

5. Zusammenfassung

Ausgehend von der Beobachtung, dass synthetische Phospholipide antiproliferativ wirken, stellt sich die Frage, welche Mechanismen dies bewirken. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Einflüsse der glycosidierten Phospholipidanaloga Glc-PC und Glc-PAF auf physiologische Zellfunktionen untersucht. Die schon in der Literatur beschriebene Wirkung auf das Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen konnte in den durchgeführten Proliferationsassays bestätigt werden. Bedeutsam erscheint, dass Glc-PC und Glc-PAF auf Zellen mit autonomem Wachstum einen stärkeren antiproliferativen Effekt haben. Die antiproliferative Wirkung kann nur in serumfreiem Zellkultursystem erzielt werden. Glc-PAF und Glc-PC werden durch fetales Kälberserum inaktiviert. Bei Glc-PAF liegen die antiproliferativ wirkenden Konzentrationen sehr eng bei denen, die bereits toxisch auf die Zellen wirken. Beide Effekte sind daher nicht eindeutig voneinander zu trennen. Anders sieht es bei Glc-PC aus, bei dem die antiproliferativ wirkende Konzentration weit unter der toxischen liegt. Der zeitlich begrenzte, deutlich konzentrationsabhängige Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsion hat Anlass zu weitergehenden Untersuchungen gegeben. Dabei fällt besonders die Adhäsionssteigerung auf Fibronectin auf. Sie nimmt um das bis zu 6-fache im Vergleich zur Kontrolle zu. Die daraufhin durchgeführten Experimente zur Integrinexpression auf der Zelloberfläche von HaCaT-Zellen zeigt, dass weder die β 1- noch α 3-Integrinuntereinheiten unter Einfluss der Phospholipide verstärkt exprimiert werden. Eine geringe Expressionssteigerung unter Einfluß von Glc-PC kann für die β 4-Untereinheit nachgewiesen werden. Die verstärkte Adhäsion auf den drei Matrices kann damit aber nicht ausreichend erklärt werden.

Im Weiteren wird untersucht, ob es durch die synthetischen Phospholipide zu einer Inside-out vermittelten Aktivierung der Integrine kommt. Dafür kommen zum Beispiel die Phospholipase C und die PI3-Kinase in Betracht, deren Signalwege letztlich auch zu einer erhöhten Bindungsaktivität der Integrine führen. Die mit den Inhibitoren für PLC und PI3-Kinase, U73221 und Wortmannin, durchgeführten Adhäsionen ergeben, dass der Aktivitätszustand dieser beiden Enzyme in keinem Zusammenhang mit der durch die Phospholipide bedingten verstärkten Adhäsion steht. Es müssen demnach andere Mechanismen daran beteiligt sein.

Deutlich sichtbar wird die Beteiligung des Zytoskeletts an den Veränderungen der Zellfunktionen. Bereits lichtmikroskopisch kann eine Veränderung der Zellform, sowohl durch Glc-PAF als auch durch Glc-PC, beobachtet werden. Von der physiologischen runden Zellform kommt es zu einem zunehmenden spindelförmigen Aussehen und zur Entwicklung von haarfeinen Zellausläufern. Dieser Einfluss ist unabhängig von der Inkubationszeit und der eingesetzten Konzentration der Substanzen. Bereits in der geringsten Konzentration und schon nach 2 h Inkubation ist die Zellform stark verändert. Durch Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin kann das Aktin-Zytoskelett der HaCaT-Zellen sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich eine Verdichtung der corticalen Fasern. Wie dies jedoch in Zusammenhang mit der verstärkten Adhäsion steht, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Zellmotilität der HaCaT-Zelllinie wird durch die glycosidierten Phospholipide in nichttoxischen Konzentrationen nicht beeinflusst. Erst in höheren Konzentrationen von Glc-PC nimmt die Zellmotilität ab.

In den durchgeführten Western Blots kann unter Einfluss von Glc-PAF nach 24h Inkubation eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Um welche Proteine es sich dabei handelt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse der Experimente liefern viele Ansätze für weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von glycosidierten Phospholipiden. Zunächst bleibt die

Lokalisation der Phospholipide offen. Dafür gibt es viele Möglichkeiten. Sie können beispielsweise durch Endozytose in das Cytoplasma aufgenommen oder aber in die Plasmamembran integriert werden und dort ihre Wirkung entfalten. Eine Möglichkeit dies aufzuklären wäre beispielsweise eine radioaktive Markierung der Substanzen. Die Überlegung einer Fluoreszenzmarkierung wurde verworfen, da dies zu einer zu großen Veränderung des Moleküls führen würde. Weiterhin besteht die Möglichkeit Enzyminhibitoren bzw. -aktivatoren einzusetzen, um den Mechanismus der Adhäsionssteigerung weiter einzugrenzen. Es stehen z.B. Calphostin C als Inhibitor der Proteinkinase C oder Phorbolmyristilacetat (PMA) als Aktivator der Proteinkinase C zu Verfügung. Desweiteren sollten noch andere Integrinuntereinheiten wie z.B. die $\alpha 5$ - und αv -Untereinheit, die besonders wichtig für die Bindung an Fibronectin sind, auf eine verstärkte Expression hin untersucht werden.

Weitere Experimente zur Aufklärung der verstärkten Tyrosinphosphorylierung nach Inkubation mit Glc-PAF müssen noch folgen. Desweiteren müssen auch andere Phosphorylierungsstellen, die bei der integrinvermittelten Zelladhäsion beteiligt sein können, wie Serin und Threonin, untersucht werden.