluss auf den Wundheilungsprozess nach 3h in Kontrollzellen, aber sowohl Inositol-C2-PAF als