

Teil I

Einleitung und Zielsetzung

1 Antitumorlipide

In der Literatur werden sowohl natürliche Etherlipide, verwandte synthetische Antitumor-Etherlipide (AEL) und Alkylphosphocholine (APC) als Antitumor-Lipide (ATL) zusammengefasst (Houlihan et al., 1995). Der plättchenaktivierende Faktor (PAF) gehört zu den natürlichen Etherlipiden, 1-Octadecyl-2-O-methyl-3-glycerophosphocholin (ET-18-OCH₃; Edelfosine[®]) ist ein Beispiel für die synthetischen Antitumor-Etherlipide. Zu dieser Gruppe ist auch das neuartige Inositol-C2-PAF zu zählen. Hexadecylphosphocholin (HePC; Miltefosine[®]) ist ein Vertreter der Alkylphosphocholine (Abb. 1.1).

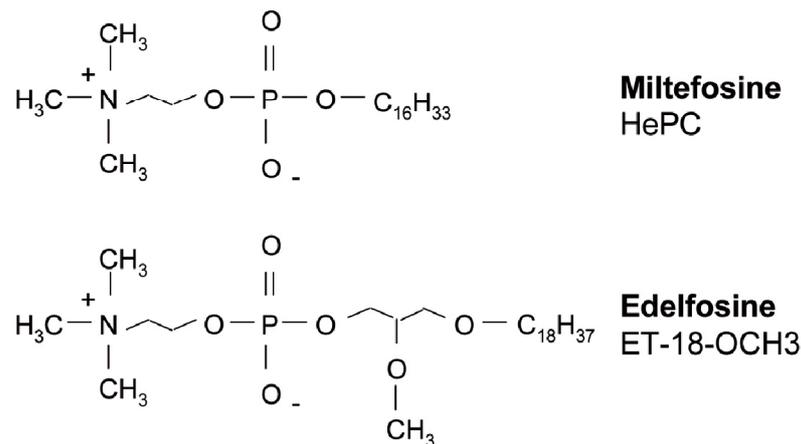


Abbildung 1.1: Strukturformeln HePC und ET-18-OCH₃

Die ersten Berichte über das aktivierende Potential von 2-Lysophosphatidylcholin (2-LPC) auf Makrophagen stammen von Fischer und Mitarbeitern aus den 60er Jahren. Sie zeigten, dass durch Aktivierung von Phospholipase A₂ oder die Gabe kleiner Mengen von 2-LPC, die phagozytotische Aktivität von Makrophagen *in vitro* und *in vivo* gesteigert werden kann. 2-LPC wird durch Lysophospholipasen zu Glycerolphosphorylcholin (GPC) oder durch Acyltransferasen zu Phosphatidylcholin (PC) umgesetzt. Aufgrund dieser geringen metabolischen Stabilität wurde nach Derivaten geforscht, die für die klinische Erforschung

und Erprobung geeigneter sind (Munder et al., 1966; Munder et al., 1973; Herrmann et al., 1986).

An Nagetieren wurden synthetische Antitumorlipide bereits erfolgreich zur Behandlung verschiedener Tumore getestet. Dazu gehören Karzinome der Prostata, der Blase, des Kolons, der Gallenblase, der Brust, des Cervix, des Uterus, der Ovarien, der Lunge sowie Sarkome, Leukämien und Hirntumore (Houlihan et al., 1996; Tarnowski et al., 1978; Storme et al., 1985).

Durch den Austausch der Acylgruppen der synthetischen Antitumorlipide gegen Alkylgruppen gelang die Synthese stabiler Verbindungen. Unter diesen Verbindungen ist 1-Octadecyl-2-O-methyl-3-glycerophosphocholin (Edelfosine[®]) eine der Ausgangsverbindungen der Alkyletherlipide. An Edelfosine[®] wurden die Wirkungsweisen und der Einfluss chemischer Modifikationen auf die Wirksamkeit dieser neuen Wirkstoffklasse untersucht. Im Folgenden wird ein Überblick über die Modifikationen und deren Auswirkungen in Bezug auf verschiedene, tumorbezogene Parameter gegeben (Kudo et al. 1987; Houlihan et al., 1995).

Bisher gibt es keine Möglichkeit vorherzusagen, ob ausschließlich ein Enantiomer eines synthetischen Antitumorlipids oder beide Enantiomere, das Racemat, für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Es gibt Beispiele, bei denen ein Enantiomer genauso aktiv wie das Racemat ist, aber auch solche, bei denen ein Enantiomer deutlich aktiver ist. *D*- und *L*-Edelfosine[®] beispielsweise zeigen die gleiche Zytotoxizität bei HL-60-Zellen und führen zur gleichen Steigerung der Überlebensrate in tumortragenden Mäusen (S180; Maus-Sarkom-Modell), aber nur das *D*-Isomer ist gegen das Mammakarzinom der Maus (MM46) wirksam (Houlihan et al., 1995).

1.1 Modifikationen der Antitumorlipide auf der Basis von ET-18-OCH₃

Für die Tumore S180 und MM46 wurde eine optimale Tumoraktivität bei einer Länge der Fettsäureseitenkette von C-16 bzw. C-18 gemessen. Variationen des *sn*-2-Oxoalkyl-Restes zeigen, dass das 2-Oxoheptadecyl-Analog die beste Antitumor-Aktivität zeigt. Verändert man gleichzeitig die *sn*-1- und *sn*-2-Position, zeigt sich die Modifikation, bei der beide Positionen durch Octylgruppen ersetzt wurden am effektivsten. Der Einfluss auf die Überlebensrate der tumortragenden Tiere ist bei all diesen Verbindungen schwach ausgeprägt. Sowohl die je zweimal C8- als auch die C16-Modifikationen haben einen positiveren Ein-

fluss auf die Überlebensrate der Tiere als Modifikationen mit verkürzten oder verlängerten Seitenketten (s. Tab. 1.1 und Abb. 1.2).

Tabelle 1.1: Modifikation der Kettenlänge

Modifikation	Länge der FS-seitenkette=	Tumorart	T/C	S/T
Nr. 1	16	S180	252	0/5
Nr. 2	18	MM46	214	3/5
Nr. 3	15	S180	290	0/5
Nr. 4	R1=R2=8	S180	257	2/5
Nr. 5	16	X5563 Myeloma Maus	95% Tumor- inhibition	4/10

Legende: T/C = mittlere Lebensspanne [in Tagen] der getesteten Tiere (T) im Vergleich zu Kontrolltieren (C), S/T = mittlere Anzahl überlebender Tiere (S) im Vergleich zu getesteten Tieren (T)

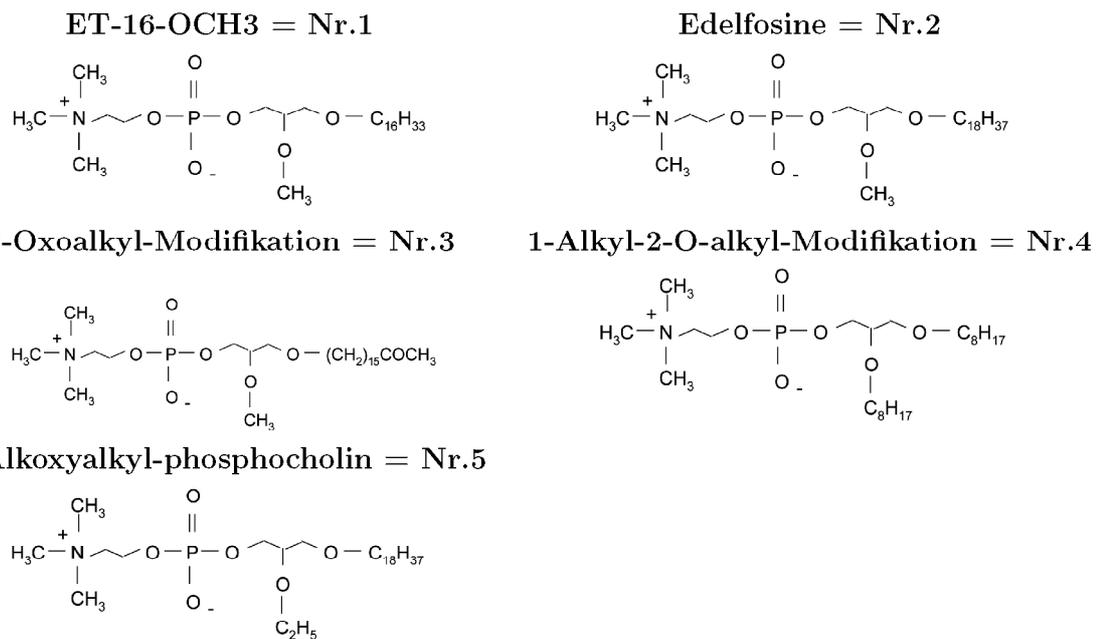


Abbildung 1.2: Strukturformeln zu Tab. 1.1 im Überblick

Die Übersichtsarbeit von Houlihan und Mitarbeitern gibt einen genauen Einblick in die diversen strukturellen Modifikationen, die durchgeführt wurden (Houlihan et al., 1995).

Dazu zählen Ethoxy- und Methoxy-Modifikationen der *sn-2*-Position des Glycerolgrundgerüsts, aber auch Aminomethyl-, Amid-, Sulfinyl-, Sulfonyl-, Sulfon- oder Carbamatmodifikationen der Positionen *sn-1* und *sn-2*. Desweiteren wurden Austausch der *sn-1*- und *sn-2*-Reste durchgeführt sowie Halogensubstitution an der *sn-2*-Position. Die Bandbreite der Wirksamkeit dieser Modifikationen reicht von nicht wirksamen racemischen Gemischen (*rac* SN-Amid) bis zu zweifacher Wirksamkeitssteigerung (BN 52207) im Vergleich zu Edelfosine[®] (Carrigues et al., 1984; Gan und Bonavida, 1999). Die Strukturformeln sind in Abb. 1.3 gezeigt.

In weiteren Ansätzen wurde die Phosphatgruppe der Phosphocholin-Kopfgruppe zum Thiophosphat, Phosphonat, Carboxylat, Carbamat, Sulfonamid modifiziert oder ganz entfernt. Die dadurch entstehenden Verbindungen, sowohl quartäre Salze als auch zwitterionische Verbindungen, wiesen Antitumor-Eigenschaften auf oder förderten die Differenzierung unreifer Blutzellen (Berkovic et al., 1992). Es wurden auch heterozyklische Verbindungen anstelle des Amins substituiert wie Thiazole, Triazole, Pyridine oder Chloropyridazine. Am Beispiel von Edelfosine[®] wurde nachgewiesen, dass eine Reduktion der Trimethylammoniumfunktion auf eine Aminfunktion zu Verbindungen führt, die weniger wirksam sind und die Überlebensrate negativ beeinflussen (Houlihan et al., 1995).

Auch das Glycerolgrundgerüst diente als Angriffspunkt für Modifikationen. So wurde es durch verschiedenste lineare Strukturen ersetzt, wie Ethylenglykol, Ethanolamin, 1,2-Alkandiol, 3-Amino-1,2-Propandiol, 3-Mercapto-1,2-Propandiol, 1,2,4-Butantriol, 2-Amino-3-Mercapto-2-Propanol.

Hexadecylphosphocholin (Miltefosine[®], Abb. 1.1) ist der Prototyp eines solchen Alkylphosphocholins, das *in vitro* und *in vivo* selektiv antineoplastische Aktivität zeigt. Miltefosine[®] inhibiert die Proliferation verschiedener Tumor- und Zelllinien wie HL-60 (humane, pro-myeloide, leukämische Zellen; $IC_{50}=92\mu M$), K-562 (humane, chronisch myeloide, leukämische Zellen; $IC_{50}=132\mu M$), Daudi (humane B-Zell Leukämie; $IC_{50}=109\mu M$), Swiss 3T3 (Fibroblasten; $IC_{50}=65\mu M$). Miltefosine[®] induziert bei einer Konzentration von $5\mu M$ die Differenzierung von HL-60 Zellen (Unger et al., 1989; Hilgard, 1990; Unger et al., 1992 (A); Unger und Eibl, 2001). Es gibt allerdings auch Tumore, die nicht auf Miltefosine[®] ansprechen. Dazu gehören das BP-Tumormodell (Benzo[a]pyren induziertes Sarkom der Maus) oder die Tumormodelle L1210 (Mausmodell für Leukämie) und B-16 (Melanoma-Mausmodell).

Bei Verlängerung der Alkylkette (Octadecyl- oder Oleylsubstitution) erhält man Verbindungen, die Miltefosine[®]-ähnliche zytotoxische Profile zeigen (Houlihan et al., 1995).

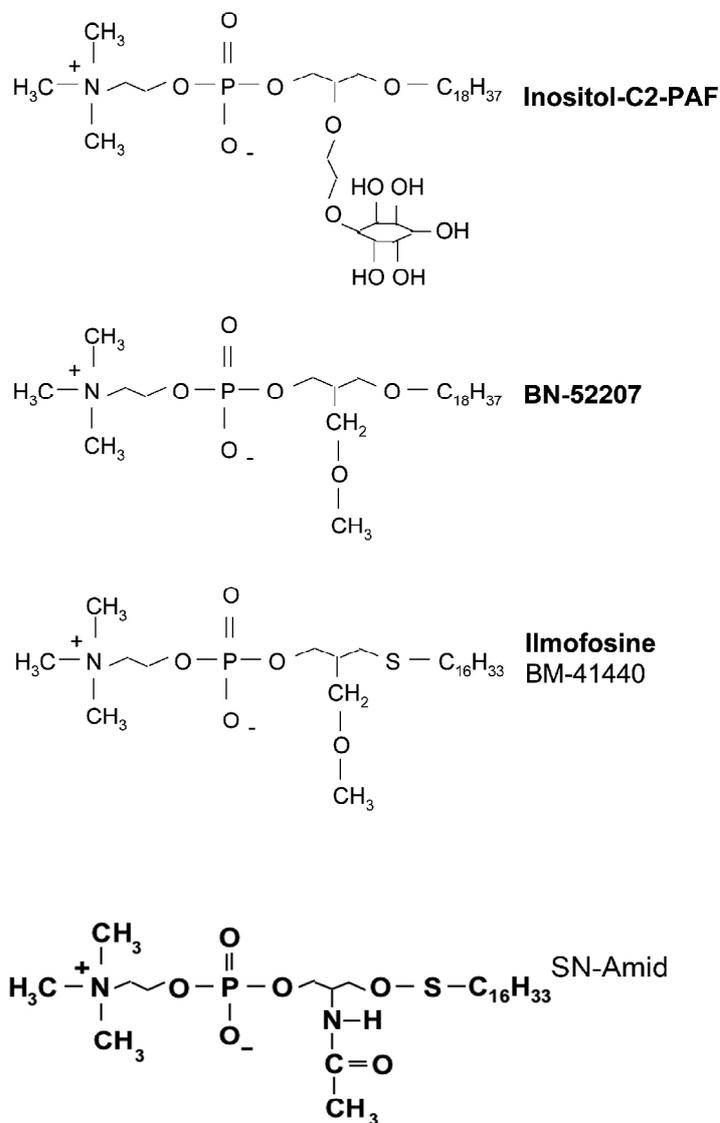


Abbildung 1.3: Modifikationen von ET-18-OCH₃ im Überblick

Es gibt eine Vielzahl cyclischer Modifikationen der Seitenketten wie zum Beispiel Tetrahydrofuran-, 1,3-Dioxolan-, Tetrahydropyran-, Piperidin-, 1,3-Oxazin-Phospholipide, für die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antineoplastische Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Darunter sind auch α -D-Xylofuranoside, Thioglykolipide und β -D-Ribofuranoside (Weber und Benning, 1988; Ishaq et al., 1989; Guivisdalsky et al., 1990).

Aufgrund der hohen Zytotoxizität von PAF und seinen Analogen blieb ihre Anwendung weitgehend auf topische Applikationen beschränkt. Mit der Synthese glykosidierter Phospholipidanaloga wird versucht, die Zytotoxizität, bei gleicher oder verbesserter Effektivität, zu senken.

Das von Mickleit und Mitarbeitern 1995 vorgestellte glukosehaltige Phosphatidylcholin (Glc-PC) inhibiert die Proliferation konfluenter HaCaT-Zellkulturen bei einer Konzentration von $10\mu M$ um 80%, ohne die Viabilität der Zellen zu beeinflussen (Mickleit et al., 1995). Von dieser Arbeitsgruppe wurde auch das glukosehaltige Analog des plättchenaktivierenden Faktors (Glc-PAF) synthetisiert. Glc-PAF inhibiert die Proliferation konfluenter HaCaT-Zellkulturen bereits bei einer Konzentration von $4,8\mu M$. Die Zytotoxizität von Glc-PAF liegt bei $9\mu M$ und ist damit deutlich erhöht im Gegensatz zur Toxizität von Glc-PC, die bei $17\mu M$ liegt. Die Proliferationsinhibition beruht vermutlich auf der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose), denn es ist ein 10facher Anstieg der apoptotischen Zellen zu beobachten (Mickleit et al., 1998). Der Grad der Konfluenz der Zellkulturen ist bei der Bestimmung des anti-proliferativen Profils und der substanzinduzierten Zytotoxizität besonders wichtig. Denn die Auswirkungen der synthetischen Lipidanaloga auf die jeweiligen Zellen wird dadurch entscheidend beeinflusst. So beträgt beispielsweise die Miltefosine[®]-vermittelte halbmaximale Zytotoxizität in HaCaT-Zellen bei 10^4 Zellen/Well $10\mu M$. Inkubiert man 5×10^4 Zellen/Well für den gleichen Zeitraum mit Miltefosine[®], so erhält man einen IC_{50} Wert von $\geq 20\mu M$ (eigene Vorarbeiten).

Die Synthese weiterer glykosidierter Analoga soll dazu beitragen, die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser neuartigen Substanzklasse aufzuklären.

Inositol-C2-PAF ist ein neuartiges, glykosidiertes Phospholipid, dessen Strukturformel im Vergleich zu anderen synthetischen Phospholipiden in Abb. 1.3 dargestellt ist. Dabei handelt es sich um das Racemat der beiden Diastereomere 1-O-octadecyl-2-O-(2-(1-myo-inosityl)ethyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin und 1-O-octadecyl-2-O-(2-(3-myo-inosityl)ethyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin.

2 Die Mechanismen der Wirkung von Antitumorlipiden

Man hat beobachtet, dass Antitumorlipide sich bevorzugt in Tumorgewebe anreichern, wo sie direkt, durch Induktion der Apoptose, zelltoxisch wirken (May et al., 1988; Vagnetti et al., 1990; Plotzke et al., 1992; Diomede et al., 1993; Mollinedo et al., 1997). In hämatopoetischen Zelltypen wirken die Antitumorlipide positiv auf die Differenzierung der Zellen (Reed et al., 1991; Berkovic et al., 1992). Außerdem sind Effekte auf die Aktivierung von Makrophagen sowie regulatorische Einflüsse auf die zelluläre Immunität *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Andreesen et al., 1979; Berdel et al., 1980; Andreesen et al., 1984). Antitumoretherlipide verstärken Sensibilisierungs-Reaktionen, wie Allergien sowie die experimentelle, chronisch-wiederkehrende allergische Encephalomyelitis (Strannegard und Roupe 1976; Arnold et al., 1979). Abgesehen davon besitzen sie auch Antitumor-Aktivität ohne die Beteiligung von Makrophagen, was auf eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen deutet (Houlihan et al., 1995).

Sowohl für Alkyletherlipide als auch für Alkylphosphocholine wurde gezeigt, dass sie die Invasion von Mausfibrosarkomzellen in Herzmuskelgewebe inhibieren. Es gibt jedoch keine Korrelation zwischen dem Grad der anti-Invasivität und der Menge des eingebauten Lipids (van Blitterswijk et al., 1987 (C); Mende et al., 1989; Schallier et al., 1991). Im Zusammenhang mit dieser Eigenschaft könnten die Veränderungen der N-Glykosylierung sowie die Inhibition der Sialyltransferase-Aktivität stehen. Alkyletherlipide könnten die Invasivität der Zellen epigenetisch durch Modulation in der Prozessierung von Glycoproteinen und -lipiden inhibieren (Bador et al., 1983; Houlihan et al., 1995).

2.1 Membranlyse

In hohen Konzentrationen wirken Antitumorlipide zelllytisch. Die geordnete Doppelschicht der Plasmamembranen wird durch Bildung mizellarer Cluster zerstört. Es bilden sich

Poren, die bis zu $1,5\mu\text{m}$ groß werden und bis zu 13% der gesamten Membranoberfläche zerstören können (Tertoolen et al., 1988; Nosedá et al., 1989). Natürliche Esterlipide, die strukturell den Antitumorlipiden sehr ähnlich sind, zeigen eine deutlich geringere lytische Aktivität (Reman et al., 1969; Botzler et al., 1996).

Antitumorlipide weisen in ihrer lytischen Aktivität eine beträchtliche Zellspezifität auf. So sind Fibroblasten, neutrophile Granulozyten, Gliazellen und Knochenmarksvorläuferzellen unempfindlich gegen diese Substanzklasse (Fleer et al., 1990).

Durch Veränderung der Plasmamembranzzusammensetzung und Erhöhung des Serumanteils im Kulturmedium kann man Zellen gegen Antitumorlipide unempfindlicher machen (Petersen et al., 1992; Diomede et al., 1993; Samadder und Arthur, 1999). In serumfreiem Medium ist die lytische Konzentration nahe der kritischen Mizellbildungskonstante (cmc) der Antitumorlipide, was bei Untersuchungen berücksichtigt werden muss. Für klinische Anwendungen muss die hämolytische Aktivität als schweres Nebenwirkungspotenzial betrachtet werden.

Lytische Effekte sind nicht hauptverantwortlich für die vielfältigen Wirkungen der Antitumorlipide, aber subtile Veränderungen in der Membranzusammensetzung oder -fluidität können weitere Angriffspunkte darstellen.

2.2 Aufnahme der Antitumorlipide in Zellen

Antitumorlipide werden direkt an die äußere Membranschicht adsorbiert (van Blitterswijk et al., 1987 (A); Kelley et al., 1993; Wiese et al., 2000). Die anschließend beobachtete passive Diffusion verbraucht keine metabolische Energie, im Gegensatz zu transversalen Flip-Flop-Wegen. Endo- und Pinozytose-Vorgänge stellen sekundäre Aufnahmewege dar. Die Antitumorlipide können auch im Zuge der Membranerneuerung internalisiert werden (Bratton et al., 1992; Fleer et al., 1992). Zusätzlich gibt es noch die Protein-katalysierte Aufnahme durch Inositol-Transferproteine (Wirtz, 1991).

Eine erhöhte Endozytoserate in Tumorzellen kann die gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber Antitumorlipiden im Vergleich zu normalen Zellen erklären (Bazill und Dexter 1990; Fleer et al., 1992; Matzke et al., 2001). Die Sensitivität der Zellen gegenüber Antitumorlipiden korreliert nicht mit dem Cholesterolgehalt der Zell-Membranen. So haben Swiss 3T3-Fibroblasten und MDA MB-231- Brustkrebszellen jeweils einen Cholesterolgehalt von circa $30\text{nmol}/10^6$ Zellen. Miltefosine[®] weist in Swiss 3T3-Fibroblasten einen IC_{50} -Wert von $\geq 85\mu\text{M}$, wohingegen Miltefosine[®] in MDA MB-231-Brustkrebszellen jedoch einen

IC₅₀-Wert von circa 20 μ M aufweist. Der Cholesterolgehalt von HL 60 (humane, leukämische Zellen)- und Raji-Zellen (B-Zell-Lymphom) beträgt dagegen nur circa 10nmol/10⁶ Zellen. Trotzdem weist eine Inkubation mit Miltefosine[®] auch für diese beiden Zelltypen Unterschiede auf. Der IC₅₀-Wert für HL 60-Zellen liegt bei circa 5 μ M, der IC₅₀-Wert für Raji-Zellen bei circa 16 μ M. Der Cholesterolgehalt des Kulturmediums ist jedoch von Bedeutung, da Cholesterol aufgrund seiner Struktur in der Lage ist, mit den Antitumorlipiden Mischmizellen zu bilden und damit die effektive Konzentration des Antitumorlipides zu senken (Fleer et al., 1993).

2.3 Einfluss der Antitumorlipide auf die Zell-Proliferation, den Zellzyklus und die Apoptose

Antitumorlipide sind nicht mutagen und interkalieren nicht in die DNA, was sie von herkömmlichen Tumortheraeutika unterscheidet.

Edelfosine[®] arretiert Zellen im Übergang von der G2- zur M-Phase (Roos und Berdel, 1986). Zellen, die immer noch in der Lage sind, den Zellzyklus vollständig zu durchlaufen, weisen eine fehlerhafte Zellteilung auf. Dadurch werden vermehrt vielkernige Zellen gebildet. Darüber hinaus werden einige Zellen teilweise in der G1-Phase arretiert, andere Zellen sind im Übergang von der S- zur G2-Phase verlangsamt (Principe et al., 1992; Sidoti et al., 1992).

Es konnte gezeigt werden, dass Antitumoretherlipide die Phosphorylierung des „Maturation-Promoting Factor“ (MPF) inhibieren und damit inaktivieren. Weitere Studien weisen nach, dass die Bildung des MPF-cdc2 cyclin-Komplexes durch Antitumoretherlipide inhibiert wird (Pushkareva et al., 1999). Ausserdem können Antitumoretherlipide die Membranfusion verstärken, wodurch die Kompartimentierung während der Mitose gestört ist. Das weist desweiteren auf eine Beeinflussung der Zellteilung hin (Kung et al., 1990).

Es gibt eine negative Korrelation zwischen dem Glycerophosphocholingehalt der Membranen und der Anzahl der Zellen in der S-Phase. Dies weist daraufhin, dass der Phospholipid-Turnover und die Phosphocholin-Synthese in engem Zusammenhang mit der Proliferationsrate stehen (Smith et al., 1991).

Alle Zellen können in Apoptose gehen. In Tumor-Zellen ist dieser Prozess jedoch oft durch Apoptoseresistenz oder durch die Überexpression anti-apoptotischer Proteine gestört. Kennzeichnend für apoptotische Prozesse sind das Schrumpfen der Zelle, die Blasenbildung der Membran und die Kondensation des Chromatins. Das führt zur DNA-Fragmentierung

und zur Bildung apoptotischer Körperchen. Zusätzlich werden bestimmte Lockstoffe (Opsonine) an die Zelloberfläche gebracht, wodurch Makrophagen zur Phagozytose der Zellen angeregt werden. Apoptose kann durch viele verschiedene Faktoren, wie Strahlung, proto-Onkogene, virale Proteine und Enzyme ausgelöst werden. Der generelle Ablauf aber folgt im Wesentlichen zwei Mechanismen, die hier kurz erläutert werden sollen.

Beide Wege beginnen bei der Aktivierung des Fas-Rezeptors (Fas-R; CD95, Apo-1) und enden bei der Aktivierung von Caspase-Kaskaden. Beim ersten Weg werden nach der Aktivierung des Fas-Rezeptors, mit Hilfe des zytosolischen Vermittlerproteins FADD (Fas Associated Death Domain), spezialisierte Cystein-Proteasen, die Caspasen, aktiviert. Unter Umgehung des Mitochondriums werden weitere Caspasen aktiviert, die nachgeschaltet zur Apoptose führen. Das Fas-Rezeptor-assoziierte FADD-Protein ist für das Auslösen der Apoptose unbedingt erforderlich, da in Lymphomzellen, die dominant-negatives FADD exprimieren, keine Apoptose mehr ausgelöst werden kann (Chinnaiyan et al., 1995).

Im zweiten Weg führt die initiale Caspasen-Aktivierung zum Zusammenbruch des Membranpotenzials der Mitochondrien (Ψ_m). So gelangt das mitochondriale Protein Cytochrom-c in das Zytoplasma und bindet dort an das Protein APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1). Dadurch werden auch hier Caspasen aktiviert, die Proteine der Kernhülle spalten oder DNasen aktivieren und somit zur Apoptose führen.

Edelfosine[®] verändert die Morphologie von HL-60-Zellen, so dass sie apoptotischen Zellen ähneln. Zusätzlich zur Cytochrom-c-Freisetzung wird die gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet (Diomedea et al., 1993; Matzke et al., 2001). Aber die meisten Tumore exprimieren verstärkt das anti-apoptotische Protein Bcl-2, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und dem Zusammenbruch des Membranpotenzials entgegenwirkt und so den Zellen Apoptose-Resistenz verleiht. Miltefosine[®] induziert in Lymphoblastomzellen Apoptose, die dem Mitochondrium-unabhängigen Weg folgt (Matzke et al., 2001). Zusammenfassend können also beide Fas-Rezeptor-induzierten Wege der Apoptoseinduktion durch Edelfosine[®] eingeleitet werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch das Alkyletherlipid *S*-1-O-Phosphocholine-2-N-acetyloctadecane in Zellen hämatopoetischen Ursprungs Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose auslöst (Oberle et al., 2005).

2.4 Mitogene Effekte und der Einfluss auf die Differenzierung von Zellen

Für Miltefosine[®], Octadecyl-phosphocholin und Octadecenyl-phosphocholin wurden pro-mitogene Eigenschaften nachgewiesen. Diese Eigenschaften treten im Konzentrationsbereich unterhalb der antiproliferativen Aktivität auf. Es gibt Hypothesen, die die wachstumsfördernde Eigenschaft dieser Substanzen der Ähnlichkeit zu Lysophosphatidsäure zuschreiben (Sobottka et al., 1993). Lysophosphatidsäure ist sowohl ein potenter und spezifischer Lipidmediator als auch ein Mitogen, dessen proliferationsfördernde Eigenschaften im selben Konzentrationsbereich ($\leq 0,1\mu M$) wie die der Antitumoretherlipide liegen (Salari et al., 1992 (B)).

Dass dieses Phänomen nicht einzigartig für Alkylphosphocholine ist, zeigen Studien mit Adriamycin, einem konventionellen Zytostatikum, das auch bei sub-toxischen Dosen die Proliferation fördert (Vichi und Tritton, 1989).

Darüber hinaus regen Antitumorlipide in einigen Tumormodellen die Zellen zur Differenzierung an (Maurer und Hilgard, 1992).

Miltefosine[®] und Edelfosine[®] induzieren in humanen HL-60-Zellen und murinen M1-Zellen (myeloblastische Leukämie-Zellen) die Bildung reifer Granulozyten und Makrophagen (Honma et al., 1981; Berkovic et al., 1992). Ob ein spezifischer Mechanismus oder allgemeiner „Stress“, der durch die Substanzen ausgelöst wird, dafür verantwortlich ist, ist noch nicht abschließend geklärt.

2.5 Modulation des Immunsystems

Obwohl es viele übereinstimmende Berichte über die Aktivierung von Makrophagen und über verminderte Metastasierung nach Gabe von Antitumoretherlipiden gibt, ist der genaue Mechanismus dieser Wirkung noch nicht geklärt (Hilgard et al., 1991). *In vitro* wurden unterschiedliche Wirkungen durch Antitumoretherlipide auf Zellen des Immunsystems beschrieben. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der immunmodulatorischen Eigenschaft und dem proliferationsfördernden Effekt der Antitumoretherlipide bei niedrigen Konzentrationen (Brachwitz und Vollgraf, 1995).

Der unterstützende Effekt scheint durch die Stimulation der Lysolecithin-Synthese und die vermehrte Zytokin-Synthese vermittelt zu sein und ausschließlich durch aktivierte Makrophagen übertragen zu werden (Berdel et al., 1981; Andreesen und Giese, 1987; Munder

und Westphal, 1990). Die Aktivität von B- und T-Zellen und deren Differenzierung wird von Antitumoretherlipiden durch Interleukine, mitogene Lektine und humane Leukozytenantigene unterdrückt. Währenddessen sind ruhende B- und T-Zellen meist unbeeinträchtigt (Andreesen et al., 1983). Konzentrationsabhängig wirken Antitumoretherlipide auf NK-Zellen und T-Zellen proliferationsinhibierend. Im Gegenzug wird die Ausschüttung der Zytokine Interleukin-1, -3, -6, Interferon γ und TNF α durch Monozyten und Makrophagen gesteigert (Pignol et al., 1992). Für Edelfosine[®] und racemisches Lyso-PAF wurde die Hemmung der Bindung von TNF α an seinen Rezeptor beschrieben (Houlihan et al., 1995).

Miltefosine[®] hat keinen Einfluss auf Makrophagen, NK-Zellen oder B-Zellen. Trotzdem nehmen Alkylphosphocholine als potente Ko-Stimulatoren der Hämatopoese einen großen Einfluss auf das Immunsystem. Miltefosine[®] steigert sowohl die GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen - Kolonie-stimulierender Faktor) und die Interferon γ -Genexpression als auch die Interferon γ -Sekretion von Monozyten (Hilgard et al., 1991; Hilgard et al., 1992; Brachwitz und Vollgraf, 1995).

2.6 Beeinflussung der Signaltransduktion und der Einfluss auf spezifische, membranständige Rezeptoren

Es wurde gezeigt, dass Antitumoretherlipide auch ohne die Interaktion mit dem PAF-Rezeptor zelluläre Antworten hervorrufen können. Auch hier gibt es sehr unterschiedliche Befunde, so dass sich dieser Überblick auf einige Aspekte beschränkt (Houlihan et al., 1995; Arthur und Bittman, 1998).

Edelfosine[®], ET-16-OCH₃ und Lyso-PAF führen in neutrophilen Granulozyten zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts, der vermutlich auf einer direkten Interaktion mit den Calcium-Kanälen des endoplasmatischen Retikulums beruht (Palmlblad et al., 1990; Lohmeyer et al., 1991). In Fibroblasten wird eine ähnliche Antwort nur in serumfreiem Medium und bei Konzentrationen über 10 μ M erreicht (Fleer et al., 1992). Längerfristige Inkubation der Zellen mit Antitumoretherlipiden kann die Calcium-Freisetzung inhibieren, was wahrscheinlich auf der Inhibition der Phosphatidylinositol-Hydrolyse beruht (Inoue et al., 1992; Bergmann et al., 1994).

In Brustkrebs-Zelllinien reduziert Edelfosine[®] die Anzahl an epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) -Rezeptoren und verlangsamt die Internalisierung des EGF-EGF-Rezeptorkomplexes. Die Bindungsaffinität zwischen EGF und seinem Rezeptor wird nicht beeinträchtigt (Kosano et al., 1990).

Nur Antitumoretherlipide, die eine Phosphorylcholin-Kopfgruppe tragen, lösen eine Stimulation der EGF-abhängigen Rezeptor-Autophosphorylierung aus. Darin zeigt sich eine deutliche Struktur-Wirkungsbeziehung innerhalb der Antitumoretherlipide (Igarashi et al., 1990).

Auch die Proteinkinase C (PKC) wird durch Antitumorlipide beeinflusst. Die PKC gehört zu den Serin/Threoninkinasen und wird durch Translokation zur Membran aktiviert. Als Folge der PKC-Aktivierung wird die MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)-Kaskade aktiviert, welche Proliferation und Differenzierung reguliert. Als Ca^{2+} -, Diacylglycerin (DAG)- und Phosphatidylserin-abhängiges Enzym kann die PKC indirekt durch Hemmung der Phosphatidylinositid-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) gehemmt werden. Je nach verwendeter Zelllinie und dem verwendeten Antitumorlipid sind unterschiedliche Effekte auf die PKC beschrieben (Helfman et al., 1983; Heesbeen et al., 1991; Powis, 1992). Anionische und ungeladene Lipide mit Tensidcharakter können die PKC aktivieren. Kationische und ungeladene Lipide, die die Membranen stabilisieren, inhibieren die PKC. Hierbei wird ein störender Einfluss der Alkyletherlipide auf die Struktur der Plasmamembran vermutet. Für die PKC könnte das bedeuten, dass Alkyletherlipide ein tieferes Eindringen der PKC in die Plasmamembran erleichtern (Epanand und Lester, 1990). Alkylmethylglycerole, die Metabolite der Antitumoretherlipide, wiederum konkurrieren bei der PKC-Aktivierung kompetitiv mit Phorbolestern und DAG um die Bindungsstelle an der PKC (van Blitterswijk et al., 1987 (B); Grosman, 1990; Salari et al., 1992 (A)).

Die MAPK-Kaskade ist ein Weg, der häufig von Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren zur Regulation von Proliferation oder Differenzierung in Zellen benutzt wird. Diese Signalkaskade wird im Folgenden stark vereinfacht vorgestellt.

Binden Wachstumsfaktoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor, an ihre Rezeptoren, wird durch die Dimerisierung des Rezeptors dessen Tyrosinkinase-Aktivität angeschaltet und die Autophosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste des Rezeptors induziert. Dadurch entstehen Bindungsstellen für Proteine, die SH2- oder PTB-Domänen enthalten. Das Adapter-Protein Grb2 enthält eine solche SH2-Domäne und bindet an den aktivierten, phosphorylierten epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor. Grb2 enthält weiterhin eine SH3-Domäne, an die das Protein Sos binden kann. Sos aktiviert die kleine GTPase Ras, indem es den Austausch von Ras-GDP gegen Ras-GTP beschleunigt. Ras-GTP unterstützt die Translokation der Proteinkinase Raf-1 zur Membran, dort phosphoryliert Raf-1 (MAPKKK) die MAPK-Kinase (MAPKK), die dann die MAPK phosphoryliert, die wiederum zytosolische Substrate, Bestandteile des Zytoskeletts oder Transkriptionsfaktoren

aktiviert. So sind sowohl die Zell-Proliferation als auch die Zell-Differenzierung über die Aktivität der MAPK regulierbar.

Für Edelfosine[®] wurde in MCF-7-Zellen (Brustkrebszelllinie) gezeigt, dass es, über die Störung der Ras-stimulierten Membraninteraktion mit Raf-1, die Aktivität der MAPK negativ beeinflusst. Edelfosine[®] verhindert die Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran oder fördert die Dissoziation von Raf-1 von der Plasmamembran. Dadurch wird die mitogeninduzierte Signalkaskade unterbrochen (Zhou et al., 1996; Arthur und Bittman, 1998).

Ein anderer möglicher Weg führt über die Inhibition der PI-PLC. Als Folge der PI-PLC-Hemmung wird die Bildung der Spaltprodukte von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), DAG und Inositoltrisphosphat (IP₃) reduziert. Dadurch fehlen die mitogenen Folgesignale, wie der intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg und die Aktivierung der PKC. Im Gegensatz zur PI-PLC wird die Phosphocholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) durch Antitumoretherlipide nur wenig gehemmt (Powis et al., 1992; Pawelczyk und Lowenstein, 1993; Noh et al., 1995).

Das Enzym CDP:Phosphocholincytyltransferase wird nicht direkt gehemmt, aber seine Translokation vom Zytosol zur Membran und die damit verbundene Aktivierung ist verzögert. Die Aktivität dieses Enzyms ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Phospholipid-Biosynthese. Der Eingriff in die Translokation hat somit einen proliferationshemmenden Effekt, denn genügend neue Membranbestandteile sind die Voraussetzung der erfolgreichen Zellteilung (Geilen et al., 1991; Attard et al., 2000).

Ein weiteres wichtiges Enzym, dessen Aktivität von Antitumoretherlipiden moduliert wird, ist die Phospholipase D (PLD). Die Aktivität von PLD wird durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren, Tyrosinkinase und auch durch die PKC beeinflusst. PLD ist am Phospholipid-Turnover, der DAG-Produktion und der Generierung von Phosphatidsäure (PA) beteiligt. In den meisten Fällen wird die PLD durch Antitumoretherlipide aktiviert (van der Bend et al., 1992; Strum et al., 1993).

Ausserdem sind die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) und die DAG-Kinase Angriffspunkte für Antitumoretherlipide. Die PI3-K katalysiert die Phosphorylierung der Phosphoinositide an der 3-OH-Position des Inositols. Verschiedene Rezeptortyrosinkinase, Wachstumsfaktorrezeptoren oder der Insulinrezeptor, aber auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, tragen zur Aktivierung der PI3-K bei. Noch nicht genau geklärt ist die Rolle der verschiedenen, phosphorylierten Phosphatidylinositide im komplexen Zusammenspiel von Proliferation, Organisation des Zytoskeletts und dem Überleben der Zelle. Aufgrund ih-

rer amphiphilen Struktur sind die phosphorylierten Phosphatidylinositide membrangebunden und durch lipidbindene Domänen von Proteinen stabilisiert. Studien mit Edelfosine[®] an Swiss 3T3-Fibroblasten zeigen, dass Edelfosine[®] ein potenter Inhibitor der PI3-K ist (Berggren et al., 1993).

2.7 Veränderungen der Zellmorphologie und des Zytoskeletts

Wie schon erwähnt, beeinflussen Antitumorlipide die Zellmorphologie und Zell-Zell-Interaktionen. Es kommt zum Verlust von Mikrovilli, zur Bildung von Membranausstülpungen („ruffles“), zum Abrunden von Zellen, gefolgt vom spontanen Ablösen der Zelle von der Matrix (Berdel et al., 1983; Berdel et al., 1984; Nyquist et al., 1992). Hohe Konzentrationen führen, wie schon erwähnt, zur Blasenbildung in der Membran und zu Poren in der Plasmamembran (Noseda et al., 1989). Die Wirkung auf intrazelluläre Membranen resultiert in einer Verkleinerung des Kerns, der Vakuolisierung der Zelle und dem Auflösen der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Das Auftreten vielkerniger Zellen wird entweder auf die promitotische oder die Membran-fusionsverstärkende Wirkung zurückgeführt. Lipidester-behandelte Zellen zeigen selbst bei hohen Konzentrationen des Esters nicht diese Wirkung. Vielmehr kommt es zur Bildung vieler kleiner Poren. Dies lässt auf einen anderen Wirkmechanismus durch Lipidester schließen (Noseda et al., 1989).

2.8 Synergismus mit anderen Zytostatika

Antitumorlipide und konventionelle Zytostatika können additiv oder synergistisch wirken. Der Begriff synergistisch bezeichnet ein Phänomen, dass die Kombination aus einem bestimmten Antitumorlipid und einem bestimmten, konventionellen Zytostatikum wirksamer ist, als die „Summe“ beider Therapeutika (Principe et al., 1992; Dy et al., 1999). Durch die Membranmodulation wird die Sensitivität gegenüber DNA-Interkalatoren, wie Doxorubicin, erhöht. Ein Synergismus wird für die Kombination von Miltefosine[®] und Edelfosine[®] mit Alkylantien wie Cyclophosphamid, Cisplatin, Vinka-Aklaloiden wie Vincristine, Nukleosiden, 5-Fluoruracil und Folsäure-Analogen wie Methotrexat oder Bestrahlungstherapien beschrieben (Ruiter et al., 2001). Ausserdem kann die „multidrug-resistance“ einiger entarteter Zellen teilweise aufgehoben werden (Danhauser-Riedl et al., 1990; Himmelmann et al., 1990).

2.9 Präklinische Prüfungen und klinische Studien

Vorstudien ergaben, dass, unabhängig von der Darreichungsform, Antitumorlipide nur in geringem Umfang systemische Nebenwirkungen hervorrufen (Berdel et al., 1980; Munder und Westphal, 1990). In Sprague-Dawley-Ratten beträgt die halbmaximale letale Dosis (LD₅₀) an Miltefosine[®] (oral, akut) 250mg/kg Körpergewicht (Unger et al., 1991). Die Nebenwirkungen sind Sedierung, Gewichtsverlust und gastro-intestinale Beschwerden. Für Edelfosine[®] wurde ein ähnliches Nebenwirkungsprofil erstellt.

Bei der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms beim Menschen wurden unter oraler Gabe von Edelfosine[®] einige Remissionen, aber auch das Auftreten gastro-intestinaler Beschwerden schon bei geringer Dosis beobachtet (Hilgard et al., 1988). Appliziert man Antitumorlipide auf intravenösem Weg, ist die Hauptnebenwirkung die Hämolyse, die aufgrund des Detergenziencharakters auftritt. Die LD₅₀ (intravenös) von Edelfosine[®] wurde bei 40-55mg/kg Körpergewicht festgestellt. Zu weiteren Nebenwirkungen gehören Reizungen an der Einstichstelle. Edelfosine[®] ist in der obengenannten Konzentration nicht toxisch für die Zellen des Knochenmarks. Nach autologer Knochenmarkstransplantation und *ex vivo*-Behandlung mit Edelfosine[®] kam es zu einer signifikanten Verbesserung bei 9 von 29 Leukämiepatienten (Berdel et al., 1982; Berdel et al., 1987).

Miltefosine[®] wurde in klinischen Studien der Phasen I-III für die lokale Behandlung von Hautmetastasen und Lymphomen bei Brustkrebs eingesetzt (Unger et al., 1992 (B)). Bis zu 56% der Patienten sprechen darauf positiv an. Nebenwirkungen sind auch hier gastro-intestinale Beschwerden und Reizungen am Applikationsort (Unger et al., 1988; Verweij et al., 1992; Clive et al., 1999).

Ausserdem wird Miltefosine[®] zur systemischen Therapie der Leishmaniose eingesetzt. Die Leishmaniose ist eine Protozoen-Erkrankung, die bisher mit Antimon-haltigen Arzneimitteln behandelt wurde. Mit Miltefosine[®] wurde eine Heilungsrate von 100% erzielt. Bei 6 von 120 Patienten traten jedoch Rezidive auf (Jha et al., 1999; Murray und Delph-Etienne, 2000; Perez-Victoria et al., 2001).

3 Der plättchenaktivierende Faktor und sein Rezeptor

Der plättchenaktivierende Faktor (PAF) gehört zu den am besten untersuchten biologisch aktiven Phosphoglyceriden. Der Aufbau dieses Lipids wurde 1979 gleichzeitig von Benveniste und Demopoulos aufgeklärt (Benveniste et al., 1979; Demopoulos et al., 1979).

PAF gehört zu den Etherlipiden, wobei jedoch die Fettsäure, die über eine Etherbindung mit dem *sn*-1-C-Atom des Glycerolgrundgerüsts verknüpft ist, in ihrer Länge (C13:0 und C17:1) variabel sein kann. Die *sn*-2-Position ist jeweils mit einem kurzkettigen Acylrest und die *sn*-3-Position mit Phosphocholin besetzt (Abb. 3.1). Bei grösseren Substituenten an *sn*-2 nimmt die biologische Aktivität des PAFs deutlich ab. Entfernt man diesen Substituenten, bildet sich Lyso-PAF, das im Normalfall ohne jegliche biologische Aktivität ist (Hanahan, 1986).

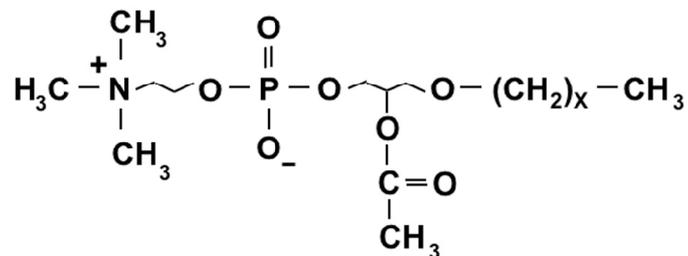


Abbildung 3.1: Strukturformel des plättchenaktivierenden Faktors

X = C 13:0 bis C 17:1

Es sind zwei unterschiedliche Biosynthesewege für PAF beschrieben, der *de novo*- und der Remodelling-Weg. Für die Neusynthese wird auf 1-O-Alkyl-*sn*-glycero-3-phosphat zunächst ein Acetylrest durch eine Acetyltransferase und Acetyl-Coenzym A in die *sn*-2-Position übertragen. Anschließend wird das Phosphat durch Phosphohydrolasen entfernt und mit

Hilfe der Phosphocholtransferase und Cytidindiphosphat (CDP) -Cholin die Kopfgruppe in Position *sn-3* aufgebaut. Der Remodelling-Weg kann durch Aktivierung von Phospholipase A₂ (PLA₂) eingeleitet werden (Shindou et al., 2000). PLA₂ spaltet bevorzugt Phosphoglyceride, die an *sn-2* Arachidonsäure tragen. In der *sn-1*-Position sind PAFs variabel. Im Folgeschritt wird wieder durch die Acetyltransferase und Acetyl-Coenzym A in der *sn-2*-Position ein Acetylrest eingebaut. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Freisetzung von 1-O-alkyl-2-O-alkyl-glycerol durch Phospholipase C (PLC) aus einem Phosphoglycerid und anschließender Modifikation der *sn-2*-Position mit einem kurzkettigen Substituenten und dem Einfügen der Phosphocholinkopfgruppe (Hanahan, 1986).

Der Abbau von PAF und PAF-ähnlichen Lipiden erfolgt sowohl durch PLA₂, Paraoxonase, Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase als auch durch andere unspezifische Acetylhydrolasen. Es sind intra- und extrazelluläre Formen der PLA₂ beschrieben (Akiba und Sato, 2004). Nur die intrazelluläre Isoform PLA₂ Ib ist streng substratspezifisch für die Acetatgruppe der *sn-2*-Position und damit auch für PAF. Für die PAF-Acetylhydrolase konnten anti-inflammatorische Eigenschaften *in vivo* nachgewiesen werden (Tjoelker et al., 1995). Anti-inflammatorische Glukokortikoide, wie Dexamethason, aber auch Entzündungsmediatoren erhöhen den PAF-Acetylhydrolase-Spiegel.

PAFs werden nicht gespeichert, sondern bei Bedarf synthetisiert. Die biologische Wirkung ist von Art und Verfügbarkeit der auf- und abbauenden Enzyme und der Struktur der Phosphoglyceride der Membran bestimmt (Mangold und Weber, 1987; Ninio, 2005). Auch humane, epidermale Zellen können PAFs synthetisieren (Michel et al., 1990). In Abb. 3.2 sind in einem Überblick die Synthese- und Abbauege für PAF und weitere Lipidmediatoren dargestellt.

Die Wirkungen von PAF erfolgen rezeptorvermittelt und sind sehr vielfältig (Moolenaar, 1999; Stafforini et al., 2003). Das *R*-Enantiomer von PAF führt in Endothelzellen zur Tyrosinphosphorylierung von der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin. Diese Effekte sind abhängig von der Aktivität der Proteinkinase C (PKC), aber adhäsionsunabhängig und erfolgen PAF-Rezeptor-vermittelt. Wenn adhärente und gespreitete Endothelzellen mit dem *R*-Enantiomer von PAF stimuliert werden, beginnen diese zu wandern (Soldi et al., 1996).

Die systemischen Effekte der PAF-PAF-Rezeptor-Interaktion umfassen akute Entzündungsreaktionen, allergische Reaktionen, den anaphylaktischen Schock und den Endotoxinschock. Entzündungsreaktionen bedingen und fördern aber auch die Entstehung von Atherosklerose, bei der PAF durch die Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten zu einer

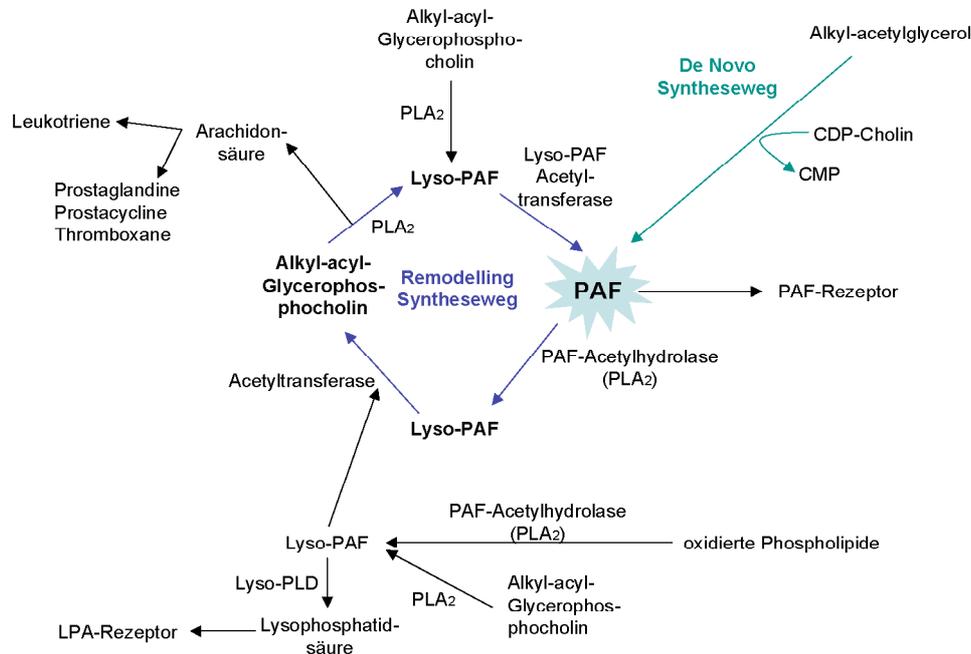


Abbildung 3.2: Überblick über die Synthese und Abbau einiger Phospholipidmediatoren (modifiziert nach Ninio, 2005)

Erhöhung der vaskulären Permeabilität führt (Ruggeri, 2002; Ninio, 2005). PAF fördert die Blutplättchenaggregation, aktiviert neutrophile und basophile Granulozyten, stimuliert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und aktiviert B-Lymphozyten. Auf die Atemwege hat PAF eine bronchokonstriktive Wirkung, vermittelt aber gleichzeitig auch eine Hyperaktivität des Flimmerepithels. Die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System sind durch Blutdruckabfall und Bradykardien gekennzeichnet. Im zentralen Nervensystem beeinflusst PAF die synaptische Plastizität der Neuronen und damit Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis (Fisher et al., 1992; Izaki et al., 1996; Prescott et al., 2000).

Desweiteren dient PAF als Tumormarker für die Beeinträchtigung der auxilaren Lymphknoten bei Brustkrebs (Pitton et al., 1989).

Der PAF-Rezeptor, der zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, wird auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen exprimiert und vom *R*-Enantiomer des PAFs aktiviert (Hoffmann et al., 1984; Snyder et al., 1989). Bei Aktivierung des Rezep-

tors kommt es zu einer Erhöhung des Phosphoinositol-Turnovers und zum Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Struktur-Funktions-Analysen des Rezeptors ergaben, dass die Histidine der fünften und sechsten transmembranären Domäne an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Mutationen der Aminosäuren Lysin zu Arginin (L321R; proximale Lage zur zytosolischen Seite der Membran) oder Asparagin zu Alanin (N100A; enthalten in der 3. transmembranären Domäne) ergeben konstitutiv-aktive Varianten des Rezeptors, die auch noch Signale von Lyso-PAF-Verbindungen vermitteln (Izumi und Shimizu, 1995; Ishii und Shimizu, 2000).

Wie andere G-Protein-gekoppelte Proteine wird der PAF-Rezeptor nach der initialen Aktivierung desensibilisiert. Dazu sind die Serine und Threonine des C-Terminus besonders wichtig. Diese Desensibilisierung kann homolog durch die Phosphorylierung des Rezeptors oder die Inaktivierung des hierarchisch untergeordneten Effektors PLC durch PKC, aber auch heterolog durch die Aktivierung eines anderen Rezeptors erfolgen.

Durch alternatives Spleißen existieren zwei Isoformen des Rezeptors: R1 und R2. PAF-R1 wird ubiquitär, am stärksten aber in Leukozyten, exprimiert. Die Expression dieser Isoform ist durch PAF induzierbar. Die Isoform R2 wird von Herz, Lunge, Milz und Nieren, nicht aber von Leukozyten oder dem Gehirn, exprimiert. Diese Isoform spricht nicht auf PAF an. Die Expression des PAF-Rezeptors wird vermutlich auf Transkriptionsebene kontrolliert. Aber auch über die Stabilität der mRNA könnte die PAF-Rezeptor-Expression reguliert werden (Thivierge et al., 1996).

Viele unterschiedliche Signalwege können durch den PAF-Rezeptor induziert werden. Dazu gehören die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen, der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), der Phospholipasen A, C und D, der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K), der fokalen Adhäsionskinase (FAK) sowie die Hemmung der Adenylylcyclase (Pei et al., 1998).

Humane Keratinozyten exprimieren den PAF-R1 und -R2. Durch Hybridisierungsstudien wurde gezeigt, dass die PAF-Rezeptor-mRNA vermehrt in den suprabasalen Zellschichten der Haut (*Stratum spinosum*) exprimiert wird (Shimada et al., 1998).

Da einige der bereits vorgestellten Alkyletherlipide strukturelle Ähnlichkeiten mit PAF besitzen, ist denkbar, dass die Effekte der Alkyletherlipide durch Interaktion mit dem PAF-Rezeptor vermittelt werden. So wird die Aktivierung von Makrophagen, Blutplättchen und neutrophilen Granulozyten durch Edelfosine[®] zumindest teilweise über die Interaktion mit dem PAF-Rezeptor ausgelöst (Kudo et al., 1987). Obwohl Edelfosine[®] im Vergleich zu PAF deutlich zytotoxischer gegen verschiedene humane Tumor-Zelllinien ist, kann es Serotonin

mit wesentlich geringerer Effektivität freisetzen. Nur in geringem Maße führt Edelfosine[®] zur Thrombozyten-Aggregation in Hasenblut. Darüber hinaus antagonisiert Edelfosine[®] die Wechselwirkung zwischen PAF und seinem Rezeptor (Kudo et al., 1987). Die meisten Antitumoretherlipide weisen eine nicht stereoselektive Wirkung auf, so dass sowohl direkte PAF-Rezeptor-vermittelte als auch indirekte Mechanismen über die Plasmamembran in Betracht gezogen werden müssen.

4 Die menschliche Haut

Als grösstes Organ des menschlichen Körpers (1,5-1,8m²) hat die Haut vielfältige Aufgaben. Dazu gehören der Schutz vor chemischer, mechanischer oder thermischer Belastung und vor UV-Strahlung. Des Weiteren ist die Haut an der Regulation des Wasserhaushalts und der Temperatur beteiligt (Bouwstra et al., 2003).

4.1 Aufbau

Die Haut besteht aus der Cutis und der darunter liegenden Subcutis. Die Cutis wiederum wird in Epidermis, ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, und Dermis (Corium), ein straffes, faserreiches Bindegewebe, eingeteilt. Die beiden Schichten der Cutis sind fest miteinander verzahnt. Die Subcutis, die sich an die Dermis anschließt, besteht aus lockerem Bindegewebe, in das Fettzellen eingebettet ist.

Das Epithel der Epidermis ist ektodermalen Ursprungs, wogegen sich Dermis und Subcutis vom Mesoderm ableiten. Melanozyten und Merkel-Zellen, die Mechanosensoren der Haut, wandern von der Neuralleiste in die Epidermis ein. Aus Vorläuferzellen des Knochenmarks stammen die Langerhans-Zellen, das sind die antigen-präsentierenden Zellen der Epidermis. Haare, Nägel und Drüsen sind ausdifferenzierte ektodermale Epithelknospen, die in das Mesoderm eingesprosst sind. Die Epidermis hat eine Dicke von 10µm-200µm.

Die Regeneration der Haut erfolgt ausschließlich durch Stammzellen. Da etwa 2-7% aller Zellen des *Stratum basale* Stammzellen sind, kann sich die Haut ein Leben lang selbst erneuern (Alonso und Fuchs, 2003). Die Keratinozyten werden von der Basallamina zur Epidermis verschoben und schließlich abgeschilfert. Dabei durchlaufen die Keratinozyten dramatische Veränderungen, die zu einer Gliederung der Epidermis führt, die im Folgenden kurz dargestellt wird.

Über der Basalmembran liegen die Zellen des *Stratum basale*, die durch Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Basalzellen haben eine kubische Form und sind über Desmosomen miteinander und mit überliegenden Zellen verbunden (Woodley et al.,

1993). Sie haben einen länglich ovalen Zellkern, wenig Zytoplasma, viele Ribosomen und bilden saure und basische Keratine.

Die Stachelzellschicht, *Stratum spinosum*, wird von rundlich-länglichen Zellen gebildet. Die vom Golgi-Apparat gebildeten Keratinosome, die Lamellarkörperchen, treten hier erstmals Mal auf. Diese geben durch Exozytose Glykoproteine, Lipide und Enzyme in den Interzellularraum ab. Diese Enzyme, zu denen die Transglutaminasen gehören, sorgen durch Quervernetzung von Proteinen dafür, dass eine unlösliche Schicht die Zellen umgibt. Geordnete, interzelluläre Lipid-Lamellen, die hauptsächlich freie Fettsäuren, Ceramide und Cholesterol enthalten, umgeben zusätzlich die Zellen. Diese beiden unlöslichen Schichten sind für die effektive Barrierefunktion der Epidermis essentiell (Kalinin et al., 2002).

Die Zellen des *Stratum granulosum* enthalten basophile Keratohyalin granula, in denen die Proteine Filaggrin und Involucrin enthalten sind, welche die irreversible Aggregation und Polymerisation der Keratinfilamente bewirken und so die Verhornung der Keratinozyten einleiten. Je weiter die Zellen zur Oberfläche vordringen, desto mehr Mitochondrien verlieren sie, während der Zellkern degeneriert. Der Prozess, bei dem die Zellen ihre transkriptionellen und metabolischen Aktivitäten einstellen, ist streng reguliert und ähnelt dem programmierten Zelltod.

Das *Stratum lucidum* ist nur in der Leistenhaut, den Beugeseiten der Hand- und Fußflächen gut ausgeprägt. Im *Stratum lucidum* sind bereits keine Zellkerne oder Zellorganellen mehr zu erkennen. Diese Zellen sind vollständig keratinisiert und enthalten somit nur noch Keratinfilamente und das Keratohyalin Eleidin.

Die abgestorbenen Keratinozyten des *Stratum corneum* werden als Korneozyten bezeichnet. Durch Scherkräfte werden im *Stratum disjunctum* Interzellularräume aufgerissen und einzelne oder mehrere Zellen, sogenannte Hornschuppen, herausgerissen. Im Durchschnitt ist diese Schicht 10 μm stark und sehr widerstandsfähig (s. Abb. 4.1).

Die unter der Epidermis liegende Dermis wird in das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare* eingeteilt. Die Dermis besteht aus ortsständigen Fibrozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Gefäßen, Nervenfasern, Drüsen und Haarwurzeln. Die hochviskose Grundsubstanz ist reich an Proteoglykanen, die durch Wasserbindung für den Hautturgor verantwortlich sind.

Das *Stratum papillare* ist mit der Epidermis verzahnt. Hier befinden sich die Meissnerschen Tastkörperchen. Kapillaren aus dem Plexus superficialis übernehmen die Versorgung des *Stratum papillare*. Kräftige, unterschiedlich gerichtete Kollagenfasern des *Stratum reticulare* sind verantwortlich für die hohe Reißfestigkeit und Dehnbarkeit der Haut. Lymph-

gefäße führen interzelluläres Gewebswasser von hier in den Körperkreislauf zurück.

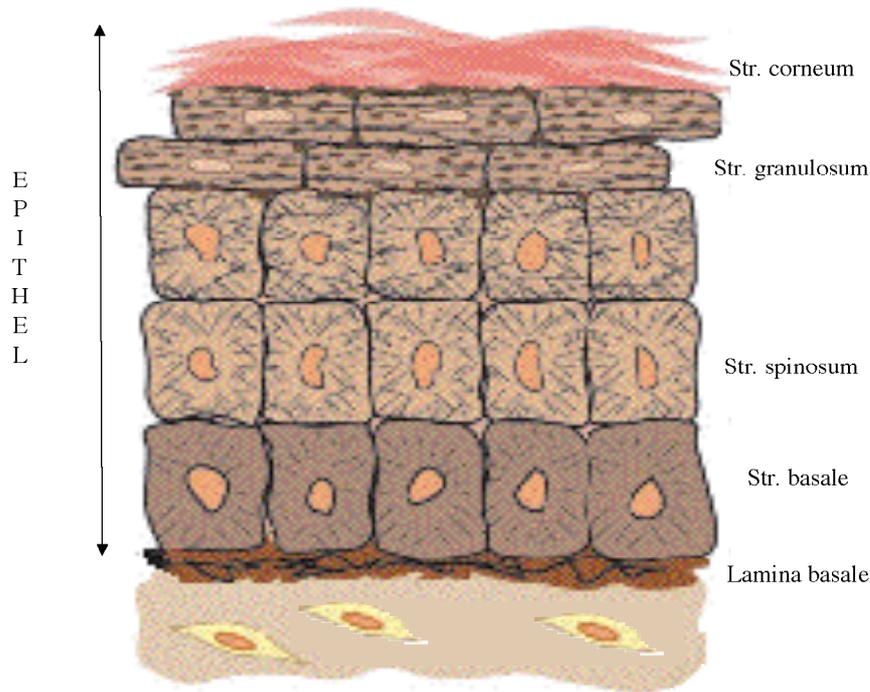


Abbildung 4.1: Schematischer Überblick über den Aufbau der Haut (modifiziert nach Tschesche, 1994; Str.: Stratum)

4.2 Erkrankungen der Haut und PAF-Rezeptor-vermittelte Wirkungen auf die Haut

Humane Keratinozyten exprimieren, wie beschrieben, den PAF-Rezeptor und können PAF und dessen natürliche Derivate produzieren. In Abhängigkeit vom Zelltyp, der PAF-Konzentration und dem Zellzyklus werden sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte auf die Proliferation von Keratinozyten beschrieben. Mäuse, die den PAF-Rezeptor nicht exprimieren, zeigen keine Auffälligkeit der Haut. Somit scheint der PAF-Rezeptor für die Morphogenese der Haut nicht essenziell zu sein (Sato et al., 1999). Transgene Mäuse, die den PAF-Rezeptor überexprimieren, weisen vermehrt pigmentierte Zellen auf. In diesen Tieren

ist auch die Anzahl der Keratinozyten erhöht, wodurch es zur Verdickung des *Stratum spinosum* kommt (Ishii et al., 1997).

Die *Psoriasis vulgaris*, die Schuppenflechte, zählt zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen der Haut und betrifft ca. 2% der Bevölkerung. Sie gilt als multifaktorielles Ereignis mit genetischer Prädisposition. Die primären Hautveränderungen sind durch das schubweise Auftreten von roten, mit weisslichen Schuppen bedeckten, scharf begrenzten Flecken gekennzeichnet. Am häufigsten betroffen sind die Streckseiten der Ellbogen, die Knie, die behaarte Kopfhaut sowie die Nägel. Die Rückbildung erfolgt meist narbenlos, in seltenen Fällen kann die *Psoriasis* allerdings mit einer deformierenden Arthritis einhergehen.

Psoriatische Hautveränderungen sind durch eine gestörte Balance zwischen Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet. Aus psoriatischen Läsionen konnte PAF isoliert werden (Mallet und Cunningham, 1985). Anti-psoriatische Medikamente, wie Dexamethason, inhibieren die PAF-Biosynthese und beschleunigen den Abbau von PAF. Bei *Psoriasis*-Patienten ist sowohl in betroffener als auch in nicht-läsionaler Haut eine erhöhte PAF-Synthese nachweisbar. Bei Abnahme der PAF-Konzentration tritt eine klinische Besserung ein (Liu et al., 1994).

Zu den vielfältigen, etablierten Therapeutika gehören Anthralin, Vitamin D3-Analoga, Kortikosteroide, Fumarsäureester, Methotrexat, die Phototherapie, die PUVA-Therapie, Makrolidantibiotika oder Cyclosporin. Derzeit befinden sich aber auch höhermolekulare Immuntherapeutika in der klinischen Entwicklung. Dazu zählen monoklonale anti-CD4-Antikörper, die eine T-Zell-Blockade hervorrufen und dadurch die T-Zell-Proliferation inhibieren, Calcineurin-Inhibitoren, die zur Inhibition der Zytokin-Freisetzung führen, TNF α -Antikörper wie Infliximab[®] oder IL-2-Fusionstoxine. Mit Hilfe dieser Arzneistoffe lässt sich eine schwere Verlaufsform bessern (Gniadecki und Calverley, 2002; Mease, 2005). Darüber hinaus ist mit Efalizumab[®] ein anti-CD11-Antikörper für die systemische Psoriasis-Therapie im Handel. Die CD11-Blockade bewirkt eine Hemmung der T-Zell-Proliferation. Etanercept[®] ist ein löslicher TNF α -Rezeptor zur systemischen Behandlung entzündlicher, arthritischer Verlaufsformen der Psoriasis.

Auch bei der atopischen Dermatitis greifen Entzündungsreaktionen und epidermale Differenzierungsprozesse ineinander. Entzündungen oder Veränderungen im Lipidgehalt des *Stratum corneum*s führen zu einer erhöhten Permeabilität der Epidermis, die durch einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust nachweisbar ist (Rudolph und Kownatzki, 2004).

PAF ($0,1\mu M$) hemmt die Proliferation von HaCaT-Zellen, dieser Effekt ist durch den

PAF-Rezeptor-Antagonisten WEB 2086 hemmbar. Der PAF-Rezeptor-Antagonist hat keinen Einfluss auf die Proliferation unstimulierter Zellen, induziert aber eine stärkere Verhornung, die durch Gabe exogenen PAFs reversibel ist (Shimada et al., 1998). Dies weist darauf hin, dass geringe Mengen an PAFs in einer negativen Rückkopplung die Differenzierung hemmen und gleichzeitig als Mitogen wirken können. Das führt zu dem oben beschriebenen Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung und erklärt die Bedeutung von PAF bei der Pathogenese von Psoriasis. Die Beeinflussung sowohl der Zytokinen-Produktion als auch der Arachidonsäure-Metabolite gibt Hinweise auf die Beteiligung von PAF und seinem Rezeptor an entzündlichen Prozessen in der Haut (Pei et al., 1998; Alappatt et al., 2000).

5 Zielsetzung

Es sind viele verschiedene synthetische Phospholipide bekannt, die sich in ihrer anti-proliferativen Wirkung stark unterscheiden. Es ist allgemein akzeptiert, dass synthetische Phospholipide aufgrund mehrerer unterschiedlicher Mechanismen ihre Wirkung ausüben. Dabei ist bisher noch nicht vorhersagbar, welche synthetische Verbindung in einem bestimmten biologischen Modell effektiv ist.

Das neuartige, glykosidierte Phospholipid Inositol-C2-PAF sollte in seiner Wirkung im Rahmen dieser Arbeit biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden.

Ausgehend von der Überlegung, dass die Vergleichssubstanz Hexadecylphosphocholin als topisch applizierter Arzneistoff zur Verfügung steht, wurden die Keratinocyten-Zelllinien HaCaT und SCC-25, Zellen eines Karzinoms, als einfache Modellsysteme für die Charakterisierung der biochemischen Effekte ausgewählt. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf diverse Parameter verschiedener Zellen, wie Toxizität, Proliferation, Migration und Differenzierung, wurde untersucht. Darüber hinaus sollte eine Wirkstoff-Formulierung entwickelt werden, die die Penetration von Inositol-C2-PAF über die Hornschicht-Barriere der Haut ermöglicht.