

auch HePC stimulierte HaCaT-Zellen weisen eine verlangsamte Wundheilung auf. So beträgt der Wundverschluss nur 30% bei Inositol-C2-PAF- bzw. 50% bei HePC-behandelten Zellen. Bei Verlängerung des Inkubationszeitraums auf 24h zeigt sich bei allen Zellen eine deutlich verlangsamte Wundheilung. In Kontrollzellen und HePC-behandelten Zelle ist die Wunde nur zu 51% bzw. 55% geschlossen. In Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen ist die Wunde nach 24h nur zu 40% geschlossen (Abb. 6.30).

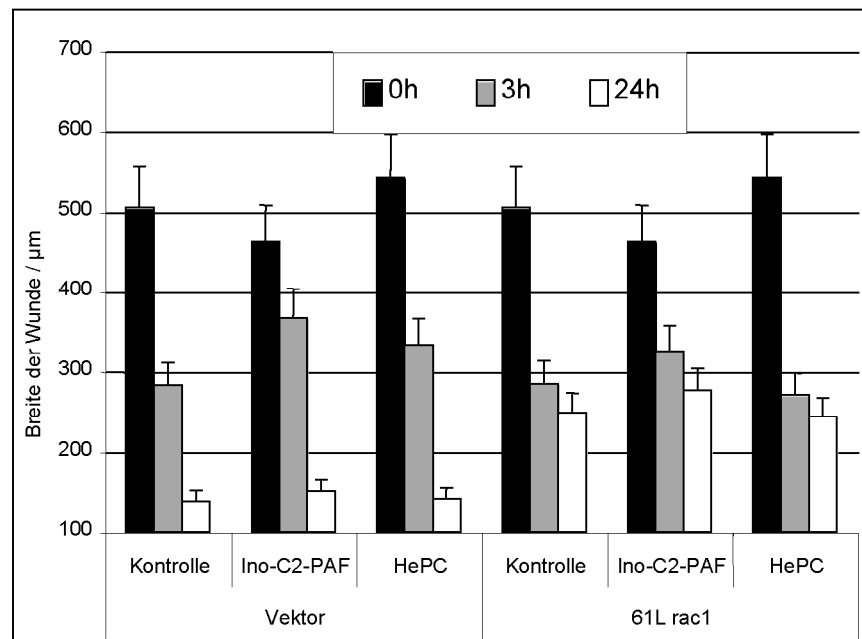


Abbildung 6.30: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen nach Transfektion von 61L Rac1 und Hemmung des Rho-Signalweges durch Y-27632

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.

Die Transfektion von 17N Rac1 und die Hemmung des Rho-Signalweges haben keinen Einfluss auf die Wundheilung von Kontrollzellen, so beträgt der Wundverschluss nach 3h 40% und nach 24h 74%. In Inositol-C2-PAF-stimulierten Zellen wird die Wundheilung beschleunigt, auf 57% nach 3h bzw. 75% nach 24h. In HePC-stimulierten Zellen zeigt sich beschleunigte Wundheilung von 55% nach 3h, wohingegen nach 24h der Wundverschluss ähnlich wie bei Kontrollzellen 77% beträgt (Abb. 6.31).

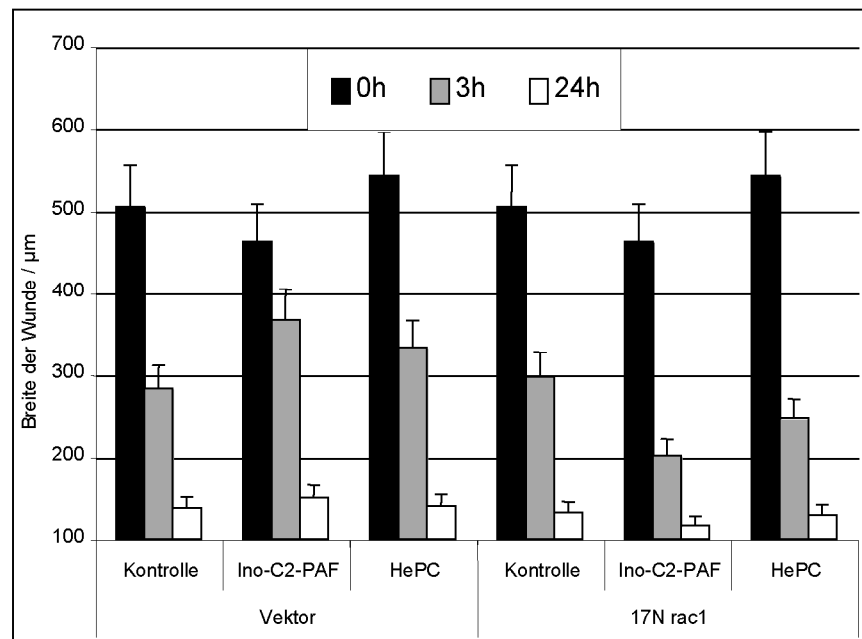


Abbildung 6.31: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Wundheilung von HaCaT-Zellen nach Transfektion von 17N Rac1 und Hemmung des Rho-Signalweges durch Y-27632

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.

Da in den vorausgehenden Untersuchungen Inositol-C2-PAF die Transwell-Migration und Wundheilung von HaCaT-Zellen stärker beeinflusste als HePC, sind im folgenden Abschnitt nur die Daten der Untersuchungen mit Inositol-C2-PAF gezeigt. Abb. 6.32 zeigt den Einfluss der transienten Transfektion auf die Wundheilung von Kontroll- und Inositol-C2-PAF behandelten HaCaT-Zellen. Die erfolgte Transfektion lässt sich anhand der Ko-Expression mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) nachweisen. Zusätzlich wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt, die Darstellung ist invers schwarz/weiß, um die Erkennbarkeit feiner Strukturen zu verbessern. Die Wunde verläuft diagonal von links unten nach rechts oben. Bei den Vektor-transfizierten Zellen erkennt man positiv-transfizierte (grüne) Zellen in der Wunde, die durch ein breites Lamellipodium mit feinem Aktinnetzwerk (Pfeilkopf) gekennzeichnet sind. In den 61L Rac1-transfizierten Zellen (grün) kommt es zur Ausprägung eines verstärkten, sehr breiten, ungerichteten Lamellipods (Pfeil). Die nicht-transfizierten Zellen sind durch ein feineres Aktinnetzwerk (Pfeilkopf) gekennzeichnet. Die 17N Rac1-transfizierte Zelle (grün) befindet sich innerhalb der Wunde und weist ein gerichtetes Lamellipod mit feiner Aktinstruktur (Pfeilkopf) auf. Zusätzlich zeigen einige nicht-transfizierte Zellen sehr langgestreckte Zellkörper. Die Gabe von $5\mu\text{M}$ Inositol-C2-PAF führt in Vektor-transfizierten wie auch in nicht-transfizierten Zellen zu einer vermehrten Bildung von Filopodien (Pfeilkopf) und damit zu einer Lockerung des Zellverbandes. Die Vektor-transfizierten (grünen) Zellen befinden sich direkt am Wundrand. 61L Rac1-transfizierte Zellen sind durch ein breites, Lamellipodium (Pfeile), das in scheinbar festerem Kontakt zu benachbarten Zellen ist, gekennzeichnet. Sowohl transfizierte als auch nicht transfizierte Zellen zeigen eine starke kortikale Aktinfärbung, aber keine Filopodien. 17N Rac1-transfizierte Zellen (grün) zeigen keinen ausgeprägten Phänotyp, befinden sich aber auch am Wundrand und scheinen an der zum Wundverschluss führenden Migration beteiligt zu sein. Nicht-transfizierte Zellen sind durch Filopodien und teilweise sehr gestreckte Zellkörper, in einem aufgelockerten Zellverband, gekennzeichnet (Pfeilköpfe).

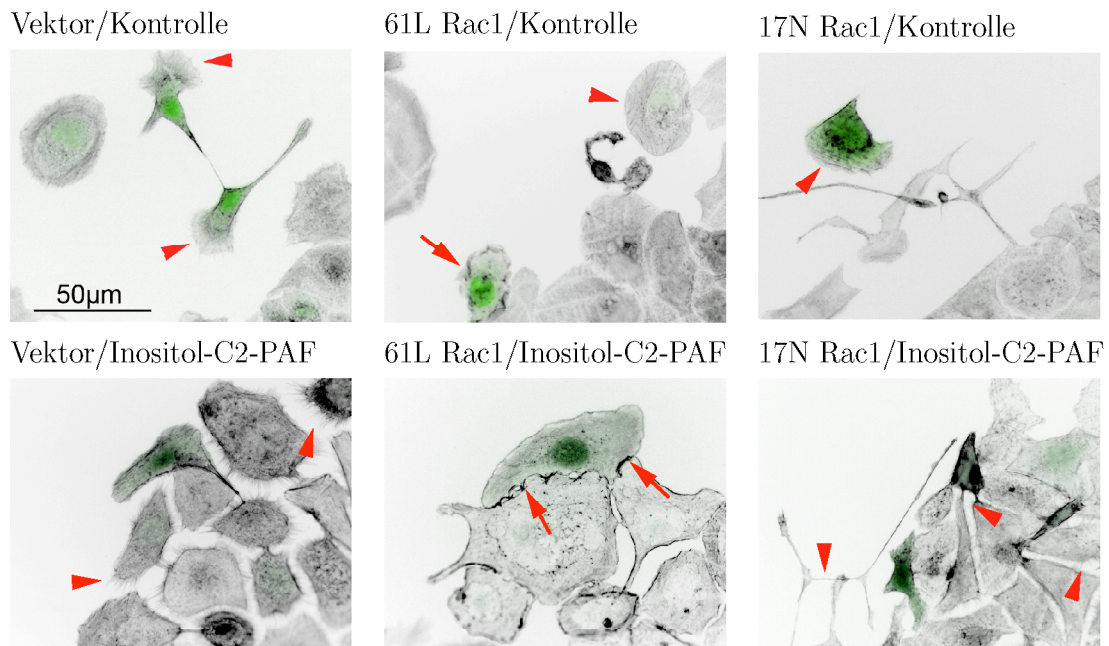


Abbildung 6.32: Immunfluoreszenzstudie zur Wundheilung von HaCaT-Zellen nach transienter Transfektion mit den induzierten Rac1-Konstrukten nach 24h

Transient transfizierte HaCaT-Zellen werden auf Collagen IV ausplattiert. 24h nach dem Zufügen der Wunde wurde der Versuch abgestoppt, die erfolgreiche Transfektion ist durch die Expression des GFP-Proteins nachweisbar. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC gefärbt, für die bessere Erkennbarkeit des Zytoskeletts wurde eine inverse Darstellung gewählt.

Die morphologischen Veränderungen, die durch die transiente Transfektion mit verschiedenen Rac1-Konstrukten, die Inkubation mit dem Rho-Kinasen Inhibitor Y-27632 und die Stimulation mit $5\mu M$ Inositol-C2-PAF hervorgerufen werden, sind in Abb. 6.33 zu sehen. In den Vektor-transfizierten Kontrollzellen, die mit $10\mu M$ Y-27632, aber nicht mit Inositol-C2-PAF behandelt wurden, erkennt man positiv-transfizierte (grüne) Zellen in der Wunde. Diese, wie auch nicht-transfizierte Zellen, sind durch langgestreckte Zellkörper (Pfeilkopf) gekennzeichnet. Die 61L Rac1-transfizierten Kontrollzellen (grün) sind durch ein breites, ungerichtetes Lamellipodium gekennzeichnet (Pfeil). Nicht-transfizierte Zellen sind durch ein feines Aktinnetzwerk gekennzeichnet und sind scheinbar an der 61L Rac1-transfizierten Zelle vorbei migriert (Pfeilkopf). Die 17N Rac1-transfizierte Kontrollzelle (grün) ist direkt am Wundrand und weist ein breites, gerichtetes Lamellipod auf. Bei den nicht-transfizierten Zellen erkennt man wieder Zellen, die einen sehr langgestreckten Phänotyp (Pfeilköpfe) aufweisen.

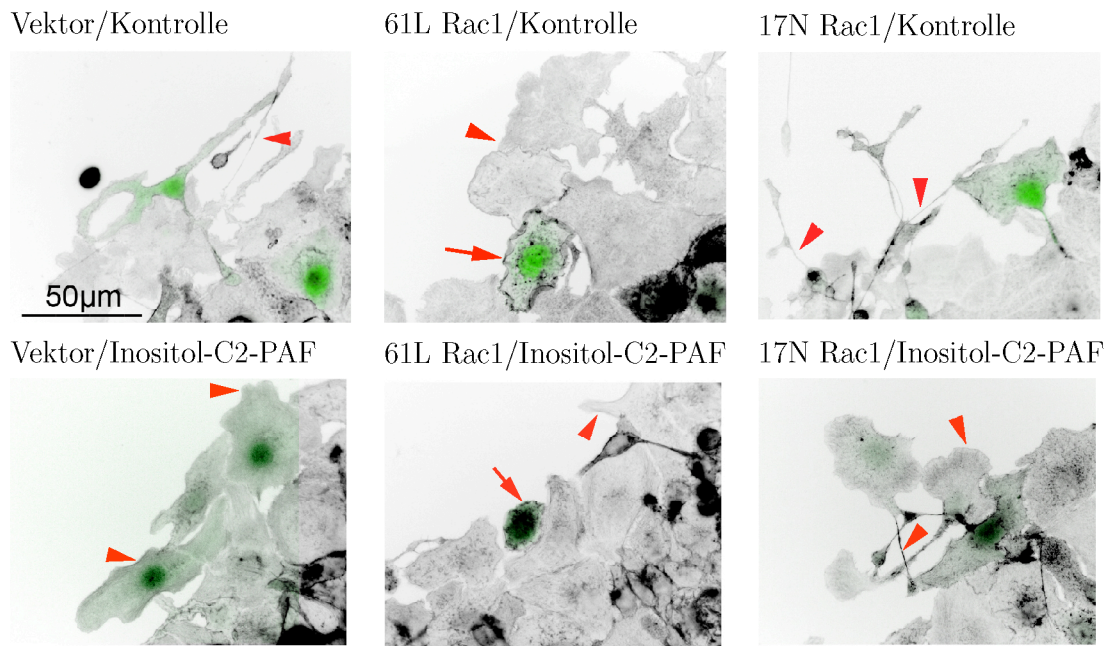


Abbildung 6.33: Immunfluoreszenzstudie zur Wundheilung von HaCaT-Zellen nach transienter Transfektion mit den induzierten Rac-Konstrukten und Hemmung des RhoA-Signalweges durch Y-27632 nach 24h

Transient transfizierte HaCaT-Zellen werden auf Collagen IV ausplattiert. 24h nach dem Zufügen der Wunde wurde der Versuch abgestoppt, die erfolgreiche Transfektion ist durch die Expression des GFP-Proteins nachweisbar. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC gefärbt, für die bessere Erkennbarkeit des Zytoskeletts wurde eine inverse Darstellung gewählt.

Bei den mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen befinden sich sowohl Vektor- (grün) als auch nicht-transfizierte Zellen direkt am Wundrand und scheinen in die Wunde hinein zu migrieren. Beide Zelltypen weisen feines Aktinnetzwerk (Pfeilkopf) auf. 61L Rac1-transfizierte Zellen (grün) dagegen fallen hinter dem Wundrand zurück. Das charakteristische, breite, ungerichtete Lamellipodium (Pfeil) ist erkennbar, obwohl die Zelle deutlich kleiner ist, als nicht-transfizierte Nachbarzellen, die in die Wunde zu migrieren scheinen. Nicht-transfizierte Zellen weisen zudem ein feineres Aktinnetzwerk (Pfeilkopf) auf. 17N Rac1-transfizierte Zellen (grün) sind in die Wunde migriert. Sie weisen gerichtete Lamellipodien und verlängerte Zellausläufer (Pfeilköpfe) auf. Nicht-transfizierte Zellen weisen keine morphologischen Besonderheiten auf (Abb. 6.33).

6.1.8 Beeinflussung der Differenzierung

Die Regeneration der Epidermis erfolgt ausschließlich aus Stammzellen, die im *Stratum basale* lokalisiert sind. Um ihre protektive Hauptfunktion erfüllen zu können, sind Keratinozyten einem dramatischen Wandel ihrer Morphologie und Funktion unterworfen. Die sogenannte terminale Differenzierung führt zur irreversiblen Aggregation und Polymerisation der Keratinfilamente und zum Ausfüllen des kompletten interzellularen Raums mit Lipiden. Am Ende bilden tote Korneozyten die Hornschicht, eine wirksame Schutzschicht gegen äußere Einflüsse (Owens und Watt, 2003).

Zur vollständigen Differenzierung von Keratinozyten gehört die Formation des Cornified Envelope. Dieser besteht aus unlöslichen, miteinander quervernetzten Proteinen und befindet sich direkt unterhalb der Plasmamembran.

Untersuchung der Involucrin- und Transglutaminaseexpression

Transglutaminasen sind Enzyme, die posttranslationale Modifikationen glutamin- und lysinhaltiger Proteine, wie Involucrin, katalysieren. Involucrin ist ein ubiquitärer Bestandteil des Cornified Envelope (Rice und Green, 1978). Während der Differenzierung von Keratinozyten, aber auch bei Erkrankungen wie Psoriasis, steigt die Expression von Involucrin und Transglutaminasen an. Aufgrund vorausgegangener Befunde sollte der Einfluss von Inositol-C2-PAF und HePC auf die Expression der Differenzierungsmarker Transglutaminase und Involucrin untersucht werden.

Für diese Versuche werden die Zellen sehr dicht ausplattiert und mit den Phospholipidanaloga inkubiert. Die Solubilisate der Zellen werden im Western-Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper auf die Expression von Involucrin und Transglutaminase untersucht.

Die Involucrinexpression steigt sowohl in unbehandelten Zellen als auch in den Zellen der Positiv-Kontrolle über die Zeit an. Als Positiv-Kontrolle dienen Zellen, die durch Kultur auf Poly-HEMA-beschichteten Kulturschalen zur verstärkten Differenzierung angeregt werden (Adams und Watt, 1988; Gandarillas und Watt, 1995). Die unbehandelten Zellen werden über die Kulturdauer konfluent und gelangen so aus dem proliferierenden in den differenzierenden Status.

Nach 48stündiger Inkubation zeigen Solubilisate von HaCaT-Zellen, die sowohl mit Inositol-C2-PAF- als auch mit HePC-behandelt wurden, eine um 20% bzw. 40% gesteigerte Involucrinexpression im Gegensatz zu unbehandelten Zellen. Die durch die Kultur auf Poly-HEMA beschichteten Zellen der Positiv-Kontrolle weisen eine um den Faktor 4 gesteigerte Involucrinexpression auf. Bei Verlängerung der Inkubation auf 72h zeigt sich,

dass Inositol-C2-PAF die Involucrinexpression im Vergleich zur 48h Inkubation verdoppelt, so dass die Expression 72% des Wertes der Positiv-Kontrolle beträgt. Dahingegen führt die Inkubation mit HePC zu keiner weiteren Steigerung der Involucrinexpression (Abb. 6.34).

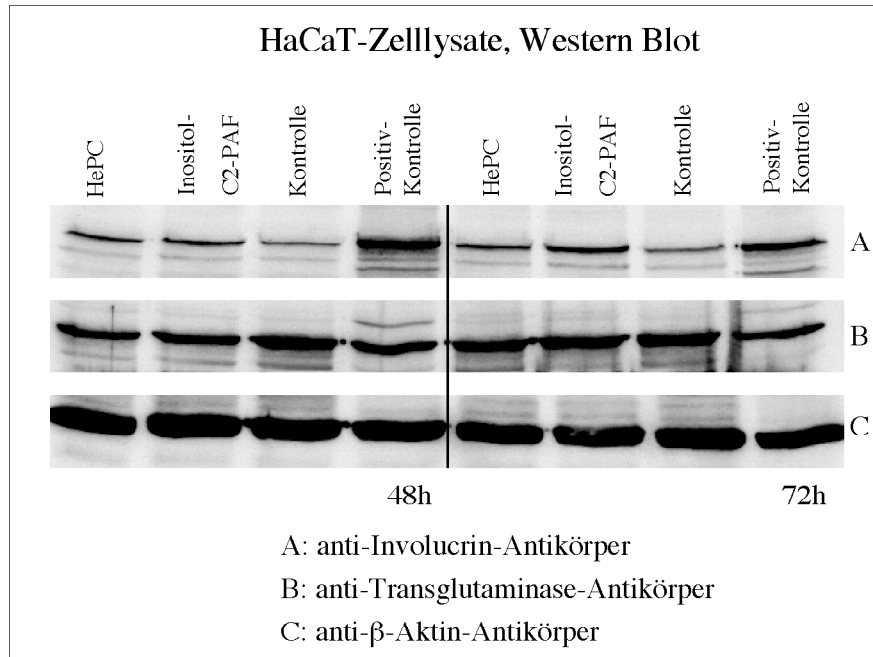


Abbildung 6.34: Western-Blot von HaCaT-Zellysaten auf die Expression verschiedener Differenzierungsmarker

Nach der Inkubation mit dem indizierten Phospholipid wird mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem Zellschaber in $2 \times 200 \mu L$ PBS abgeschabt, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3min bei 900rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Pellets werden mit $75 \mu L$ Solubilisationspuffer 2h auf Eis solubilisiert. $50 \mu g$ Protein werden auf ein 8,5%iges SDS-Gel geladen. Nach dem ‚western-blotting‘ wird die Nitrocellulosemembran mit einem anti-human-Involucrin-Antikörper und einem anti-human-β-Aktin-Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit den entsprechenden, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgt die Auswertung am Imager (Fuji®). Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt, gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

Abbildung 6.35 zeigt die densitometrischen Auswertungen der fünf unabhängigen Einzelerperimente. Zusammenfassend zeigen Solubilisate von HaCaT-Zellen nach 48stündiger Inkubation mit Inositol-C2-PAF eine um circa 60% gesteigerte Involucrinexpression im Gegensatz zu unbehandelten Zellen. Bei Verlängerung der Inkubation auf 72h zeigt sich, dass Inositol-C2-PAF die Involucrinexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen wiederum um 16% steigern kann, aber deutlich weniger als die Zellen der Positiv-Kontrolle.

Dahingegen führt die Inkubation mit HePC zu einer Steigerung der Involucrinexpression um 74% nach 48h. Nach 72h Inkubation mit HePC wird die Involucrinexpression um den Faktor 2,25 im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesteigert und erreicht damit fast das Niveau der Positiv-Kontrollzellen, die die Involucrinexpression um den Faktor 2,71 steigern. Als weiterer Marker der Differenzierung wurde die Transglutaminaseexpression untersucht. Die Transglutaminaseexpression in HaCaT-Zellen wird weder durch Inositol-C2-PAF- noch durch HePC-Inkubation beeinflusst (Abb. 6.34 und 6.36).

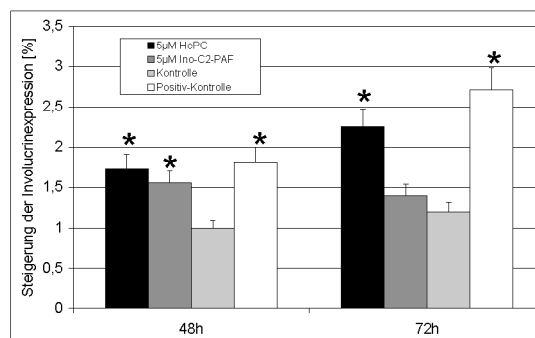


Abbildung 6.35: Zusammenfassende Quantifizierung des Einflusses von Inositol-C2-PAF und HePC auf die Involucrinexpression in HaCaT-Zellen nach 48h und 72h; (n=5)

Die mit einem * indizierten Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt.

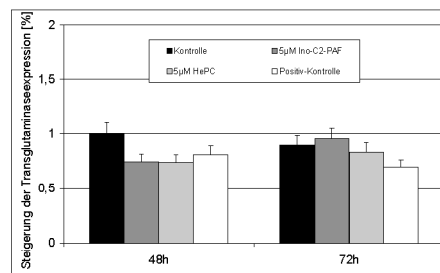


Abbildung 6.36: Zusammenfassende Quantifizierung der Western-Blots von HaCaT-Zelllysaten für die Expression der Transglutaminase II nach 48h und 72h; (n=5)

Abb. 6.38 stellt die densitometrischen Auswertungen der vier unabhängigen Einzelexperimente für die Beeinflussung der Involucrinexpression in SCC-25-Zellen dar.

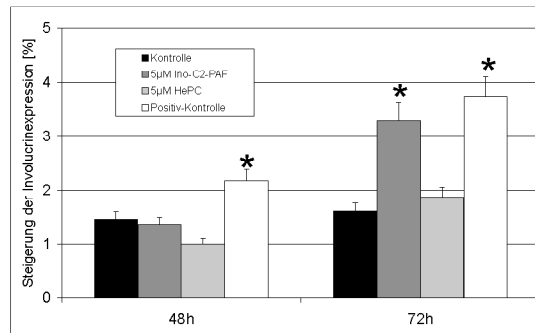


Abbildung 6.38: Zusammenfassende Quantifizierung der Western-Blots von SCC-25-Zelllysaten für die Involucrinexpression nach 48h und 72h; (n=4)

Die mit einem * indizierten Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt.

Abb. 6.39 stellt die densitometrischen Auswertungen der vier unabhängigen Einzelexperimente für die Beeinflussung der Transglutaminaseexpression in SCC-25-Zellen dar.

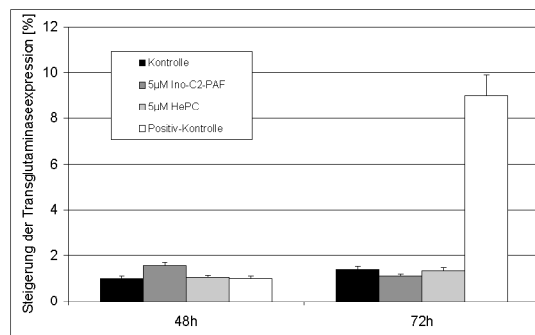


Abbildung 6.39: Zusammenfassende Quantifizierung der Western-Blots von SCC-25-Zelllysaten für die Transglutaminaseexpression nach 48h und 72h; (n=4)

Untersuchung der Transglutaminase-Aktivität

Da die Expression des späten Differenzierungsmarkers Involucrin durch Inositol-C2-PAF und HePC erhöht wird, nicht aber die Expression des Differenzierungsmarkers Transglutaminase, wurde im Folgenden untersucht, ob die Aktivität dieses Enzyms möglicherweise durch diese Substanzen reguliert wird.

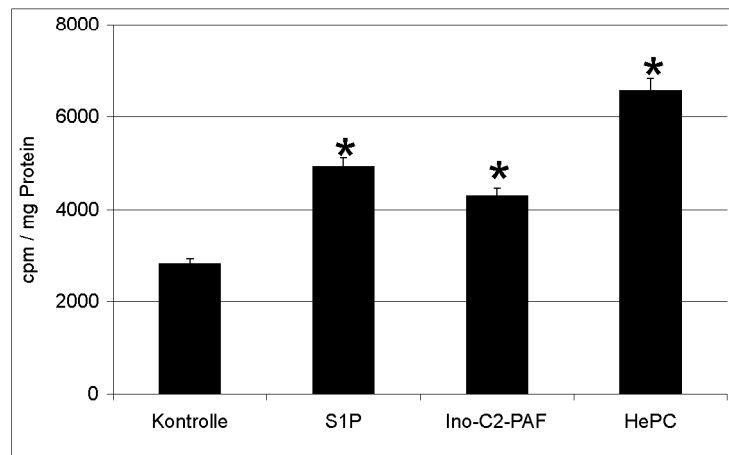


Abbildung 6.40: Bestimmung der Transglutaminaseaktivität in Solubilisaten von Primärkeratinozyten nach Stimulation (96h) mit Inositol-C2-PAF oder HePC

Primärkeratinozyten werden zu 2×10^5 Zellen/6Well ausgesät und mit den indizierten Substanzen ($1,25 \mu M$ Inositol-C2-PAF bzw. HePC, $10 \mu M$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) oder Keratinozyten-Wachstumsmedium) für 96h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden in $2 \times 200 \mu L$ Tris-HCl-Puffer abgeschabt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 7 Einfrier- und Auftau-Zyklen. $100 \mu L$ des Überstandes werden mit $600 \mu L$ Inkubationspuffer für 1h im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von $600 \mu L$ 10%iger, eiskalter Trichloressigsäure wird die Reaktion beendet. Das gesamte Volumen wird auf GF/C-Filter (Whatman) übertragen und gründlich gewaschen. Der Filter wird mit $2 mL$ Szintillationsflüssigkeit sorgfältig gevortext. Der Liquid-Scintillation-Counter ermittelt die spezifische Radioaktivität.

Hierzu wurden Primärkeratinozyten verwendet, weil in HaCaT-Zellen mit Sphingosin-1-phosphat, das als Positiv-Kontrolle eingesetzt wurde, keine Erhöhung der Transglutaminase-Aktivität festgestellt werden konnte. Die Konzentrationen der Phospholipidanaloga wurden reduziert, weil Zytotoxizitätstests ergaben, dass nach 48stündiger Inkubation die substanzinduzierte Toxizität von Inositol-C2-PAF auf Primärkeratinozyten schon 60% beträgt. Die Primärkeratinozyten werden für 96h mit den Phospholipidanaloga