

im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden abgelöst und durch Einfrier- und Auftauzyklen solubilisiert. Das Polyamin Putrescin dient als Donor der funktionellen Gruppen, die durch das Enzym Transglutaminase mit dem Caseingerüst verknüpft werden. Dazu wird das Solubilisat mit radioaktiv-markiertem ^3H -Putrescin und Casein inkubiert. Durch eine Fällungsreaktion wird die Inkubation beendet. Die Menge an radioaktiv-markiertem ^3H -Putrescin im Präzipitat ist der Aktivität des Enzyms direkt proportional. Als Positiv-Kontrolle dient die Inkubation mit Sphingosin-1-phosphat (Egberts et al., 2004).

Bei der Inkubation mit $1,25\mu\text{M}$ Inositol-C2-PAF zeigt sich eine Erhöhung der Aktivität der Transglutaminase um 52% sowie bei der Inkubation mit $1,25\mu\text{M}$ HePC eine Erhöhung um 133% (Abb. 6.40).

6.2 Fibroblasten

6.2.1 Substanzinduzierte Zytotoxizität

Fibroblasten stellen ebenfalls eine wichtige Zellpopulation der Haut dar, deswegen wurde der Einfluss der Phospholipide auf Primärfibroblasten untersucht.

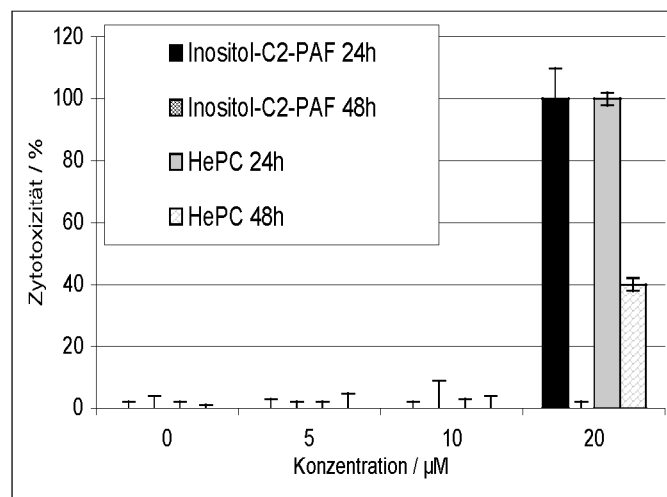


Abbildung 6.41: Substanzinduzierte Zytotoxizität in Primärfibroblasten

Die Experimente wurden mindestens dreimal als Dreifach-Bestimmung durchgeführt, davon werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet.

Auch hier dient die Sekretion des Enzyms Lactat-Dehydrogenase in das Kulturmedium als Indikator für die substanzinduzierte Zytotoxizität. In Primärfibroblasten ist weder bei der Inkubation mit Inositol-C2-PAF noch mit HePC bis zu Konzentrationen von $10\mu M$ ein toxischer Effekt zu beobachten. Sowohl $20\mu M$ Inositol-C2-PAF als auch $20\mu M$ HePC zeigen nach 24h lytische Wirkung. Bei geringeren Konzentrationen wird keine Zytotoxizität im Vergleich mit der Positiv-Kontrolle beobachtet (Abb. 6.41).

6.2.2 Einfluss auf die Zellproliferation

Über den Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin wird der Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Zellproliferation bestimmt.

Inositol-C2-PAF hat bei einer Inkubationsdauer von 24h einen aktivierenden Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten. Bei längerer Inkubation von 48h zeigt sich auch hier der proliferationshemmende Einfluss des Analogons. Es wurde ein IC_{50} Wert von $20\mu M$ für die 48stündige Inkubation ermittelt, bei geringeren Konzentrationen und kürzeren Inkubationszeiten kommt es zu einer Erhöhung der Proliferation von bis zu 30% (Abb. 6.42).

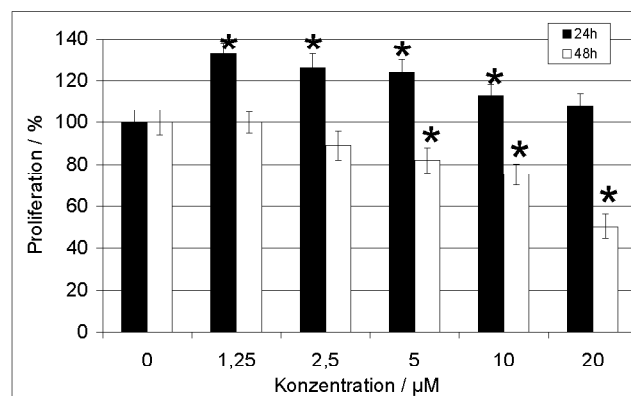


Abbildung 6.42: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Proliferation von Primärfibroblasten

Für diese Experimente werden die Primärfibroblasten 2 Tage vor den Versuchen auf RPMI-Medium, das nur 2% inaktiviertes FCS enthält, gesetzt. In solchem RPMI-Medium werden auch die Inkubationen mit den Phospholipiden und dem BrdU durchgeführt. Der weitere Verlauf der Experimente erfolgt wie für Abb. 6.2 beschrieben. Es werden drei unabhängige Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt. Mit einem * gekennzeichnete Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt.

HePC zeigt in Primärfibroblasten schon bei 24stündiger Inkubation eine Hemmung der Proliferation bei Konzentrationen $\geq 5\mu M$. Nach 48stündiger Inkubation liegt der IC_{50} Wert bei $\geq 10\mu M$ (Abb. 6.43).

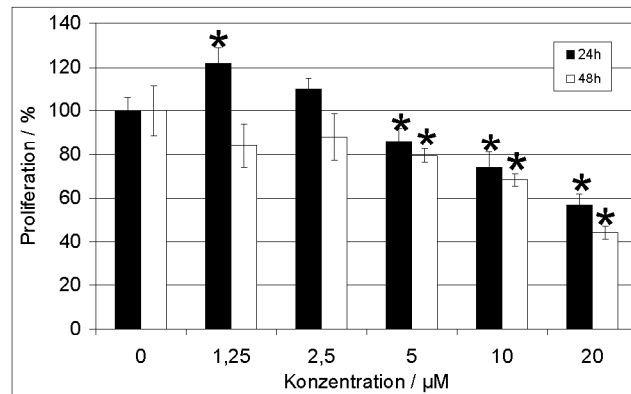


Abbildung 6.43: Einfluss von HePC auf die Proliferation von Primärfibroblasten

Es werden drei unabhängige Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt. Mit einem * gekennzeichnete Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelter Kontrollzellen, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt.

6.3 Zellen des Blutes

6.3.1 Einfluss auf die Zellproliferation

Die Epidermis wird von Blutgefäßen der unterliegenden Dermis versorgt, so dass auch Interaktionen der Phospholipid-Analoga mit Zellen des peripheren Blutes berücksichtigt werden müssen. Deswegen wurde der Einfluss der Phospholipidanaloga auf periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC; peripheral blood monocyctic cells) untersucht. PBMCs umfassen alle Zellen des Blutes, außer Erythrozyten und Granulozyten. Die Aktivierung dermalen T-Zellen kann in Zusammenhang mit der Entwicklung und dem chronischen Auftreten von Psoriasis stehen (Gottlieb, 1988). In Folge der im Gewebe ausgelösten Entzündung werden Monozyten zu den Entzündungsherden rekrutiert und differenzieren zu gewebständigen Makrophagen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF und

HePC auf T-Zellen und Monozyten untersucht, um abzuklären, ob Nebenwirkungen durch die Analoga aufgrund der Wechselwirkungen mit Zellen des Blutes zu erwarten sind.

Dazu werden PBMCs aus humanem Vollblut aufgereinigt und bei 37°C inkubiert. Weil diese Zellen eine geringere Proliferationsrate aufweisen als HaCaT-Zellen, wurde der Einfluss auf die Proliferation anders bestimmt. Dabei werden 10^5 PBMCs für 4 Stunden mit einem membrangängigen Indikator bei 37°C inkubiert. Im Zellinneren bewirken Enzyme einen Farbumschlag des Indikators. Je aktiver der Stoffwechsel der Zellen, desto größer ist der Farbumschlag, der photometrisch ausgewertet wird.

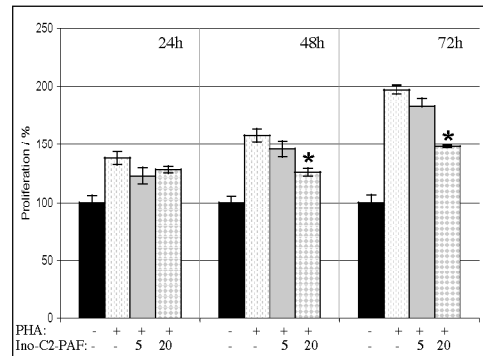
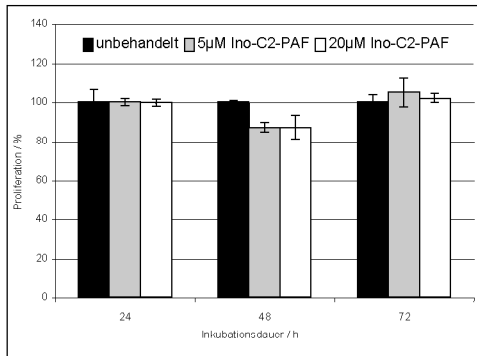
Inositol-C2-PAF hat in einem Konzentrationsbereich von $5\mu M$ oder $20\mu M$ auf die Proliferation unstimulierter, peripherer Blutzellen keinen Einfluss (Abb.6.44, oben links).

In Phytohämagglutinin-stimulierten Blutzellen ist dahingegen eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition durch Inositol-C2-PAF zu beobachten. Nach 48stündiger Inkubation zeigen $5\mu M$ keinen Effekt, bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 72h wird die Proliferation um circa 15% gehemmt. $20\mu M$ Inositol-C2-PAF hemmen die Proliferation jeweils um 25% (Abb. 6.44, oben rechts).

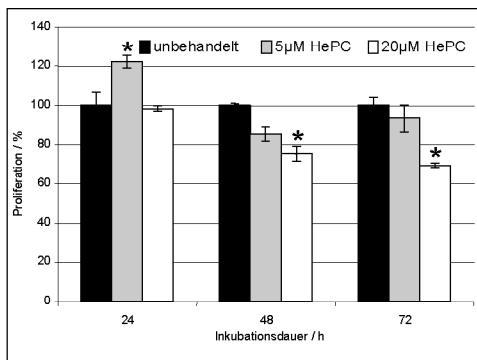
Im Gegensatz zu Inositol-C2-PAF hat HePC schon einen Einfluss auf nicht-aktivierte PBMCs. Auffällig ist die Steigerung der Proliferation um 20% bei der 24stündigen Inkubation mit $5\mu M$ HePC. Nach 48stündiger Inkubation führen sowohl $5\mu M$ als auch $20\mu M$ HePC zur Inhibition der Proliferation um 20% bzw. 30%. Bei Verlängerung der Inkubation auf 72h zeigt eine Konzentration von $5\mu M$ keinen Effekt, aber $20\mu M$ HePC führen zu einer Verminderung der Proliferation um 30% (Abb. 6.44, unten links).

Auch in Phytohämagglutinin-stimulierten, peripheren Blutzellen wird die Proliferation nach 24h durch die Inkubation mit $5\mu M$ oder $20\mu M$ HePC um 20% gesenkt. Verlängert man den Inkubationszeitraum auf 48h, steigt die Hemmung der Proliferation durch $5\mu M$ bzw. $20\mu M$ HePC auf 30% an. Nach 72stündiger Inkubation beträgt die Inhibition durch $5\mu M$ HePC circa 10%. Die Hemmung beträgt 32% bei einer Konzentration von $20\mu M$ HePC (Abb. 6.44, unten rechts).

Periphere, mononukleäre Blutzellen
 Inositol-C2-PAF Inositol-C2-PAF + PHA



HePC



HePC + PHA

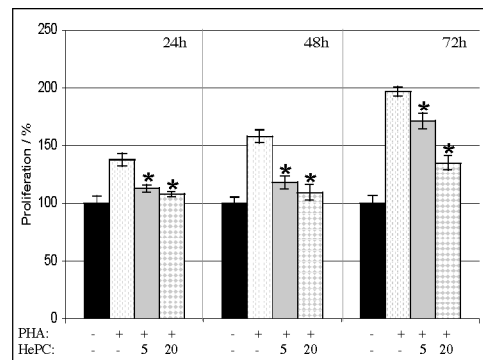


Abbildung 6.44: Einfluss der Analoga auf die Proliferation von PBMCs
 10^5 Zellen/96Well wurden für die indizierten Zeiträume mit Inositol-C2-PAF ($5\mu M$ oder $20\mu M$) inkubiert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgt mit dem CellTiter 96® Assay von Promega. Dazu werden 4h vor Ende des Inkubationszeitraums $20\mu L$ /Well des Reagenz dazu gegeben. Der Farbumschlag am Ende der Inkubationszeit wird photometrisch am ELISA-Reader bei 490nm gemessen. Die Aktivierung von PBMCs wurde mit $1ng/mL$ PHA durchgeführt. Es werden drei unabhängige Dreifach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung bestimmt. Mit einem * gekennzeichnete Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen unbehandelte Kontrollzellen (linke Grafiken) oder von PHA-stimulierten Kontrollzellen (rechte Grafiken), bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt.

Tabelle 6.4 fasst den Einfluss von Inositol-C2-PAF und HePC auf die Proliferation verschiedener Zellen noch einmal zusammen.

Tabelle 6.4: Einfluss auf die Zell-Proliferation nach 48h Inkubation

Zellart	Ino-C2-PAF ($5\mu M$)	HePC ($5\mu M$)
HaCaT	-80%	-40%
SCC-25	-80%	-78%
Primärfibroblasten	+20%	-20%
periphere Blutzellen	-17% ($20\mu M$)	-22% ($20\mu M$)
stimulierte periphere Blutzellen	-24% ($20\mu M$)	-30% ($20\mu M$)

6.3.2 Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Apoptose

Für die Untersuchungen an peripheren Blutzellen wurde die Methode der Annexin V-FITC / Propidiumiodid-Doppelfärbung zur Bestimmung der Apoptose-Induktion eingesetzt, um auch frühe Stadien der Apoptose zu erfassen (Abb. 6.45).

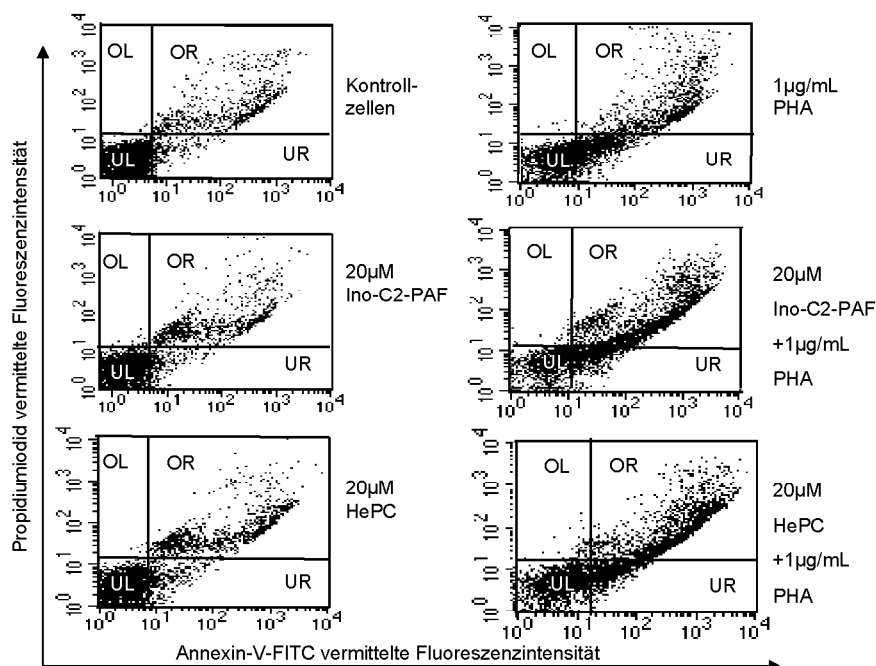


Abbildung 6.45: Annexin V-FITC und Propidiumiodid-Doppelfärbung peripherer Blutzellen nach 48h Inkubation

Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt und jeweils 20.000 Zellen ausgewertet, da es sich aber jedesmal um Individualproben handelt, ist hier ein repräsentatives Beispiel gezeigt. Die Stimulation erfolgte mit $1\mu g/mL$ PHA.

Annexin V ist ein Protein, das selektiv an Phosphatidylserin bindet. Die Translokation von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite zur Außenseite lässt sich während der frühen Apoptose beobachten. Die Erfassung des Annexin V erfolgt über die direkte Kopplung des Proteins an den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Die Auswertung kann dadurch mittels FACS-Analyse erfolgen. Trägt man die Propidiumiodid-vermittelte Fluoreszenzintensität gegen das durch Annexin V-FITC ausgelöste Fluoreszenzsignal auf, sind Annexin V-FITC-negative, Propidiumiodid-negative Zellen im Quadranten unten links lokalisiert. Dieser Quadrant entspricht den unbeeinflussten Zellen. Es kommt zu einer Erhöhung der Annexin V-FITC-vermittelten Fluoreszenzintensität, wenn diese Zellen initial apoptotisch und damit Annexin V-FITC positiv werden (Quadranten unten rechts). Spät-apoptotische Zellen weisen eine Doppelfärbung Propidiumiodid/Annexin V-FITC auf, das entspricht dem Quadranten oben rechts. Bei diesen Zellen ist sowohl die Annexin V-FITC-vermittelte als auch die Propidiumiodid-vermittelte Fluoreszenzintensität erhöht. Nekrotische Zellen sind durch den ausschließlichen Anstieg der Propidiumiodid-vermittelten Fluoreszenzintensität gekennzeichnet (Quadranten oben links).

In Abbildung 6.46 ist der Einfluss der Inkubation und Dauer derselben mit Phytohämagglutinin auf PBMCs gezeigt. Zur Induktion apoptotischer Prozesse werden die PBMCs mit $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA stimuliert (Mahdi et al., 1995). Nach 24stündiger Inkubation in RPMI sind 80% der Zellen viabel, 5% befinden sich in einem früh-apoptotischen und 15% in einem spät-apoptotischen Zustand. Der Anteil der nekrotischen Zellen ist $\leq 1\%$. Die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48h hat nur geringe Auswirkungen, so sinkt der Anteil viabler Zellen auf 75%. Der Anteil früh-apoptotischer Zellen bleibt bei 5%, während der Anteil spät-apoptotischer Zellen auf 21% ansteigt. Der Anteil nekrotischer Zellen ist unverändert. Durch die Inkubation mit PHA sinkt der Anteil viabler Zellen auf 53%, dies geschieht zu Lasten der früh- und spät-apoptotischen Zellen. Diese Anteile erhöhen sich auf 18% bzw. 28%. Aber auch in diesem Fall bleibt der Anteil nekrotischer Zellen unverändert. Eine Verlängerung der Inkubation mit PHA auf 48h löst keinen weiteren apoptotischen Effekt aus.

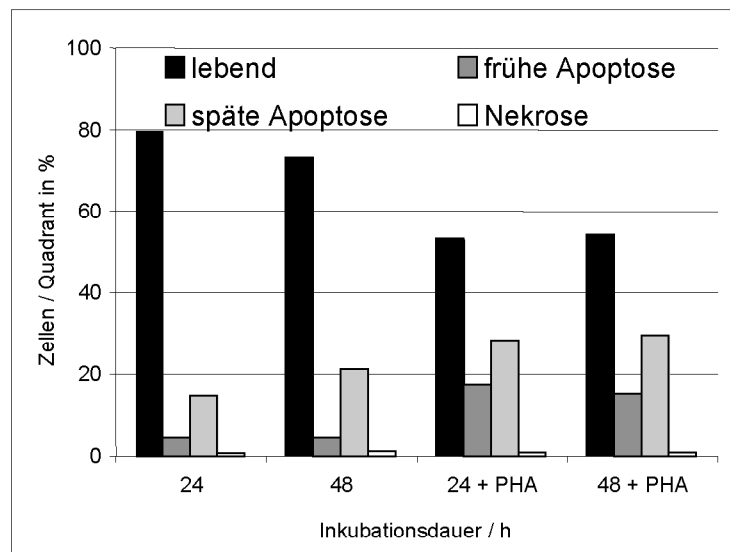


Abbildung 6.46: Einfluss von Phytohämagglutinin auf periphere Blutzellen nach 24h bzw. 48h Inkubation

Periphere Blutzellen werden über Ficoll-Gradienten-Zentrifugation gereinigt und zu 10^6 Zellen/24 Well in 1 mL RPMI-Medium kultiviert. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Phospholipid ($20\mu M$ Inositol-C2-PAF oder $20\mu M$ HePC) werden $100\mu L$ in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wird mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und für 45 min mit Annexin V-FITC auf Eis (abgedunkelt) inkubiert. Nach dem Waschen mit eiskaltem Bindungspuffer wird kurz vor der Messung Propidiumiodid (Endkonzentration $0,2\mu g/mL$) zugesetzt. Die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt und jeweils 20.000 Zellen ausgewertet, da es sich aber jedesmal um Individualproben handelt, ist hier ein repräsentatives Beispiel gezeigt.

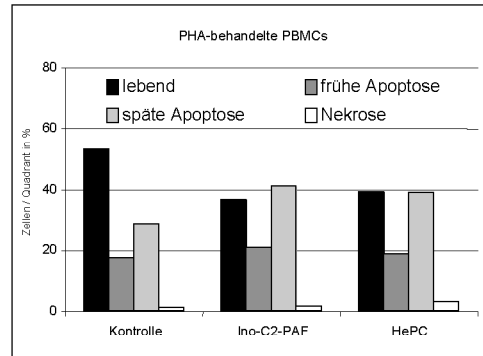
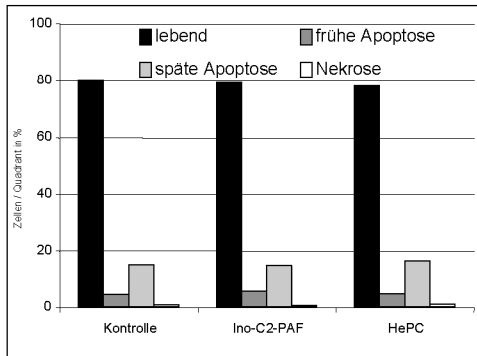
Eine 24stündige Inkubation peripherer Blutzellen mit Inositol-C2-PAF oder HePC hat keinen Einfluss auf das Verhältnis zwischen lebenden, früh- oder spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen (Abb. 6.47, oben links).

Bei den mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen kommt es nach 48stündiger Inkubation zu einer Verringerung des Anteiles viabler Zellen auf 58%, dahingegen nimmt der Anteil früh-apoptotischer Zellen von 5% auf 12% zu. Der Anteil spät-apoptotischer Zellen erhöht sich auf 30%. Unbeeinflusst bleibt wiederum der Anteil nekrotischer Zellen. Die Inkubation mit HePC führt zu ähnlichen Ergebnissen. Der Anteil viabler Zellen sinkt auf 62%, die Anteile der früh-apoptotischen Zellen steigen auf 10% und die der spät-apoptotischen Zellen auf 26%. Wiederum ist kein Einfluss auf den Anteil nekrotischer Zellen sichtbar (Abb. 6.47, unten links).

Periphere, mononukleäre Blutzellen

24h

24h + PHA



48h

48h + PHA

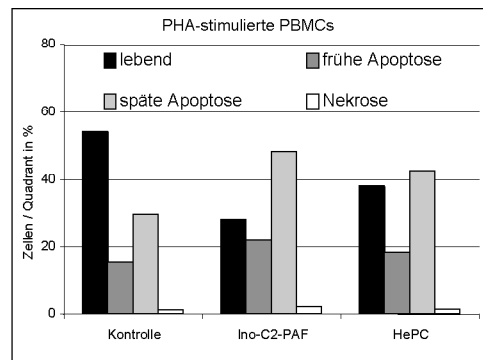
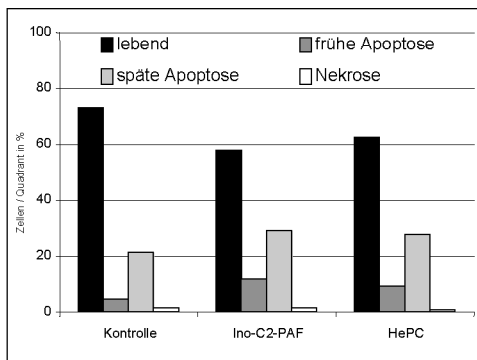


Abbildung 6.47: Einfluss der Analoga auf die Apoptose in PBMCs

Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt und jeweils 20.000 Zellen ausgewertet, da es sich jeweils um Individualproben handelt, ist hier ein repräsentatives Beispiel gezeigt. Die Inkubation erfolgt mit $20\mu M$ Inositol-C2-PAF bzw. $20\mu M$ HePC. Die Stimulation erfolgt mit $1\mu g/mL$ PHA.

In Phytohämagglutinin-stimulierten T-Lymphozyten führt die 24stündige Inkubation mit Inositol-C2-PAF zur Verminderung des Anteils lebender Zellen auf 37%. Gleichzeitig steigt der Anteil früh-apoptotischer Zellen auf 21% und der Anteil spät-apoptotischer Zellen auf 41% an. Unbeeinflusst bleibt der Anteil nekrotischer Zellen. Die Inkubation mit HePC führt zu einem ähnlichen Ergebnis. Der Anteil lebender Zellen wird auf 39% verringert, wohingegen der Anteil früh-apoptotischer Zellen auf 19% und der Anteil spät-apoptotischer Zellen auf 39% erhöht wird. Im Vergleich zu Inositol-C2-PAF behandelten Zellen wird durch die Inkubation mit HePC der Anteil nekrotischer Zellen von 1% auf 3% erhöht. (Abb. 6.47,

oben rechts).

In den mit Phytohämagglutinin-stimulierten T-Lymphozyten führt die Verlängerung der Inkubationszeit auf 48h bei der zusätzlichen Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer Abnahme des Anteiles viabler Zellen auf 28%, gleichzeitig steigt der Anteil früh-apoptotischer Zellen auf 22% und der Anteil spät-apoptotischer Zellen auf 48% an. Der Anteil nekrotischer Zellen steigt auf 2% an. Die Inkubation mit HePC zeigt die gleiche Tendenz, führt jedoch zu schwächer ausgeprägten Effekten als die Inkubation mit Inositol-C2-PAF. So sinkt der Anteil viabler Zellen auf 38%, bei gleichzeitiger Zunahme des Anteiles früh-apoptotischer Zellen auf 18% und Zunahme des Anteiles spät-apoptotischer Zellen auf 43%. Unbeeinträchtigt bleibt der Anteil nekrotischer Zellen (Abb. 6.47, unten rechts).

6.3.3 Beeinflussung von Zellen des Immunsystems

Um zu überprüfen, ob eine Modulation der Entzündungsreaktion oder der spezifischen Immunantwort durch Gabe der Analoga zu erwarten ist, wurden differenzierte Monozyten und T-Lymphozyten mit Inositol-C2-PAF oder HePC inkubiert. Der Einfluss der Analoga auf diese Zellen wurde anhand ausgewählter Marker untersucht.

Für die Untersuchungen an T-Zellen wurden die Marker CD4, CD25, CD69 und CD95 herangezogen, um den Aktivierungszustand der T-Zellen zu charakterisieren. T-Helferzellen exprimieren den Marker CD4. CD69 ist ein Ligand der B7-Familie und dient als Marker für die frühe Aktivierung von T-Zellen. CD25 ist die α -Kette des Interleukin 2-Rezeptors und dient als Marker für die späte Aktivierung von T-Zellen. Der Fas-Rezeptor, CD95, vermittelt und markiert apoptotische Prozesse.

Für die Untersuchungen an Monozyten wurden die Marker CD16, CD86, CD163 und HLA-DR ausgewählt. CD86 dient als Ko-Effektor bei der Signaltransduktion zwischen antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen. CD163 ist ein Mitglied der ‚scavenger receptor‘-Familie und wird ausschließlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD163 kann entweder direkt, über intrazelluläre Signalwege, die zur Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine führen, oder indirekt, über die anti-inflammatorischen Effekte der Hämoglobin-Metabolite, Einfluss auf Entzündungsreaktionen nehmen (Moestrup und Moller, 2004). HLA-DR ist ein Subtyp der MHC II-Proteine und als solcher zur Antigen-Präsentation befähigt und für die Selbsterkennung des Immunsystems wichtig.

Die Untersuchungen wurden mittels spezifischer Antikörper am FACS-Gerät durchgeführt. Für die Experimente mit den T-Zellen werden nur CD3 positive Zellen ausgewertet, weil CD3 ein invariabler Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes ist und somit

alle T-Zellen erfasst werden (Clevers et al., 1988). Für die Experimente an Monozyten werden nur CD14 positive Zellen ausgewertet, denn trotz der Heterogenität der peripheren Monozyten tragen alle das CD14 Molekül (Scherberich, 2003). Tote Zellen werden jeweils von den Messungen ausgeschlossen.

Weder Inositol-C2-PAF noch HePC (je $20\mu M$) haben bei 24- oder 48stündiger Inkubation unstimulierter T-Zellen Einfluss auf die getesteten T-Zell-Marker (Tab. 6.5). Das Balkendiagramm ist nicht gezeigt.

Tabelle 6.5: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter T-Zell-Marker

	RPMI	+ $20\mu M$ Ino-C2-PAF	+ $20\mu M$ HePC
24h			
CD4	63	62	62
CD25	0	1	0
CD69	0	0	0
CD95	1	1	1
48h			
CD4	61	60	49
CD25	1	1	1
CD69	1	1	0
CD95	1	1	0

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD3 positive Zellen gewertet. Angegeben ist ein repräsentatives Beispiel der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten bezogen auf CD3 positive Zellen.

Aktiviert man T-Zellen mit 5ng/mL PHA für 48h steigt die Expression von CD25 um 90%, CD95 um 280% im Vergleich mit der 24stündigen Inkubation an. Die Expression von CD69 nimmt dahingegen um 20% ab. Auf die Expression von CD4 hat die Inkubation mit PHA keinen Einfluss.

Die Expression von CD4, CD25 und CD95 wird durch die 24stündige Inkubation aktivierter T-Zellen mit Inositol-C2-PAF nicht beeinflusst, aber es kommt zu einer Erniedrigung der CD69 Expression um 50%. HePC bewirkt, in PHA aktivierten T-Zellen, eine 36%ige Verstärkung der CD25 Expression, die weiteren Marker sind von HePC unbeeinflusst (Abb. 6.48 und Tab. 6.6).

Nach 48stündiger Inkubation von Inositol-C2-PAF mit aktivierten T-Zellen ist die Expression von CD25 um 33% gestiegenen, aber die Expression von CD4, CD69 und CD95 bleibt unbeeinflusst.

Nach 48stündiger Inkubation aktivierter T-Zellen mit HePC ist die Expression von CD25 um 26%, von CD69 um 45% und von CD95 um 32% erhöht. Wiederum ist die Expression von CD4 unverändert (Abb. 6.48 und Tab. 6.6).

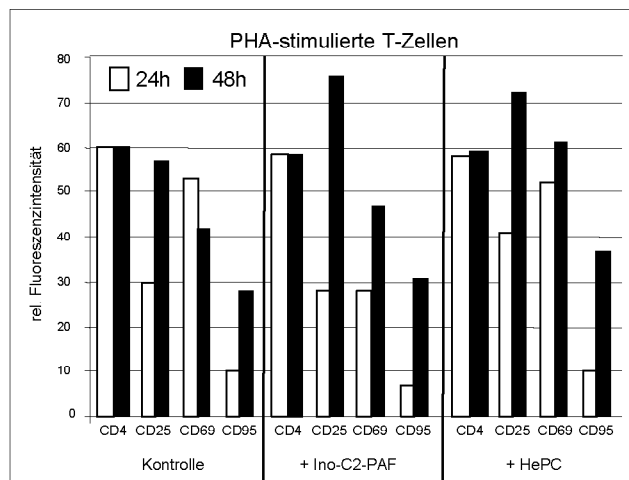


Abbildung 6.48: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter T-Zell-Marker bei vorstimulierten T-Zellen

Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der mittleren Fluoreszenzintensitäten. 10^6 PBMC/mL RPMI-Medium werden in 24Well-Platten kultiviert. Nach Beendigung der indizierten Inkubationszeit werden $100\mu\text{L}$ der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen übertragen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgt für 45min abgedunkelt auf Eis. Die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD3 positive Zellen gewertet.

Tabelle 6.6: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter T-Zell-Marker bei vorstimulierten T-Zellen

	+5ng/mL PHA	+20 μ M Ino-C2-PAF +5ng/mL PHA	+20 μ M HePC +5ng/mL PHA
24h			
CD4	60	58	57
CD25	30	28	41
CD69	53	28	52
CD95	10	7	10
48h			
CD4	61	58	59
CD25	57	76	72
CD69	42	47	61
CD95	28	31	37

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD3-positive Zellen gewertet. Angegeben ist ein repräsentatives Beispiel der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten bezogen auf CD3 positive Zellen.

Die Expression der oben erwähnten Monozyten-Marker wird im Verlauf der Zell-Kultur über 48h verändert. Im Vergleich zu Kontrollzellen verdoppelt sich die CD16 Expression und die HLA-DR Expression wird um den Faktor 4,5 gesteigert. Sowohl die CD86 Expression als auch die CD163 Expression werden um jeweils ca. 35% gesteigert.

Die 24stündige Inkubation mit Inositol-C2-PAF führt zu einer Erhöhung der Expression von CD16 um 46%, CD86 um 44%, CD163 um 93% und zu einer Erhöhung der HLA-DR Expression um 37%. Bei der Verlängerung der Inkubationszeit mit Inositol-C2-PAF auf 48h ist die Expression von CD16 und CD86 unbeeinflusst, während die Expression von CD163 um 72% und von HLA-DR um 75% sinkt.

Bei der Inkubation mit HePC kommt es im Gegensatz zur Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer Erniedrigung der CD86 um 15% nach 24 Stunden. Die Expression der Marker CD16, CD163 und HLA-DR wird je um 65%, 201% und 64% erhöht. Nach 48stündiger Inkubation mit HePC ist die Expression von CD16 unbeeinflusst, CD86 um 84% erhöht, CD163 um 66% erniedrigt, nur die HLA-DR Expression wird nicht beeinflusst (Abb. 6.49 und Tab. 6.7).

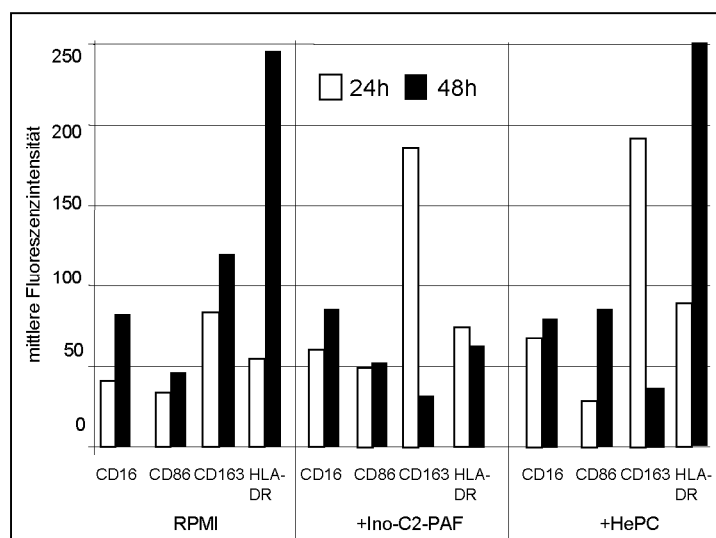


Abbildung 6.49: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter Monozyten-Marker

Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der FACS-Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD14-positive Zellen gewertet. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel des Medians der Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 6.7: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter Monozyten-Marker

	RPMI	+ 20 μ M Ino-C2-PAF	+20 μ M HePC
24h			
CD16	41	60	68
CD86	34	49	29
CD163	93	180	187
HLA-DR	54	74	89
48h			
CD16	82	85	80
CD86	46	52	85
CD163	122	34	41
HLA-DR	246	63	250

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische

Auswertung werden nur CD14-positive Zellen gewertet. Angegeben ist ein repräsentatives Beispiel des Medians der Fluoreszenzintensitäten.

Werden Kontroll-Monocyten mit Interferon γ stimuliert, nimmt nach 24 Stunden die CD16 und CD86 Expression um 48% bzw. 23% zu. Die CD163 Expression bleibt unbeeinträchtigt, während die HLA-DR Expression verdoppelt wird. Nach 48stündiger Inkubation wird die CD16 Expression, im Vergleich zur 24stündigen Inkubation mit Interferon γ , verdoppelt. Die Expression von CD86 steigt um 30%, die Expression von CD163 ist um 57% erniedrigt. Unbeeinflusst bleibt die Expression von HLA-DR.

Inositol-C2-PAF führt in stimulierten Monozyten schon nach 24stündiger Inkubation zu einer Erhöhung der Expression von CD163 um 49%. Im Gegensatz dazu ist die Expression von CD16 um 25%, von CD86 um 31%, von HLA-DR um 55% erniedrigt. Bei Verlängerung der Inkubation mit Inositol-C2-PAF auf 48h ist die CD16 Expression schwach um 17% erniedrigt. Die CD86 Expression wird verfünffacht, wohingegen die CD163 Expression unbeeinflusst bleibt. Die HLA-DR Expression ist schwach um 17% erhöht.

Bei der Inkubation von HePC und Interferon γ -stimulierten Monozyten zeigt sich ein sehr unterschiedliches Bild im Vergleich zu der Inkubation mit Inositol-C2-PAF. Die Expression von CD16 bleibt durch die 24stündige Inkubation mit HePC unbeeinflusst. Aber auch die Expression von CD86 wird um 38% und die Expression von CD163 um 276% erhöht. Auch die HLA-DR Expression ist um 46% erhöht. Nach 48stündiger Inkubation mit HePC ist die Expression von CD16 um 35% erniedrigt. Die Expression von CD86 wird um 62% erhöht, ebenfalls bleibt die Expression von CD163 unbeeinflusst auf dem Niveau der Interferon γ -stimulierten Kontroll-Monozyten. Die Expression von HLA-DR wird auch in diesem Fall durch die Inkubation mit dem Phospholipidanalogon nur schwach um 14% gesenkt (Abb. 6.50 und 6.8).

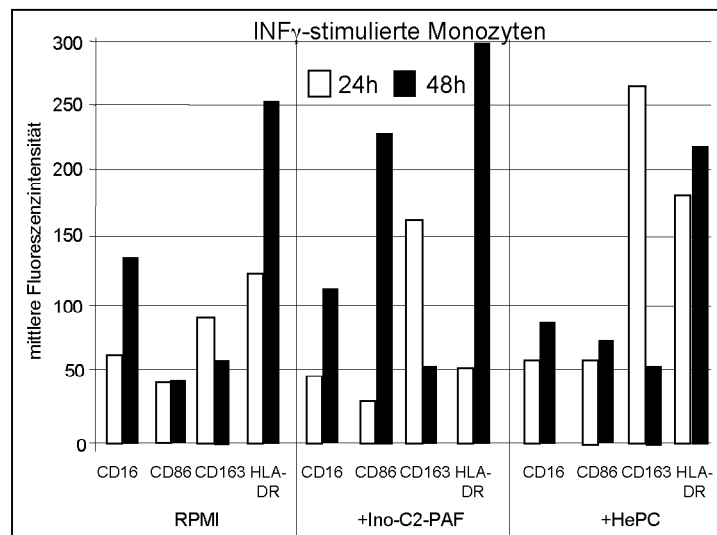


Abbildung 6.50: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression ausgewählter Monozyten-Marker bei vorstimulierten Monozyten

Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD14-positive Zellen gewertet. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel des Medians der Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 6.8: Einfluss von Inositol-C2-PAF oder HePC auf die Expression verschiedener Monozyten-Marker bei vorstimulierten Monozyten

	+ 300U/mL Interferon γ	+ 20 μ M Ino-C2-PAF + 300U/mL Interferon γ	+ 20 μ M HePC + 300U/mL Interferon γ
24h			
CD16	61	46	57
CD86	42	29	58
CD163	95	142	263
HLA-DR	116	52	170
48h			
CD16	127	106	83
CD86	43	213	70
CD163	53	50	50
HLA-DR	235	275	203

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, die Auswertung erfolgt am FACS-Gerät. Es werden 20.000 Zellen gezählt, nekrotische Zellen werden von der Messung ausgeschlossen und für die rechnerische Auswertung werden nur CD14-positive Zellen gewertet. Angegeben ist ein repräsentatives Beispiel der mittleren Fluoreszenzintensitäten.

7 Penetrationsstudien

7.1 Herstellung von Nanoemulsionen

Emulsionen sind zwei- oder mehrphasige Systeme nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten. Der Spezialfall der Nanoemulsionen ist durch die Partikelgröße im Bereich von $50nm-1000nm$ gekennzeichnet (Tadros et al., 2004). HePC- und Inositol-C2-PAF-haltige Nanoemulsionen werden mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. Um eine gute Verarbeitung zu gewährleisten, wird eine Öl-in-Wasser Voremulsion hergestellt. Dazu wurde ein Rotor-Stator-Rührer verwendet. Die anschließende Hochdruckhomogenisation in einem Kolben-Spalt-Homogenisator wird standardisiert bei einem Druck von 500 bar und Raumtemperatur durchgeführt. Der Herstellungsvorgang wird dreimal wiederholt, um eine enge Partikelgrößenverteilung und eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. Die Bestandteile der Nanoemulsion sind Inositol-C2-PAF bzw. HePC, Miglyol 812, Poloxamer 188 und gereinigtes Wasser. Die Emulsionen werden in Glasflaschen umgefüllt und mit Gummistopfen und Bördelkappen verschlossen (Abb. 7.1). Bis zur weiteren Verwendung werden die Emulsionen im Kühlschrank gelagert.



Abbildung 7.1: 0,125%ige Inositol-C2-PAF- oder HePC-haltige Nanoemulsionen

7.2 Charakterisierung der Nanoemulsionen

Emulsionen zeigen die Tendenz zur Instabilität. Verantwortlich dafür kann zum Beispiel die hohe Grenzflächenenergie des Systems sein. Öle weisen gegenüber Wasser eine hohe Grenzflächenspannung auf und die Grenzflächenenergie wächst proportional zum Dispersitätsgrad des Systems. Das Zusammenfließen der Tröpfchen der inneren Phase wird als Koaleszenz bezeichnet. Eine zweite Form der Instabilität ist die Flokkulation. Dabei lagern sich die Tröpfchen der inneren Phase zu lockeren Aggregaten zusammen ohne ihre Individualität zu verlieren, das heißt, diese Art der Instabilität ist durch mechanische Belastung reversibel (Capek, 2004).

Zur Charakterisierung der Nanoemulsionen wurde die Partikelgröße mittels Laserdiffraktometrie und die Partikelgrößenverteilung mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie gemessen. Die Messungen wurden an den Tagen 7 und 28 nach der Herstellung durchgeführt. Der Polydispersitätsindex (PI) ist eine Kenngröße für die Partikelgrößenverteilung innerhalb eines Systems. Je kleiner der Wert, der stets zwischen 0 und 1 liegt, desto homogener ist die Partikelgrößenverteilung. In den unten aufgeführten Tabellen sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt (Tabellen 7.1 und 7.2).

Tabelle 7.1: Ergebnis der Messungen nach 7 Tagen Lagerung

ALP	Konzentration in %	Durchmesser in <i>nm</i>	PI
Ino-C2-PAF	0,25	94	0,21±0,05
HePC	0,25	107	0,21±0,06

Tabelle 7.2: Ergebnis der Messungen nach 28 Tagen Lagerung

ALP	Konzentration in %	Durchmesser in <i>nm</i>	PI
Placebo	-	102	0,15±0,02
Ino-C2-PAF	0,25	97	0,11±0,03
HePC	0,25	128	0,16±0,05

7.3 Anreicherung der Phospholipide in HaCaT-Zellen

Auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Therapeutikums bei hyperproliferativen Erkrankungen der Haut muss gewährleistet sein, dass die Substanzen sowohl die Hornschicht der Haut überwinden als auch in die Zellen aufgenommen werden. Beides wurde im Folgenden untersucht. Die Basis derartiger Untersuchungen bildet eine Analytik zum Nachweis der Analoga nach der Behandlung von Zellen oder Vollhaut. Die Analyse der Phospholipidanaloga erfolgte mittels MALDI-TOF-MS (in Kooperation mit Dr. Martin Zimmermann-Kordmann, Charité - Universitätsmedizin Berlin) an intakten Zellen, isolierten Zellmembranen und Gefrierschnitten humaner Haut.

In Abb. 7.2 ist der zeitabhängige Verlauf der Aufnahme von Inositol-C2-PAF in HaCaT-Zellen gezeigt. Die Daten zeigen, dass Inositol-C2-PAF innerhalb der getesteten Zeiträume aufgenommen wird und stabil ist. Als Kontrolle dienen unbehandelte HaCaT-Zellen. Die relative Aufnahme von Inositol-C2-PAF wird aus der Relation der Signalintensität des Massenpeaks der protonierten Form von Inositol-C2-PAF ($MR=716,5g/mol$) und der durchschnittlichen Summe der Signalintensitäten der Massenpeaks endogener Phospholipide (MR jeweils in $g/mol = 725,5; 780,5; 782,5$) berechnet. Der für Inositol-C2-PAF charakteristische Masse-Peak von 716,5 ist in Kontrollzellen nicht vorhanden.

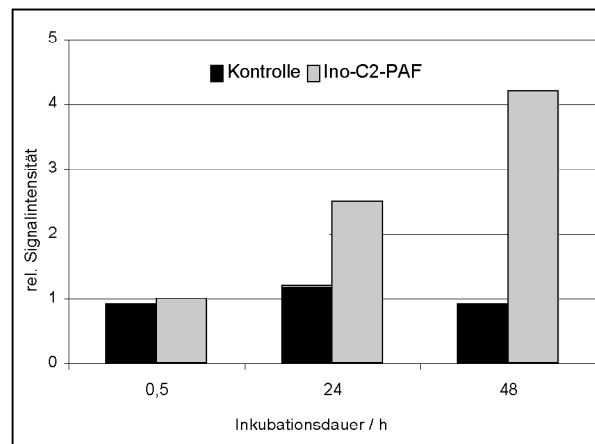


Abbildung 7.2: Aufnahme von Inositol-C2-PAF in HaCaT-Zellen

Um Serumartefakte zu vermeiden, wird nach Beendigung der Inkubation mit $5\mu M$ Inositol-C2-PAF mit PBS gewaschen und für 2h mit serumfreiem Keratinozytenmedium inkubiert. $0,5\mu L$ des in H_2O resuspendierten Pellets werden mit $0,5\mu L$ Matrix auf das MALDI-Target aufgebracht und getrocknet. Die MALDI-TOF-MS erfolgte an einem Bruker Biflex. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Auch bei der Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC kommt es zu einer kontinuierlichen Anreicherung von HePC. Auch im Fall von HePC konnten keine Abbauprodukte detektiert werden (Abb. 7.3).

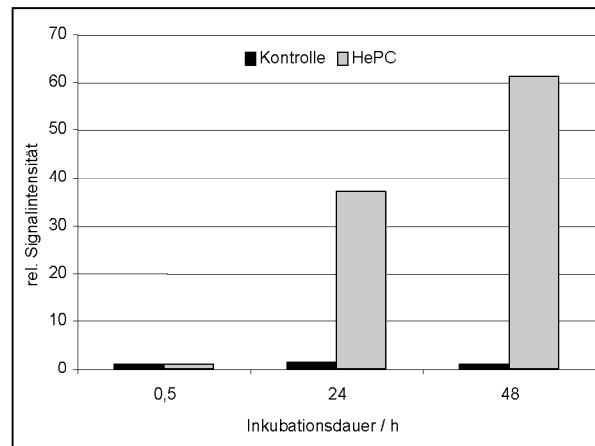


Abbildung 7.3: Aufnahme von HePC in HaCaT-Zellen

Um Serumartefakte zu vermeiden, wird nach Beendigung der Inkubation mit $5\mu M$ Inositol-C2-PAF mit PBS gewaschen und für 2h mit serumfreiem Keratinozytenmedium inkubiert. $0,5\mu L$ des in H_2O resuspendierten Pellets werden mit $0,5\mu L$ Matrix auf das MALDI-Target aufgebracht und getrocknet. Die MALDI-TOF-MS erfolgte an einem Bruker Biflex. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

7.4 Penetrationsstudien an humaner Vollhaut

Die wichtigste Schutzbarriere der Haut ist das *Stratum corneum*, dieses zu überwinden, stellt viele Wirkstoffe und Arzneiformulierungen vor große Herausforderungen. Um eine gezielte Anreicherung der Phospholipide in der Haut zu ermöglichen, wurden Nanoemulsionen hergestellt. Nanoemulsionen sollen bei Gewährleistung der Wirkstoffstabilität die Eindringtiefe der Wirkstoffe in die Haut verbessern.

Die Wirkstoff-beladenen Nanoemulsionen wurden an humaner Vollhaut getestet. Hierfür wird ein Hautstück in eine Franz-Zelle eingespannt. Die Nanoemulsion wird auf die Hornschicht aufgetragen und während des Versuchs nicht abgedeckt. Die Unterseite der Haut wird mit PBS umspült. Nach Beendigung der Versuchszeit wird die verbliebene Emulsion vorsichtig entfernt und horizontale Gefrierschnitte von $10\mu m$ Dicke werden angefertigt.

Mittels MALDI-TOF-MS werden einzelne Schnitte der verschiedenen Hauttiefen analysiert.

Abb. 7.4 zeigt einen Längsschnitt durch humane Bauchhaut. Besonders hervorgehoben sind das *Stratum basale* (grün) und das *Stratum corneum* (weiss).

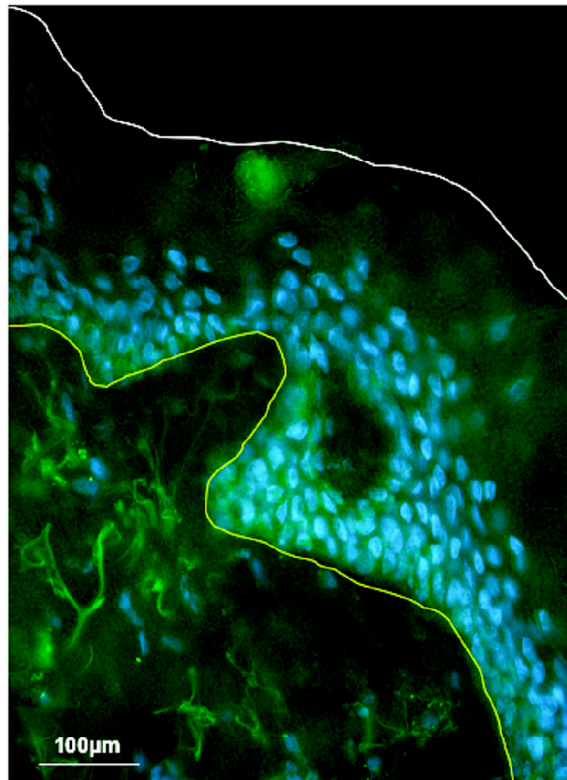


Abbildung 7.4: Längsschnitt durch humane Vollhaut

Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff H0 und die β_1 -Integrinuntereinheit wurde mit dem monoklonalen Antikörper K-20-FITC gefärbt.

Die Inositol-C2-PAF-haltige Nanoemulsion kann bis in eine Hauttiefe von $300\mu\text{m}$ nachgewiesen werden. Die HePC-haltige Nanoemulsion dringt $400\mu\text{m}$ tief in die Haut ein. Somit erreichen beide Analoga-Nanoemulsionen ihren potentiellen Wirkungsort, das *Stratum basale* (Abb. 7.5).

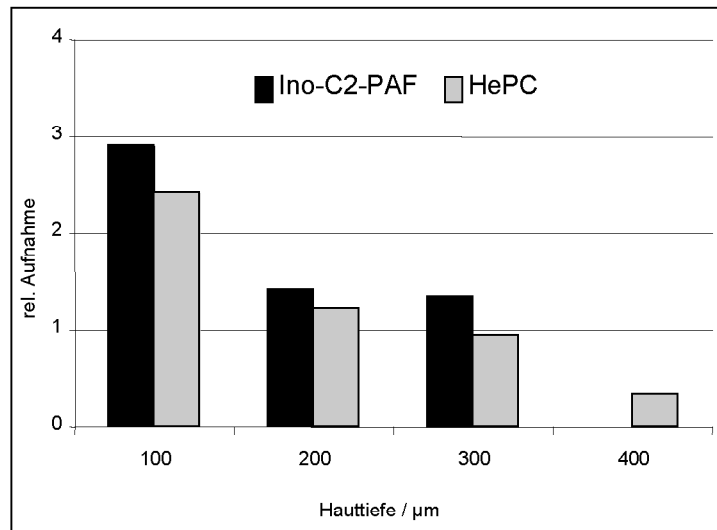


Abbildung 7.5: Penetrationstiefe einer 0,25% Nanoemulsion mit Inositol-C2-PAF oder HePC in humaner Vollhaut

$100\mu\text{L}$ der jeweiligen Nanoemulsion werden auf die Epidermis aufgetragen. Nach Beendigung wird die verbliebene Emulsion vorsichtig mit Watte abgetupft. Es werden horizontale Schnitte von $10\mu\text{m}$ Stärke angefertigt. Die Auswertung der Penetrationstiefe erfolgte mittels MALDI-TOF-MS. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel. Da es sich um Individualproben handelt, ist eine statistische Auswertung nicht möglich.