

1. Einleitung

1.1. Kontrolle des Zellwachstums

1.1.1. Modell der Mehrschritt-Karzinogenese

Die Kontrolle des Zellwachstums ist eine wichtige Voraussetzung für das Funktionieren und Überleben eines Organismus. Manchmal versagt diese Wachstumskontrolle, und eine Zelle beginnt sich unkontrolliert zu teilen. So entsteht ein Tumor. Man bezeichnet ihn als benigne, wenn er auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt bleibt. Maligne Tumorzellen zeichnen sich durch invasives, infiltrierendes Wachstum aus. Mit der Fähigkeit der Metastasierung können sie so in andere Gewebe vordringen ¹.

Einen Erklärungsansatz über die Entstehung maligner Erkrankungen bietet das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese. Hierbei unterscheidet man die Phasen der Initiation, Promotion, Transformation, Progression und schließlich der Invasion mit Ausbildung von Metastasen.

Am Beginn der Entwicklung stehen dabei genetische Veränderungen wie zum Beispiel die Expression von Onkogenen, der Verlust von Tumorsuppressorgenen, Translokationen oder auch Punktmutationen. Diese können hereditär oder spontan zum Beispiel durch das Einwirken von Chemikalien, radioaktiver Strahlung oder auch Infektionen entstehen. Diese initialen Veränderungen führen eine normale Zelle in das Stadium der Präneoplasie. Weitere Einwirkungen von vor allem exogenen Faktoren, wie zum Beispiel chronische Entzündungen oder auch Ernährung, führen in der Promotionsphase zu weiteren dysplastischen Veränderungen. Durch weitere genetische Faktoren kommt es schließlich zur Transformation in eine Tumorzelle, die sich unkontrolliert vermehren kann. Progression und Invasion der Tumorzelle sind von weiteren genetischen Veränderungen abhängig, die sie befähigen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und durch fremdes Gewebe vorzudringen. Zum Beispiel durch die Sekretion proteolytischer Enzyme ².

1.1.1. Regulation des Zellzyklus

Gesunde Zellen befinden sich in einem Zyklus, bei dem sich Proliferation und Metabolismus abwechseln. Dieser besteht aus der Zellteilung (Mitose), an die sich die G1-Phase (Gap-Phase 1) anschließt. In dieser Phase differenziert und wächst die Zelle. Sie ist vor allem durch eine gesteigerte RNA- und Proteinsynthese gekennzeichnet. Danach tritt die Zelle in die S-Phase ein, in der es zur Verdopplung der DNS kommt. Die folgende G2-Phase dient der Vorbereitung der nächsten Mitose. Viele Zellen durchlaufen nicht den gesamten Zyklus bzw. haben Phasen in denen sie teilungsinaktiv sind. Diese Zellen treten nach der Mitose in die G0-Phase ein und verharren dort, bis sie wieder zur Proliferation aktiviert werden. Der gesamte Zellzyklus unterliegt einer strengen Kontrolle. Wesentlich für die Regulation der Proliferation sind Cycline. Durch Mitogene wird deren Transkription stimuliert. Beim Eintritt der Zelle aus der G0-Phase in die G1-Phase und weiter in die S-Phase sind dies Cyclin D und Cyclin E ^{87,91,95}. Diese Cycline aktivieren die Enzymaktivität cyclinabhängiger Kinasen (CDK), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen, wie den transkriptionellen Repressor pRb

aus der Retinoblastom-Proteinfamilie, das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus regulieren^{86,88,89}. Desweiteren kommt es zur Induktion von bestimmten Genen, die an der weiteren Zyklusregulation beteiligt sind. Dies erfolgt zu bestimmten Zeitpunkten. Die ersten induzierten Gene sind die Immediate-Early Gene. Es sind zumeist Transkriptionsfaktoren, wie c-fos- und c-jun- Protoonkogene. Sie vermitteln die Expression der Delayed-Early-Gene. Dazu gehören neben Cyclin D und Cyclin E auch E2-F und c-myc. Eine dritte Klasse von Genen wird erst spät in der G1-Phase exprimiert. Deren Expression wird durch c-myc und E2-F stimuliert^{97,99}. Wachstumshemmende Signale dagegen stimulieren die Transkription von Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen (CDKI)^{86,100}. Hierüber werden sogenannte Restriktionspunkte aktiviert, die den Fortschritt der Zelle durch die Zellzyklusphase kontrollieren^{90,91}. Sie bestimmen, ob sich die Zelle teilt oder ob Signalwege aktiviert werden, die zu Reparaturmechanismen, zum Verbleiben in bestimmten Zellzyklusphasen oder zum programmierten Zelltod, Apoptose, führen können⁹²⁻⁹⁶. Diese Mechanismen sind in malignen Tumorzellen häufig gestört, so dass sie die Möglichkeit ihr eigenes Zellwachstum zu kontrollieren verloren haben³.

1.1.3. Der programmierte Zelltod, die Apoptose

Die Störung von Apoptose-Signalwegen spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der Tumorentstehung als auch bei der Entwicklung von Therapieresistenz in malignen Tumoren. Von besonderer Bedeutung für das Ansprechen auf zytotoxische Tumortherapien sind die Komponenten des mitochondrialen Apoptosesignalwegs und dessen übergeordneten Regulatoren. Der programmierte Zelltod, Apoptose, ist durch Schrumpfen der Zelle gekennzeichnet. Es bilden sich außerdem Blasen in der Membran. Desweiteren kondensiert das Chromatin, was zur DNS-Fragmentierung und zur Bildung apoptotischer Körperchen führt. Makrophagen werden durch Opsonine, die an die Zelloberfläche gebracht werden, zur Phagozytose dieser Zelle angeregt (Abb.1). Man kennt im Wesentlichen zwei Signalwege der Apoptose. Ausgangspunkt für beide ist die Aktivierung des membranständigen CD95-(Fas/APO-1)-Rezeptor. Der erste Signalweg geht über eine CD95-getriggerte starke Caspase-8-Aktivierung am multimeren death-inducing signaling complex (DISC), die unter Umgehung der Mitochondrien zur schnellen Aktivierung weiterer Caspasen, wie der Caspase- 3, und nachfolgender Apoptose führt.

Auf dem zweiten Weg werden nur wenige DISC gebildet, welche keine sofortige Caspase-8-Aktivierung bewirken. Stattdessen wird mitochondriales Cytochrom C freigesetzt, welches dann im Zytoplasma an den Apoptosis protease-activating-factor (APAF-1) bindet. Dadurch werden auch hier Caspasen aktiviert, die Proteine der Kernhülle spalten oder DNasen aktivieren und somit zur Apoptose führen¹³³.

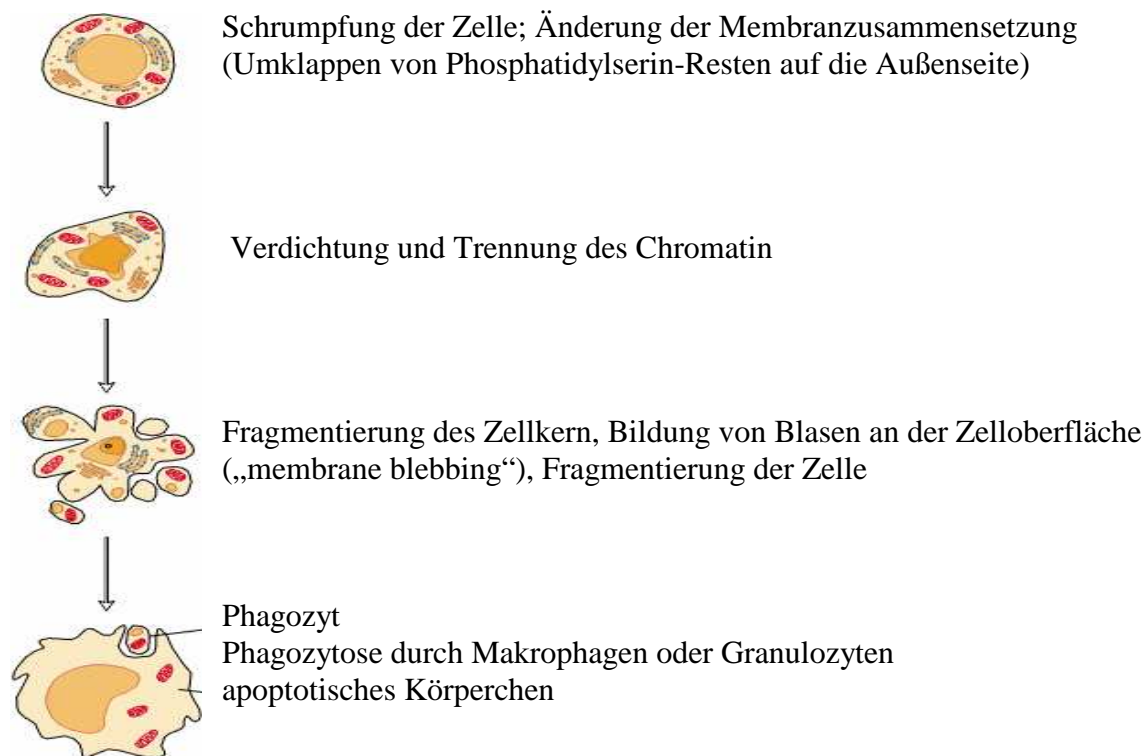


Abb.1: Kennzeichen der Apoptose

Quelle: Modifiziert nach Johannes A. Schmidt

Institut für Gefäßbiologie und Thromboseforschung Universität Wien 2004

1.1.2. Zytostatika und ihre Angriffspunkte

Die therapeutische Anwendung heute gebräuchlicher Zytostatika beruht auf der Annahme, dass Tumoren eine höhere Proliferationsrate als normales Gewebe aufweisen und somit stärker geschädigt werden als gesundes Gewebe. Alle gebräuchlichen zytostatisch wirkenden Substanzen sind Hemmstoffe der Zellproliferation und greifen in die Phasen des Zellzyklus ein. Ihr Wirkungsgrad ist davon abhängig, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Tumorzellen gerade befinden. Bei schnell wachsenden Tumoren befindet sich ein großer Teil der Zellen in der Wachstumsphase, während sich bei langsam wachsenden Tumoren ein großer Teil der Zellen in der G1-bzw. G0-Phase befindet, in der sie relativ unempfindlich gegenüber Zytostatika sind. Desweiteren wirken Zytostatika phasenspezifisch. Das bedeutet, dass durch den Einsatz eines Chemotherapeutikums immer nur die Zellen letal geschädigt werden können, die sich gerade in der dafür geeigneten Phase befinden. Eine Kombination verschiedener Zytostatika ist daher bei der Behandlung maligner Tumore unumgänglich. Eine Übersicht über den Zellzyklus und die Phasenspezifität verschiedener Zytostatika gibt Abbildung 2.

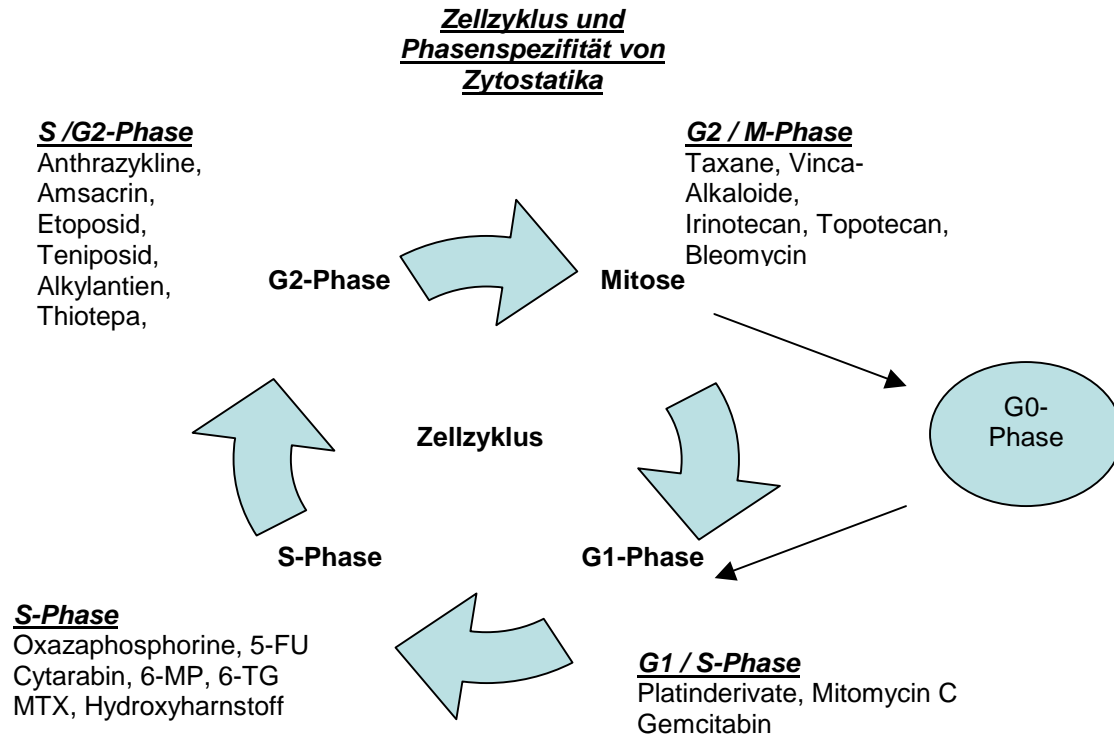


Abb.: 2 Zellzyklus und Phasenspezifität von Zytostatika.

Quelle: Das rote Buch Hämatologie und internistische Onkologie/Berger;
Engelhardt, Mertelsmann, ecomed -Verlagsgesellschaft 2002

Aus der Phasenspezifität verschiedener Zytostatika lassen sich ihre verschiedenen Angriffspunkte herleiten. Auf der Ebene der Nukleinsäure wirken zum Beispiel Antimetabolite wie Purin- und Pyrimidinantagonisten, die während der S-Phase in die DNS eingebaut werden und so zu Störungen in der Proliferation führen. In der Mitose-Phase interagieren Vincaalkaloide mit Mikrotubuli und verhindern damit eine Trennung der Chromosomen. Einen Überblick über die Angriffspunkte verschiedener Zytostatika gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Angriffspunkte verschiedener Zytostatika

Quelle: Das rote Buch Hämatologie und internistische Onkologie/Berger; Engelhardt, Mertelsmann, ecomed – Verlagsgesellschaft 2002

<u>Purinantagonisten</u>	<u>Pyrimidinantagonisten</u>	<u>Ribonukleotidreduktasehemmer</u>
6-MP, 6-TG, MTX	5-FU, Raltitrexed, MTX	Hydroxyharnstoff
DNS		
<u>DNS- Polymerasehemmer</u>	<u>Alkylantien, Interkalation</u>	<u>Topoisomerasehemmer</u>
Cytarabin	N-Lost-Derivate, Nitrosharnstoffe, Oxazaphosphorine, Platinderivate, Dacarbazin, Thiotepa, Procarbazin, Amsacrin, Treosulfan, Mitomycin C, Anthrazykline, Mitoxantron	Etoposid, Teniposid, Anthrazykline, Mitoxantron, Irinotecan, Topotecan
Mitose		
Vincaalkaloide, Taxane		

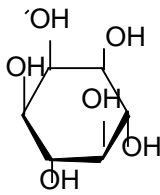
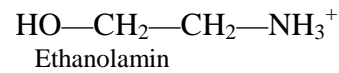
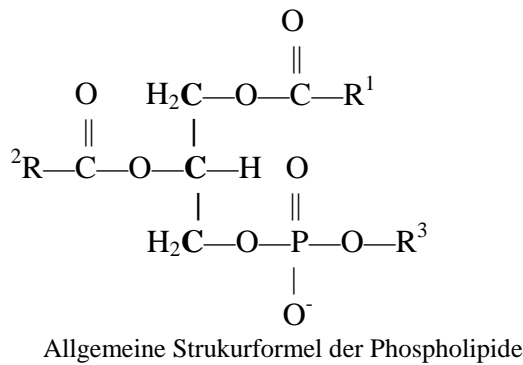
Wie Tabelle 1 zeigt, haben die bisher eingesetzten Chemotherapeutika vor allem Einfluss auf das Erbgut der Zellen. Sie interferieren mit der DNS, stören die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates und die DNS-Synthese. Diese Wirkung haben sie jedoch auch auf schnell wachsendes, gesundes Gewebe. Auch diese Zellen sterben ab, es kommt zu unerwünschten Nebenwirkungen, und nicht selten entsteht über die mutagene Wirkung dieser Medikamente ein Zweitumor. Häufig handelt es sich dabei z.B. um durch Knochenmarkschäden ausgelöste Leukämie³. Außerdem kommt es zur Entwicklung von Resistenzmechanismen. Spezifische Resistenzmechanismen von Zytostatika sind sowohl die Multidrug-Resistenz (MDR), bei der es durch Glykoproteine zum ATP-abhängigen Transport von Zytostatika aus der Zelle kommt, als auch die Topoisomerase-II-Resistenz. Durch Veränderungen des Targetmoleküls DNS-Topoisomerase-II wird die Wirkung von z.B. Anthrazyklinen gemindert. Über veränderte Expression von Zielenzymen z.B. der Dihydrofolat-Reduktase kommt es zur reduzierten Wirkung von Methotrexat (Antimetaboliten-Resistenz). Erhöhte intrazelluläre Spiegel von Gluthation tragen zur Detoxifikation von Alkylantien und Platinverbindungen bei und reduzieren so dessen Wirkung. Die O⁶-Alkyltransferase ist ein DNS-Reparaturenzym, welches die Nitrosharnstoff-induzierte Alkylierung der O⁶-Position von Guanin korrigiert. Die Wirkung von z.B. Carmustin und Lomustin wird somit gemindert⁴. Unerwünschte Wirkungen stellen neben der Entwicklung von Resistenzen eines der Hauptprobleme bei der Tumorthherapie dar. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, nach neuen antiproliferativ wirksamen Substanzen mit alternativen Ansatzpunkten zu suchen. Sie sollten neben guter Wirksamkeit eine geringe Zytotoxizität und damit weniger Nebenwirkungen aufweisen. Bei dieser Suche ist man auf die Substanzklasse der Phospholipide gestoßen. Hinweise, dass diese einen Einfluss auf das Zellwachstum haben könnten, gab es schon in den 60-iger Jahren, beginnend mit der Beobachtung, dass Lysophosphatidylcholin einen aktivierenden Einfluss auf Makrophagen hat und darüber möglicherweise antineoplastisch wirkt⁵.

1.2. Phospholipide

1.2.1. Struktur der Phospholipide

Phospholipide gehören allgemein in die Stoffgruppe der Lipide. Den einzelnen Lipiden ist gemein, dass sie aus Kohlen- und Wasserstoffatomen aufgebaut sind, die sich entweder in langen Ketten oder in Ringstrukturen anordnen. Die einfachsten Fette sind Fettsäuren, die aus einer Kohlenwasserstoffkette und einer Carboxylgruppe (COOH) bestehen. Durch Veresterung von drei Fettsäuren mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerin entstehen Triacylglyceride.

Die meisten Phospholipide besitzen ebenfalls Glycerin als Grundgerüst, das am C₃ mit einer Phosphorsäure verestert ist. Es ist das *sn* (stereospecific-numbering)-Glycerol-3-phosphat oder gemäß der Fischer Projektion L-Glycerol-3-Phosphat. Natürliche Phospholipide enthalten an den Positionen C₁ und C₂ des Glyceringrundgerüsts verschiedene Fettsäureketten⁶. Diese sind gewöhnlich aus geradzahigen Kohlenstoffketten aufgebaut, deren Länge zwischen 14 und 24 Atomen variieren kann. So ergibt sich die systematische Bezeichnung 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphat, das auch als Phosphatidsäure bezeichnet wird. Um nun zu den Phospholipiden zu gelangen, wird ausgehend von der Phosphatidsäure die lokalisierte Phosphorsäure über eine freie OH-Gruppe mit einem weiteren Alkohol verestert. Bei den Alkoholresten handelt es sich beispielsweise um Cholin, Ethanolamin, Serin oder auch Inositol. In Abbildung 3 ist die allgemeine Strukturformel von Phospholipiden und den Alkoholresten dargestellt.



Inositol

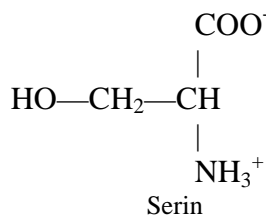
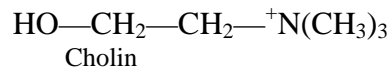


Abb. 3: Allgemeine Strukturformel der Phospholipide. Die C-Atome des GlycerinGrundgerüst sind fett unterlegt. Die Hydroxylgruppen an C-1 und C-2 sind mit Fettsäuren (R-1 und R-2) verestert. Das C-3 ist mit Phosphorsäure verestert. Der Alkohol R-3 bildet mit der Hydroxylgruppe des Phosphats eine Esterbindung aus. Dieser Alkohol kann z.B. Inositol, Ethanolamin, Cholin oder Serin sein.

1.2.2. Phospholipide als Bestandteil der Zellmembran

Phospholipide erfüllen sowohl strukturelle als auch funktionelle Aufgaben. Sie sind aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften Hauptbestandteil von biologischen Zellmembranen.

Dazu lagern sie sich zu einer Doppelschicht an, bei der die am C₃ gelegene hydrophile Kopfgruppe sowohl in das Zytoplasma als auch in die extrazelluläre wässrige Umgebung ragt. Die Doppelschichten bestehen dabei immer aus einer Mischung verschiedener Phospholipide. Die häufigsten Vertreter sind Phosphatidylcholin (Lecithin), -ethanolamin und -serin. In der Außenschicht überwiegt Lecithin, in der Innenschicht hingegen Phosphatidylethanolamin und -serin. Der Anteil verschiedener Phospholipide ist jedoch zell- und gewebespezifisch und variiert somit in unterschiedlichen Zellen. In Tabelle 2 ist die Phospholipidverteilung in der

Plasmamembran humaner Erythrozyten im Vergleich zu anderen Plasmamembranen exemplarisch dargestellt. Dabei wird am Beispiel der Erythrozytenmembran deutlich, dass Lecithin und Phosphatidylethanolamin mit 19% bzw. 18% den größten Anteil bilden. Phosphatidylserin und -inositol sind mit 8% bzw. 1% deutlich geringer vertreten.

Tab. 2: Lipidzusammensetzung ausgewählter Biomembranen

Quelle: Linnemann und Kühl.

Lipid	Plasmamembran des Erythrozyten (%)	Menschliches Myelin (%)	Mitochondrium im Rinderherz (%)
Phosphatidsäure	1,5	0,5	-
Phosphatidylcholin	19	10	39
Phosphatidylethanolamin	18	20	27
Phosphatidylserin	8	8	0,5
Phosphatidylinositol	1	1	0,7

1.2.3. Beteiligung von Phospholipiden an Signalwegen

Phospholipide sind darüber hinaus an der Signalübertragung von der Umgebung durch die Membran in das Zellinnere beteiligt. Dadurch sind sie in das Geschehen im Zellinneren eingebunden. Ein bekanntes Beispiel dafür ist Phosphatidylinositol, welches durch Phosphorylierung zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird. In dieser inaktiven Form ist es in die Zellmembran eingelagert. Seine Aktivierung erfolgt über das membranständige Enzym Phospholipase C, welches in seiner aktiven Form PIP₂ in die Second-Messenger Inositol-(1,4,5,-)Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP₃ vermittelt einen Ca²⁺-Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Darüber werden andere zelluläre Enzyme moduliert und es kommt zu einer Reaktion der Zelle auf das äußere Signal. Die Inaktivierung von IP₃ erfolgt durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe. Dadurch entsteht IP₂. Nach weiterem Abbau zu Inositol kann es wieder in PIP₂ eingebaut werden. Seit der Beschreibung dieses Phosphatidylinositol-Zyklus 1980⁷ ist bekannt, dass über die Spaltung von Phospholipiden in der Zellmembran nach Bindung von Liganden viele Zellfunktionen beeinflusst werden.

1.3. Der Platelet-Activating-Factor (PAF)

1.3.1. Struktur und Funktionen

Ein weiteres physiologisch aktives Phospholipid ist der Platelet-Activating-Factor (PAF). PAF ist ein natürlich vorkommendes Alkylphospholipid. Es wurde 1970 erstmals von dem französischen Immunologen Jacques Benveniste beschrieben^{14,15}. Es handelt sich um ein acetyliertes Glycerophosphorylcholin, welches zunächst inaktiv als 1-O-Alkyl-2-acylglycerophosphocholin vorliegt. Durch die Phospholipase A₂ entsteht Lyso-PAF, welches zu PAF acetyliert wird. Zur Synthese sind fast alle Zellen befähigt, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wie neutrophile und basophile Granulocyten, Makrophagen, Mastzellen und auch Thrombozyten. PAF hat vielfältige Wirkungen und die meisten entsprechen seiner Wirkung als Entzündungsmediatoren. Dazu gehören beispielsweise Vasodilatation und erhöhte Permeabilität der Gefäße, Thrombozytenaggregation sowie Hyperalgesie. An der glatten Muskulatur der Bronchien und des Magen-Darm-Traktes wirkt PAF kontrahierend (Abb. 4).

PAF interagiert dabei mit einem spezifischen membranständigen PAF-Rezeptor¹⁶, der zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Über den PAF-Rezeptor werden sehr viele Signalwege aktiviert. Dazu gehört die direkte oder indirekte Aktivierung der Enzyme MAPK (Extracellular-signal-Related-Kinases ERK: p44^{erk1}, p42^{erk2} und p38), PKC, PLC γ , PLC β , cPLA₂, PLD, PI-3K, Focal-Adhesion-Kinase FAK und die Hemmung der Adenylatcyclase²¹.

Die Inaktivierung von PAF und auch von PAF-ähnlichen Lipiden erfolgt durch Hydrolyse mittels PAF-Acetylhydrolasen (PAF-AH), von denen zwei intrazelluläre Typen (Typ I und II) und ein extrazellulärer Typ beschrieben sind.

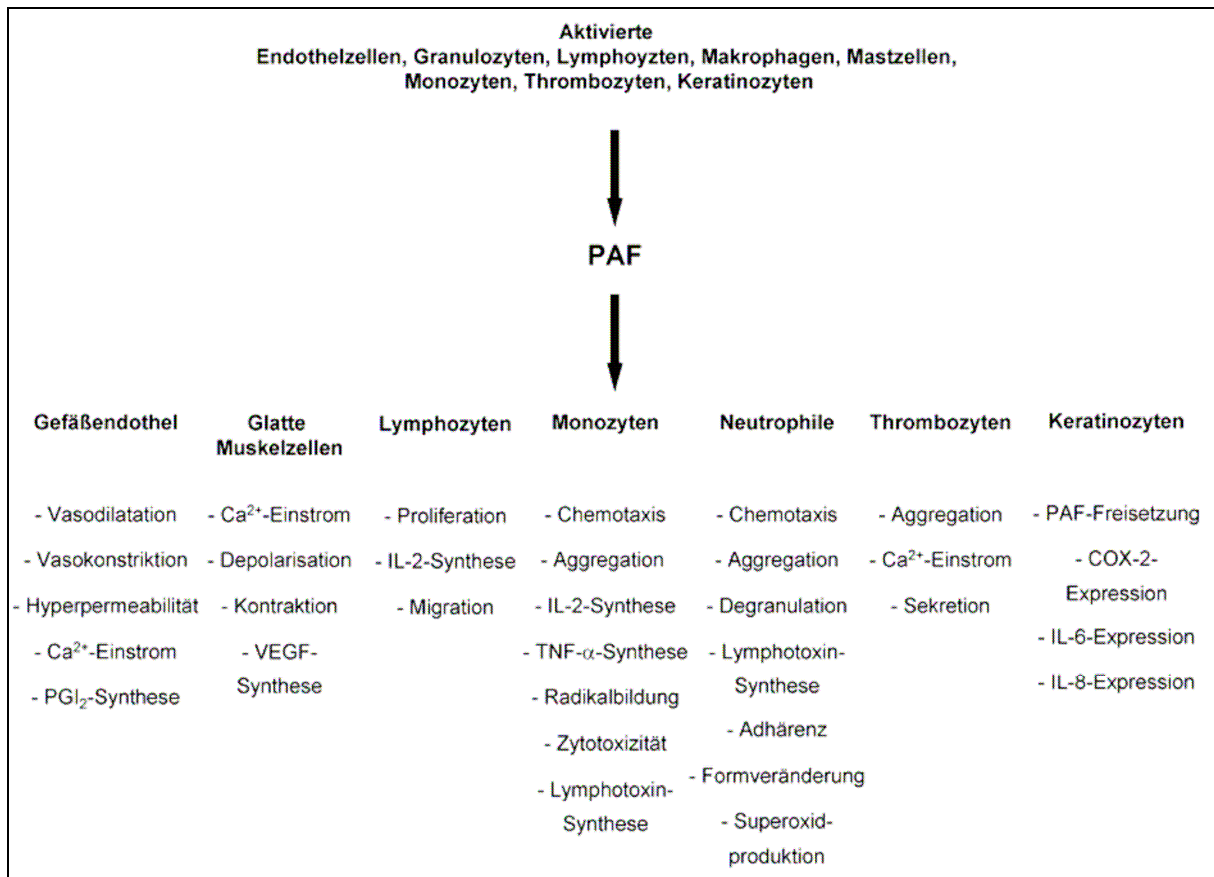


Abb. 4: Einige biologische Wirkungen des Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) auf verschiedene Zelltypen bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen.

Quelle: K. Drößler und D. Gemsa, Wörterbuch der Immunologie, Spektrum Akadem. Verlag Heidelberg, 3. Aufl., 2000.

Diese Enzyme entfernen die Acetylgruppe an der *sn*-2-Position, so dass Lyso-PAF und Acetat entstehen. PAF-AH spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Krankheiten und haben anti-inflammatorische Eigenschaften¹⁷. Insbesondere für die PAF-AH II fand man heraus, dass sie bei oxidativem Stress zur Zellmembran transloziert und dort als ROS-Fänger von oxidierten Phospholipiden ROS-induzierte Apoptose verhindern kann¹⁸. Interessanterweise wurde dieser PAF-AH-Typ auch in humaner Haut gefunden¹⁹. Neben der Hydrolyse von PAF führt die Liganden-stimulierte Degradation des PAF-Rezeptors sowohl über das Proteasom als auch über lysosomalen Abbau zur Desensibilisierung der Zellen gegenüber PAF²⁰.

1.3.2. PAF-Rezeptor-vermittelte Wirkungen auf die Haut

Der PAF-Rezeptor kann auf fast allen Geweben nachgewiesen werden. Im Folgenden werden PAF-Rezeptor-vermittelte Wirkungen auf die Haut detaillierter beschrieben, da humane Keratinozyten in dieser Arbeit als Versuchsmodell dienen.

Humane Keratinozyten besitzen einen funktionalen PAF-Rezeptor und bilden PAF²². Es kann gezeigt werden, dass in Mäusen, die den PAF-Rezeptor überexprimieren (PAF-R-Tg-Mäuse),

die Keratinozytenproliferation beschleunigt ist. Die topische Behandlung mit dem PAF-R-Antagonist WEB2086 führt zu einer geringeren Keratinozytenproliferation. Auch PAF-Rezeptor-negative Mäuse (PAF-R-KO-Mäuse) zeigen keine Auffälligkeiten der Haut²³. Experimente, die *in vitro* mit immortalisierten Keratinozyten (HaCaT-Zellen) durchgeführt werden, zeigen gegensätzliche Ergebnisse. Die Proliferation von auf Kollagen I ausgesäten Zellen in wachstumsfaktorenfreien Medium werden von PAF gehemmt. Dieser antiproliferative Effekt kann mit WEB 2086 blockiert werden. WEB 2086 hat jedoch keine Wirkung auf nicht mit PAF stimulierte Zellen²⁴. PAF scheint somit Einfluss auf das Wachstum von Hautzellen zu haben. Es gibt jedoch widersprüchliche Ergebnisse *in vivo* und *in vitro*.

Es gibt desweiteren Hinweise, dass PAF in die Pathogenese der Psoriasis vulgaris involviert ist. Die Psoriasis vulgaris ist eine genetisch bedingte, schubweise verlaufende, entzündliche Dermatose. Pathogenetisch liegt eine Verhornungsstörung mit überstürzter Zellproliferation und fehlerhafter Ausdifferenzierung vor. Dies führt in erythematösen Plaques zu einer Verbreiterung der Epidermis, verdickter Hornschicht sowie silberweissen Schuppung. In der Haut von Psoriasispatienten werden erhöhte PAF-Konzentrationen gemessen, mit einer abnehmenden Tendenz bei klinischer Besserung²⁵. Bei Untersuchungen zum Einfluss von PAF auf die Differenzierung von Keratinozyten wählt man die Verhornung als Parameter. Vollständig differenzierte Zellen sind verhornt und teilen sich nicht mehr. Es kann gezeigt werden, dass exogenes PAF keinen Einfluss auf die Differenzierung hat. Allerdings kann eine durch WEB 2086 induzierte stärkere Verhornung durch exogenes PAF revidiert werden²⁴. Dies könnte bedeuten, dass PAF die Differenzierung von Keratinozyten hemmt. Dies würde auch die Beteiligung von PAF bei der Psoriasispathogenese erklären, bei der es durch die verzögerte Differenzierung zu mehr Teilungsprozessen kommen kann.

Desweiteren gibt es Hinweise, dass PAF an entzündlichen Prozessen der Haut beteiligt ist. Noxen wie Kälte, Hitze, Chemikalien oder UV-Strahlung stimulieren die PAF-Synthese in Keratinozyten²⁶. Eine durch UV-B-Strahlung oder Chemikalien (Dinitrofluorbenzol, Dithranol) ausgelöste Dermatitis kann durch topische Behandlung mit WEB 2086 signifikant gemildert werden.

1.4. Synthetische Phospholipide

1.4.1. Geschichte der Synthetischen Phospholipide

Durch die von Eibl und Woody ausgearbeiteten Synthesestrategien⁸⁻¹⁰ kann durch schrittweise Einführung von Substituenten, ausgehend von Phosphoroxchlorid, alle wichtigen Phospholipidklassen mit definierter Fettsäureverteilung über die Positionen *sn*-1 und *sn*-2 des Glycerinmoleküls synthetisch hergestellt (R1OH, 1,2-Diacylglycerin) werden. Hergestellt werden zum Beispiel Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerin, -serin, -cholin und -ethanolamin. Mit langkettigen Alkoholen wie z.B. Hexadecanol wird die Synthese immer weiter variiert, so dass alle möglichen Kombinationen aus 1,2-Alky/Acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholinen entstehen¹¹. Mit der Möglichkeit, synthetische Phospholipide strukturell einheitlich herzustellen, können gezielte Untersuchungen über die physikalischen Eigenschaften von Modellmembranen oder über die Phospholipid - Biosynthese in der Zelle durchgeführt werden¹².

Man beobachtet erhebliche Unterschiede im Vergleich zu natürlichen Phospholipiden. Besonders wichtig ist hierbei die zu beobachtende verzögerte Metabolisierung synthetischer Alkylphosphocholine. Während die Halbwertszeit für natürliches Lysolecithin etwa 1h beträgt, kann bei synthetischen Alkylphosphocholinen eine Halbwertszeit von bis zu 70h beobachtet werden. Ursächlich dafür ist die Alkygruppe am C₁ des GlycerinGrundgerüsts, die gegenüber der Phospholipase A₁ stabiler ist, als eine Acylverbindung wie sie das Lysolecithin aufweist. Desweiteren hat die Kettenlänge der Alkygruppe Einfluss auf den amphiphilen Charakter der Phospholipide und damit über die Substanzverteilung in den einzelnen Zellbestandteilen¹³.

Der antiproliferative Effekt von Phospholipidanaloga kann an verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Dazu gehören Karzinome der Prostata, der Blase, des Kolons, der Gallenblase, der Brust, des Cervix, der Ovarien, der Lunge sowie Sarkome, Leukämien und Hirntumoren²⁷⁻²⁹.

Bei weiteren Synthesen von Alkylphospholipiden wird die *sn*-1-O- Alkylbindung des Platelet-Activating-Factor (PAF) aufgrund seiner metabolischen Stabilität und physiologischen Aktivität bevorzugt eingesetzt. Die chemischen Strukturen der meisten gebräuchlichen Phospholipidanaloga leiten sich somit von Lysophosphatidylcholin oder Lysoplatelet-Activating-Factor (LysoPAF) ab.

Eine der ersten Verbindungen, die entsteht, ist 1-Octadecyl-2-O-methyl-3-glycerophosphocholin (ET-18-O-CH₃). Es handelt sich um ein PAF-Analogen, dessen Acylgruppe an Position *sn*-2-O durch eine stabile Methoxygruppe ausgetauscht wird. Viele Experimente zum Wirkmechanismus von Phospholipidanaloga werden mit ET-18-O-CH₃ durchgeführt. Desweiteren dient es als Ausgangssubstanz zur Synthese weiterer antiproliferativ wirksamer Phospholipidanaloga.

Zunächst hält man am GlycerinGrundgerüst fest und modifiziert die Substituenten an *sn*-1-O- bzw. *sn*-2-O-Position. Dazu zählen Ethoxy- und Methoxy-Modifikationen, aber auch Aminomethyl-, Amid-, Sulfinyl-, Sulfonyl-, Sulfon- oder Carbamatmodifikationen.

In weiteren Ansätzen werden die Phosphatgruppe der Phosphocholin- Kopfgruppe durch Thiophosphat, Phosphonat, Carboxylat, Carbamat und Sulfonamid ersetzt oder ganz entfernt. Die dadurch entstehenden Verbindungen, weisen Antitumor-Eigenschaften auf oder fördern die Differenzierung unreifer Blutzellen³⁰.

Schließlich werden auch das GlycerinGrundgerüst durch verschiedenste lineare Strukturen ersetzt. Dazu gehören Ethylenglykol, Ethanolamin, 1,2-Alkandiol, 3-Amino-1,2-Propandiol,

3-Mercapto-1,2-ropandiol, 1,2,4-Butantriol, 2-Amino-3-Mercapto-2-Propanol sowie Hexadecylphosphocholin (HePC). HePC zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* selektiv antineoplastische Aktivität und wird bereits in mehreren klinischen Studien untersucht. Beispielsweise gegen klassische Leukämiezellen wie Raji, HL60 (humane, pro-myeloide, leukämische Zellen; $IC_{50} = 92\mu\text{M}$), U937 und K562 (humane, chronische myeloide, leukämische Zellen; $IC_{50} = 132\mu\text{M}$). Desweiteren Daudi (humane B-Zell Leukämie; $IC_{50} = 109\mu\text{M}$) und Swiss 3T3 (Fibroblasten; $IC_{50} = 65\mu\text{M}$)³¹⁻³⁴. Ausgeprägte *in vivo*-Aktivität zeigt HePC am auf die Nacktmaus transplantierten humanen Lippenkarzinom (KB-Tumor) sowie am induzierten Mammakarzinom der Ratte. Dabei werden die Tiere täglich oral mit 32mg/kg HePC behandelt. HePC wird im Magen-Darm-Trakt fast vollständig resorbiert und führt bei diesem Tumormodell bereits nach 14-tägiger Therapie zu einer deutlichen Reduktion des Tumolvolumens, nach 28 Tagen wurden komplette Remissionen beobachtet³⁵⁻³⁷.

Eines der wichtigsten Merkmale der Behandlung im Vergleich zu einer klassischen Chemotherapie mit Alkylanzien ist die Tatsache, dass unerwünschte Wirkungen wie Haarausfall und vor allem die Hämatotoxizität mit Leukopenie und Thrombopenie nicht beobachtet werden. Es werden im Gegenteil sogar Leukozytosen und auch Thrombozytosen beobachtet³⁸. Dies bedeutet einen erheblicher Fortschritt in der Antitumorthherapie, da besonders die Hämatotoxizität bisher zu vermehrter Sterblichkeit führt. Durch die entstehende Leukopenie werden gehäuft Infektionen, besonders mit opportunistischen Keimen hervorgerufen, die nur schwer zu behandeln sind. Die Patienten müssen bis zur Normalisierung des Blutbildes in Einzelisolation bleiben, was eine starke psychische Belastung bedeutet. Die bessere Verträglichkeit der Alkylphosphocholine für das Knochenmark stellt somit sowohl für Patienten als auch für das Klinikpersonal eine erhebliche Erleichterung dar.

Während die meisten gebräuchlichen Zytostatika die DNS (z.B. Cisplatin), das Zytoskelett (z.B. Vinblastin) oder den mitotischen Spindelapparat (z.B. Taxol) als Angriffspunkt haben und damit indirekt in den Zellzyklus eingreifen (siehe oben), akkumulieren Phospholipidanaloga in der Plasmamembran, und man geht davon aus, dass darüber ein großer Teil ihres antiproliferativen Effektes vermittelt wird³⁹⁻⁴². Es gibt aber auch Hinweise, dass sich die Phospholipidanaloga intrazellulär verteilen. So inhibieren HePC und ET-18-O-CH₃ die Synthese und Translokation von Phosphocholin auf der Ebene der Cytidyltransferase, einem im Nukleus lokalisiertem Enzym⁴⁵⁻⁴⁹. Desweiteren induziert ET-18-O-CH₃ die Expression der Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun in humanen Leukämiezellen sowie c-fos und zif/268 in Astrogliazellen der Ratte. Dies kann bedeuten, dass ET-18-O-CH₃ bis in den Nukleus vordringt^{43,44}.

1.4.2. Glc-PC und Glc-PAF

Aufgrund der hohen Zytotoxizität der Phospholipidanaloga ist ihre klinische Anwendung beschränkt. Bedingt ihrer amphiphilen Eigenschaft können sie die Zellmembran nicht nur inserieren, sondern diese bei ausreichender Konzentration auch lysieren. Arthur und Bittman²⁸, die sich mit dem Einfluß von strukturellen Veränderungen an Etherlipiden auf die Zytotoxizität beschäftigt haben, geben den Anstoß die Wirkstoffgruppe der Phospholipidanaloga mit in das Forschungsgebiet der kohlenhydrathaltigen Wirkstoffe einzubeziehen.

Modellrechnungen zeigen, dass Hexadecylphosphocholin große strukturelle Ähnlichkeit mit natürlichem 2-Lysophosphatidylcholin (2-LPC) aufweist. Eine vergleichbare pharmakologische Aktivität beider Lipide wäre zu erwarten, würde 2-LPC nicht schneller

metabolisiert werden. Um 2-LPC vor dem Metabolismus zu schützen, wird es an der freien Hydroxylgruppe an der *sn*-2-O-Position glucosidiert⁵⁰. Dieses an *sn*-2-O glycosidisch mit D-Glucose substituierten Lecithin Glc-PC war ein bis dahin nicht beschriebenes Glyceroglycophospholipid (Abb.5), welches dem HePC vergleichbare pharmakologische Eigenschaften besitzen sollte. Es sollte darüber hinaus weniger toxisch sein. Durch den Einfluss des integrierten Kohlenhydrates könnte Glc-PC desweiteren eine andere Membranaktivität aufweisen⁵⁰.

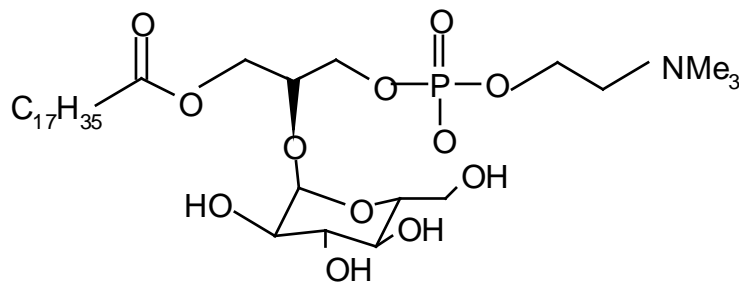


Abb. 5: Glc-PC (1-Stearoyl-2-O- α -D-glucopyranosid-*sn*-glycero-3-phosphocholin)

In biologischen Tests zeigt sich, dass Glc-PC die Proliferation konfluenter humaner Keratinozyten (HaCaT) bei einer Konzentration von 10 μ M um bis zu 80% inhibiert, ohne die Viabilität zu beeinflussen.

Diese Untersuchungen motivieren zu weiteren Synthesen glucosidierter Phosphatidylanaloga. Unter anderem wird auch ein glukosehaltiges Analog des PAF synthetisiert (Glc-PAF) (Abb. 6). Hier wird die Acylgruppe an der *sn*-2-O-Position des Glyceringerüsts von PAF durch Glukose ausgetauscht.

Glc-PAF inhibiert die Proliferation konfluenter HaCaT-Zellkulturen bereits bei einer Konzentration von 4,8 μ M. Die LD₅₀ von Glc-PAF ist 9 μ M. Damit ist Glc-PAF deutlich toxischer als Glc-PC, dessen LD₅₀ mit 17 μ M bestimmt werden kann⁵³.

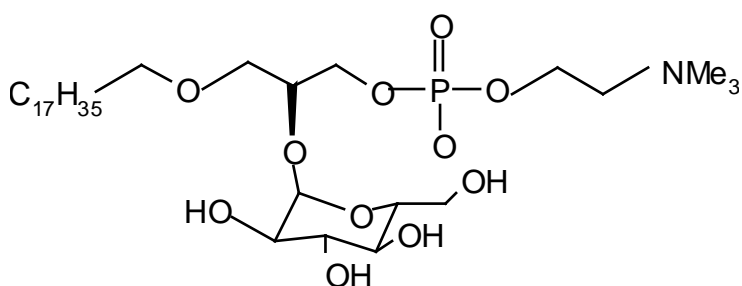


Abb. 6: Glc-PAF (1-O-Octadecyl-2-O- α -D-glucopyranosid-*sn*-glycero-3-phosphocholin)

In detaillierteren Untersuchungen kann gezeigt werden, dass Glc-PAF in niedrigen, nicht toxischen Konzentrationen von 1,5 μ M bis 7,5 μ M Apoptose in HaCaT-Zellen auslöst. Bei höheren Konzentrationen von Glc-PAF nimmt die Anzahl apoptotischer Zellen ab, was als Zelllyse gedeutet wird⁵³.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus werden Untersuchungen mit künstlichen Membranen durchgeführt. Es zeigt sich, dass sowohl Glc-PC als auch Glc-PAF in die Membran

eingelagert werden und in höheren Konzentrationen zu Membranläsionen führen. Dies führt weiter zur Ruptur der Membran und schließlich zum Zelltod¹³. Glc-PAF wirkt dabei schon in geringerer Konzentration als Glc-PC.

Diese Untersuchungen geben desweiteren Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Wirkung und Struktur der glucosidierten Phospholipidanaloga. Man vergleicht Glc-PC und Glc-PAF mit glucosidierten Phospholipidanaloga mit variabler Länge der Alkylkette an der *sn*-1-O-Position. Während Glc-PAF-Analoga mit einer Alkylkette von C-16 (ET-16) bzw. C-14 (ET-14) im gleichen Maße wie Glc-PAF in die Membran eingelagert werden, kann dies für das Analogon mit einer Kettenlänge von C-12 (ET-12) nur eingeschränkt beobachtet werden. ET-12 zeigte in biologischen Tests mit HaCaT-Zellen selbst in hoher Konzentration von 80µM keinen Einfluss auf die Zellproliferation bzw. Viabilität. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass für den antiproliferativen Effekt vor allem die Länge der Alkylkette von Bedeutung ist. Es zeigt sich auch ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit in Membranen zu interkalieren und dem der antiproliferativen Effektivität¹³.

1.5. Mechanismen der synthetischen Phospholipide

1.5.1. Signalübertragung über die Zellmembran

Viele Wirkungen der Phospholipidanaloga werden durch deren Interferenz mit einer Reihe von Schlüsselenzymen des Lipidstoffwechsels und zellulären Signalkaskaden vermittelt. Viele dieser Ziel-Enzyme sind dabei an der Plasmamembran lokalisiert. Im Folgenden ein kurzer Überblick über die Mechanismen, die eine Signalübertragung über die Plasmamembran ermöglichen und damit Einfluss auf die Zellproliferation haben.

Stark vereinfacht unterscheidet man vier Mechanismen²⁸:

1. Das Liganden-gekoppelte Rezeptorsystem, bei dem das Binden eines Liganden am Rezeptor zum Öffnen eines Ionenkanals führt und spezifische Ionen die Plasmamembran passieren können.
2. Das Second-Messenger-System, bei dem Ligandenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptors auslöst und ein G-Protein aktiviert. Dieses aktiviert einen weiteren Effektor, z.B. ein Enzym, um einen Second-Messenger wie zyklisches AMP (cAMP), IP3 oder DAG zu generieren. Über diese werden dann weitere zelluläre Proteine moduliert.
3. Rezeptoren mit integrierter Enzymaktivität. Dazu gehören Tyrosinkinase, Tyrosinphosphatase, Guanylatzyklase und Serin/Threoninkinasen.
4. Singel-pass-Rezeptoren, die mit einer Tyrosinkinase assoziiert sind, die keine intrinsische Aktivität hat. Dazu gehören Rezeptoren der Zytokine.

Ein bekannter Signalweg zur Regulation von Proliferation und Differenzierung ist die MAPK-Kaskade. Die MAPK-Kaskade wird über Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Wachstumsfaktoren wie der epidermal-growth-factor (EGF) binden an ihren Rezeptoren in der Plasmamembran. Über Dimerisierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen. Die Phosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste führt zur Bildung von Bindungsstellen für SH2- oder PTB-Domänen spezifischer Proteine. Grb2 bindet mit seiner SH2-Domäne an diese Bindungsstellen und bringt über seine SH3-Domäne das Protein Sos zur Plasmamembran. Sos aktiviert Ras durch Austausch von GDP gegen GTP. GTP gebundenes Ras unterstützt dann die Translokation von Raf-1 an die Membran, wo es aktiviert wird. Raf-1 phosphoryliert die MAPK-Kinase, die die MAPK aktiviert. Aktivierte MAPK phosphoryliert zytoplasmatische Proteine und wandert in den Zellkern, wo sie über Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung hat²⁸.

1.5.2. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die MAPK-Aktivität

Eine signifikante Inhibition der MAPK-Aktivität kann in EGF- oder Serum-stimulierten MCF-7 Zellen durch ET-18-O-CH₃ beobachtet werden⁶¹. Der Angriffspunkt in dieser Kaskade ist für ET-18-O-CH₃ die Translokation von Raf-1 zur Zellmembran. Raf-1 besitzt Bindungsstellen für die Phospholipide der Zellmembran, Phosphatidylserin und Phosphatidsäure. Vermutet wird, dass durch ET-18-O-CH₃ die Interaktion von Raf-1 mit den Phospholipiden gehemmt wird²⁸.

Aktiviert wird die MAPK außerdem durch die Proteinkinase C (PKC). Die Proteinkinase C wird wie oben kurz beschrieben durch DAG und intrazellulärem Ca²⁺-Anstieg aktiviert. Für

den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum ist der Second Messenger IP3 verantwortlich. DAG und IP3 werden aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) mit Hilfe der Phosphatidylinositol-abhängigen Phospholipase C (PI-PLC) gebildet. Die PI-PLC kann in Swiss- und NIH3T3-Zellen, sowie in BG-1-Ovarialkarzinomzellen durch ET-18-O-CH₃ und HePC gehemmt werden²⁷. Damit wird indirekt die PKC gehemmt. Je nach verwendeter Zelllinie und synthetischen Phospholipid sind jedoch unterschiedliche Effekte auf die PKC beschrieben worden^{62,63,51}. Anionische und ungeladene Lipide mit Tensidcharakter können die PKC aktivieren. Kationische und ungeladene Lipide, die die Membran stabilisieren, inhibieren die PKC⁶⁴. Im Gegensatz dazu konkurrieren Alkylmethylglycerole, die Metabolite der Etherlipide, mit DAG und Phorbolestern um die Bindungsstelle an der PKC⁶⁵⁻⁶⁷. Für Glc-PC kann gezeigt werden, dass es durch niedrige Konzentrationen die PKC-Aktivität bis zu 70% steigert. Bei hohen, toxischen Konzentrationen blieb die Aktivität der PKC unbeeinflusst⁵⁰.

1.5.3. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) und die Phospholipase D (PLD)

Neben der gut untersuchten PI-PLC gibt es noch andere Phospholipasen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Dazu gehören die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) und die Phospholipase D. Aktivierte PC-PLC hydrolysiert Phosphocholin zu DAG, welches wiederum die PKC aktiviert. Phospholipidanaloga haben in Untersuchungen in NIH 3T3-Zellmembranen einen geringen Einfluss auf die Aktivität der PC-PLC⁵¹.

Umstritten ist dagegen der Effekt der Phospholipidanaloga auf die PLD. PLD ist am Phospholipid-Turnover, der DAG-Produktion und der Generierung von Phosphatidsäure beteiligt. Ihre Aktivität wird von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Tyrosinkinase und durch die PKC beeinflusst. Untersuchungen zum Einfluss von ET-18-O-CH₃ auf die PLD-Aktivität in Präparationen von NIH 3T3-Zellmembranen zeigen bei nicht-toxischen Konzentrationen keine Beeinträchtigung der PLD-Aktivität. In intakten Zellen dagegen kann in Anwesenheit höherer Konzentrationen eine Aktivierung der PLD festgestellt werden⁵¹. Andere Untersuchungen, die mit CCD-986-SK-Zellen durchgeführt werden, zeigen sowohl mit ET-18-O-CH₃ als auch mit HePC eine Aktivierung der PLD-Aktivität⁵².

1.5.4. Einfluss der Phospholipidanaloga auf den Phospholipidmetabolismus

Ein von der PKC und MAPK unabhängiger Weg, das Zellwachstum mit synthetischen Phospholipiden zu beeinflussen, führt über die Inhibition des Phospholipidmetabolismus. Die Produktion der Phospholipide findet im Wesentlichen in der S-Phase des Zellzyklus statt und ist eine Voraussetzung für die Zellteilung, da sie den Hauptbestandteil der Zellmembran bilden. HePC hemmt das für die Phospholipidsynthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym Phosphocholincytidyltransferase (CDP)⁷⁴. Die Phospholipidsynthese wird dabei nicht direkt gehemmt, sondern seine Translokation vom Zytosol zur Membran wird unterbunden.

1.5.5. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Endozytose

Ein Erklärungsversuch für die erhöhte Zytotoxizität der Phospholipidanaloga gegenüber bestimmten Tumorzellen wie z.B. leukämische Blasten ist die erhöhte Endozytoserate von Phospholipidanaloga im Vergleich zu normalen Zellen⁵⁴. Zunehmende Zelldifferenzierung vermindert dagegen die Aufnahme von z.B. ET-18-OCH₃ und seine Zytotoxizität⁵⁵. Die Zytotoxizität kann jedoch auch auf Zelllyse beruhen. Mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer konnte gezeigt werden, dass Etherlipide in Liposomen interkalieren. Sie erzeugen in höheren Konzentrationen Membranläsionen, die letztlich zur Ruptur der Membran und zum Zelltod führen. Die Zelllyse wird dabei durch Freisetzung des Enzyms Laktatdehydrogenase verfolgt¹³.

1.5.6. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Apoptose

In weiteren Untersuchungen kann gezeigt werden, dass Etherlipide auch Apoptose auslösen können. Bei Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch ET-18-O-CH₃ in myeloiden HL60- und t-lymphoiden Jurkat-Leukämiezellen kann neben typischen morphologischen Apoptosezeichen in den Zellen der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, als Voraussetzung zur Cytochrom C-Freisetzung, beobachtet werden. Es folgt die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wie Peroxide und Radikale, Caspase-3-Aktivierung und DNS-Fragmentierung. Beim Einsatz von ET-18-O-CH₃ bei ET-18-O-CH₃-resistenten Jurkatzellen, bei Überexpression des Apoptosesuppressors Bcl-2 oder bei Behandlung mit den Analoga ET-18-OH und ET-18-H können die Apoptosezeichen nicht beobachtet werden. Diese Effekte weisen darauf hin, dass ET-18-O-CH₃ in Leukämiezellen die Apoptose über den zweiten, mitochondrialen Weg induziert und Bcl-2, das vorwiegend in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, die Aktivierung der Apoptose durch ET-18-O-CH₃ verhindert⁵⁶. Untersuchungen mit Glc-PAF zeigen, dass bei niedrigen, bereits antiproliferativ wirkenden Konzentrationen von 1,5 bis 7,4µM die Zahl apoptotischer Zellen bis auf das zehnfache erhöht wird⁵⁶.

1.5.7. Einfluss der Phospholipidanaloga auf den Zellzyklus und das Immunsystem

ET-18-O-CH₃ hemmt Zellen daran den Zellzyklus zu durchlaufen. Sie werden am Übergang von der G₂- zur M-Phase gehemmt, in der G₁-Phase arretiert oder sind im Übergang von der S- zur G₂-Phase verlangsamt^{57,58}. Zellen, die trotzdem den Zellzyklus vollständig durchlaufen, weisen eine fehlerhafte Zellteilung auf. Eine Ursache der beobachteten Makrophagenaktivierung durch Phospholipidanaloga könnte eine Einflussnahme auf deren Zytokinaktivität sein. Bei der *in vitro*-Reifung von Monozyten zu Makrophagen, verlieren die Zellen ihre Fähigkeit als Antwort auf bakterielle Lipopolysaccharide Interleukin-1 auszuschütten. Dieser Schritt wird durch die Behandlung der Zellen mit ET-18-O-CH₃ unterdrückt. Außerdem wird beobachtet, dass ET-18-O-CH₃ und auch PAF die Sekretion des Tumornekrosefaktors bei Monozyten erhöhen. HePC steigert dagegen die Ausschüttung von Interferon γ sowie von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und hat so über die Stimulation der Hämatopoese Einfluss auf das Immunsystem^{59, 27}.

1.5.8. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Differenzierung und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration

Darüber hinaus regen Phospholipidanaloga in einigen Tumormodellen die Zellen zur Differenzierung an. HePC und ET-18-O- CH_3 induzieren in humanen HL-60-Zellen und M1-Zellen (myeloblastische Leukämie-Zellen) die Bildung reifer Granulozyten und Makrophagen^{30,60}. In neutrophilen Granulozyten kann desweiteren durch ET-18-O- CH_3 , ET-16-OCH₃ und Lyso-PAF ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg ausgelöst werden. Vermutet wird eine direkte Interaktion mit den Ca^{2+} -Kanälen des endoplasmatischen Retikulum^{70,71}. Auch in Fibroblasten kann dies beobachtet werden, jedoch nur in serumfreiem Medium⁶⁶. Bei längeren Inkubationszeiten kann die Calcium-Freisetzung gehemmt werden, was auf die Inhibition der Phosphatidylinositol-Hydrolyse zurückgeführt werden könnte^{72,73}.

1.5.9. Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)

Das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositiden an der 3-OH-Gruppe des zyklischen Polyalkohols. Die verschiedenen 3-OH-phosphorylierten Phosphatidylinositide scheinen in komplexen Signalwegen in der Zellproliferation und im Metabolismus eine wichtige Rolle zu spielen⁶⁸.

Sowohl ET-18-O- CH_3 als auch HePC erweisen sich *in vitro* als potente Inhibitoren der PI3-Kinase. So zeigt sich bei Inkubation von NIH-3T3-Zellen mit ET-18-O- CH_3 für 30min vor PDGF-Stimulation eine signifikante Reduktion des Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphats⁶⁹.

1.5.10. Einfluss der Phospholipidanaloga auf den PAF-Rezeptor

Inwiefern Phospholipidanaloga ihre Wirkung über den PAF-Rezeptor ausüben, ist noch nicht ausreichend geklärt. Der PAF-Rezeptor gehört zu den G-gekoppelten Rezeptoren. Nur das natürlich auftretende R-Isomer ist am Rezeptor aktiv, nicht jedoch das S-Enantiomer. Lecithine mit kurzer Alkylkette an *sn*-2-O zeigen eine geringe Aktivität. Bei PAF-Strukturvarianten ist eine Wirkung über den Rezeptor anzunehmen. Dagegen können Analoga ohne Glycerinrundgerüst wie die Alkylphosphocholine aufgrund der Strukturunterschiede zu PAF nicht an den Rezeptor binden und somit auch nicht über ihn wirken.

1.6. Alternative Anwendungsgebiete

1.6.1. Behandlung der Leishmaniasis

Bei der Leishmaniasis handelt es sich um eine Erkrankung, die weltweit etwa 12×10^6 Menschen betrifft. Jährlich werden etwa 2×10^6 Menschen neu infiziert, von denen etwa 5×10^5 an der viszeralen Leishmaniasis (Kala Azar) erkranken, einer besonders schweren und ohne Behandlung tödlich verlaufenden Form.

Geographisch tritt die Erkrankung in tropischen und subtropischen Zonen auf, dringt zunehmend aber auch in südeuropäische Länder wie Spanien, Südfrankreich und Italien vor. Die Leishmaniasis präsentiert sich in unterschiedlichen Erscheinungsformen. Insbesondere die viszerale Leishmaniasis - hervorgerufen durch den Erreger *Leishmania donovani* - ist gefährlich und lebensbedrohend. Die Parasiten siedeln sich in Leber, Milz und Knochenmark an und vermehren sich rasch. Neben der viszeralen Form gibt es auch die kutane Leishmaniasis, die zu geschwürartigen Hautveränderungen und im Gesicht teilweise zu vollkommener Entstellung führen. Doch heilen die kutanen Formen meist von selbst ab und sind nicht lebensbedrohend. Die bisherige Therapie ist sehr aufwendig. Die Patienten werden intravenös mit Antimon- Verbindungen, z.B. Pentostam, behandelt, die viele Nebenwirkungen haben. Nach WHO-Schätzung zeigen etwa 40% der Erkrankten in Indien eine Resistenz gegenüber den Derivaten. Außer der Antimontherapie wird auch Amphotericin B eingesetzt. Die intravenöse Verabreichung erfordert aber auch hier einen langen stationären Aufenthalt. Ende der 80iger Jahre werden in der Uniklinik in Göttingen die ersten tierexperimentellen Untersuchungen mit HePC an mit *Leishmania donovani* infizierten Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse der Therapieversuche im Vergleich zu Kontrollen mit Antimon-Präparaten sind für HePC erfolgversprechend⁷⁵. Die Ergebnisse geben Anlass, HePC (Miltefosine) oral für die Behandlung der viszeralen und kutanen Leishmaniasis weiter zu entwickeln. Die erste Pilotstudie an 30 Patienten mit Kala Azar in Indien zeigt eine hohe Effektivität und eine gute Verträglichkeit von Miltefosine⁷⁶. In einer klinischen Phase II-Studie mit 120 Kala-Azar-Patienten wird über einen Zeitraum von 3 Wochen täglich mit einer Dosis von 50-200 mg Miltefosine behandelt. Es kann bei 95% der Patienten eine durch zytologische Milzpunktion gesicherte Parasitenfreiheit festgestellt werden.

1.6.2. Verwendung synthetischer Phospholipide zu Herstellung von Liposomen

Eine völlig andere Anwendungsform für Phospholipide ist die Einbindung in Trägersysteme, um ein verbessertes Targeting zu erzielen und dadurch auch eine Minimierung des Wirkstoffes zu erreichen. Auf die Eigenschaft der Phospholipide, in wässriger Lösung membranartige Strukturen zu bilden, wurde schon eingegangen. Durch einfache Verfahren wie Ultraschall, Dialyse und Hochdruck-Homogenisation lassen sich multilamellare Vesikel in kleine kugelförmige Gebilde, Liposomen, überführen. Diese Strukturen besitzen ein wässriges Innenvolumen, das auch nach außen durch eine Phospholipid-Doppelschicht abgetrennt ist. Liposomen mit einem Durchmesser von kleiner als 200 nm werden als SUVs (small unilamellar vesicles) bezeichnet. SUVs sind von pharmazeutischen Interesse, da Arzneistoffe je nach Hydro- bzw. Lipophilie in das wässrige Innenvolumen oder in die

Lipidmembran integriert werden können. Damit können auch die bis jetzt schwer zugängliche Gebiete wie die sehr lipophile Hornschicht-Barriere der Haut besser erreicht werden^{77,78}. Aber auch der Wirkstofftransport über die Blutbahn, zur parenteralen Behandlung von schweren Infektionen ist ein neues Gebiet für die sich Liposomen bzw. Lipidnanopartikel gut eignen⁷⁹. Desweiteren können die Tight-Junctions der Blut-Hirn Schranke, die für die meisten Substanzen eine hohe Barriere darstellt, von lipophilen Substanzen in freier Diffusion überwunden werden. Somit stellen neuartige Trägersysteme aus Lipiden eine Möglichkeit dar, schwere Erkrankungen des ZNS durch ein besseres Targeting wirksamer zu behandeln⁸⁰. Bereits als Arzneimittel zugelassen sind die in Liposomen eingebetteten Zytostatika Doxorubicin und Daunorubicin oder auch das Antimykotikum Amphotericin B.

1.6.3. Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen, Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis ist eine entzündliche Dermatose, die sich durch Hyperproliferation und parakeratotische Verhornung auszeichnet. Ca. 2-5% der Bevölkerung haben die Disposition, auf bestimmte Reize wie Infektionen, Medikamente, Stress oder Hautläsionen mit der Ausbildung von Psoriasisherden zu reagieren. Klinisch imponieren gerötete, scharf begrenzte, schuppige Herde. Die Patienten leiden gelegentlich unter Juckreiz und Brennen. Prädispositionsstellen der Psoriasis sind mechanisch belastete Körperregionen wie die Streckseiten der Extremitäten, die Steißregion und der behaarte Kopf. Von der Hyperproliferation werden auch die Nägel betroffen. Psoriatische Nagelveränderungen können sich in Form von Tüpfelnägeln, Ölflecken, onycholytischen Vorgängen oder als fehlendes Nagelhäutchen manifestieren. Histologisch finden sich Hyperkeratose, Parakeratose und Akanthose. Außerdem kommt es zu Einwanderungen von neutrophilen Granulozyten in die Epidermis. Die Pathogenese ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Man geht davon aus, dass es sich um eine immunologische Systemerkrankung handelt, die sich hauptsächlich in der Haut abspielt. T-Lymphozyten spielen dabei eine zentrale Rolle. Die Einsicht, dass es sich um eine immunologische Erkrankung handelt, hat zur Entwicklung einer Reihe neuer biologischer Medikamente geführt. Seit 2005 sind Infliximab, Etanercept und Efalizumab zur Behandlung von Psoriasis bei Erwachsenen zugelassen. Infliximab ist ein Antikörper, der sowohl löslichen als auch transmembranären Tumornekrosefaktor α (TNF α) bindet. Nach 12 Wochen Behandlung zeigten 82 % der Patienten eine bis zu 75%-ige Verbesserung der Hautsymptome und eine deutlich verbesserte Lebensqualität. Bei Etanercept handelt es sich um einen löslichen TNF α -Rezeptor, der frei zirkulierendes TNF α bindet. Bei dieser Behandlung zeigte circa ein Drittel der Patienten eine bis zu 75%-ige Besserung. Efalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch die Untereinheit CD11a des Lymphocyte-Function-Associated-Antigen-1 (LFA-1), ein Leukozytenintegrin, bindet. Dies verhindert die Bindung von LFA-1 an den Liganden ICAM-1 (Intercellular-Adhesion-Molecule-1), was wiederum die Adhäsion von T-Lymphocyten an antigenpräsentierenden Zellen und Endothelzellen inhibiert. LFA-1 findet man auf aktivierten Lymphocyten, wohingegen ICAM-1 auf Endothelzellen und Keratinozyten in Psoriasisplaques hochreguliert wird. Auch hier ist nach einer 12-wöchigen Behandlung bei einem Drittel der Patienten eine 75%-ige Verbesserung eingetreten⁸¹. Auf Hinweise, dass auch PAF eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielt, wurde schon unter 1.3.2. eingegangen.

1.7. Zielsetzung

Nachdem in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass die glucosidierten Phospholipidanaloga Glc-PAF und Glc-PC die Proliferation von HaCaT-Zellen beeinflussen können, soll im Weiteren geklärt werden, ob auch andere physiologische Prozesse durch glucosidierte Phospholipidanaloga beeinflusst werden. Dazu zählt die Zell-Matrix-Adhäsion und Zellmigration. Ihnen liegen komplexe Signaltransduktionen zugrunde, die eng miteinander verknüpft sind. Um Hinweise auf mögliche, durch die Phospholipide angesprochene Signalwege zu erhalten, sollen zellbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu wurde die HaCaT-Zelllinie ausgewählt, auf der auch schon in vorherigen Versuchen der antiproliferative Effekt der Phospholipide beobachtet werden konnte. In Adhäsionsassays auf verschiedenen extrazellulären Matrices soll der Einfluss der Phospholipide auf die Zell-Matrix-Adhäsion untersucht werden.

Die Migration, als weitere Zellfunktion vor allem basaler Keratinozyten, soll unter Einfluss der Phospholipide in haptotaktischen Migrationsassays untersucht werden. Inwieweit der beobachtete antiproliferative Effekt durch zytotoxische Eigenschaften der Substanzen überlagert wird, ist außerdem Gegenstand dieser Arbeit. Weitergehende biochemische Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die von den glucosidierten Phospholipidanaloga moduliert werden, leisten.