

Teil III

Diskussion

8 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Substanz aus der Klasse der glykosidierten Phospholipidanaloga, das Inositol-C2-PAF, eingehend in seiner biologischen Wirkung charakterisiert. Als Vergleich diente Hexadecylphosphocholin als bereits therapeutisch eingesetzte Substanz. Dabei wurde vor allem der Einfluss auf die in der Haut vorkommenden Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten und periphere Blutzellen, untersucht. Ob die Einbindung der erwähnten Phospholipidanaloga in Nanoemulsionen zu einer spezifischen Anreicherung der Substanzen in der Haut führt, wurde in einem pharmazeutisch-technologischen Ansatz verfolgt.

8.1 Einfluss auf die Proliferation

Die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Zell-Proliferation zeigt große Zelltyp-spezifische Unterschiede. In HaCaT-Zellen, die als Modell für Keratinozyten dienen, wirkt Inositol-C2-PAF stark anti-proliferativ. Dieser Effekt ist zeit- und konzentrationsabhängig. So konnte ein IC_{50} -Wert von $1,8\mu M$ bei der 48stündigen Inkubation bestimmt werden. In SCC-25-Zellen, die als Modell maligne entarteter, epithelialer Zellen dienen, wurde die Zell-Proliferation noch effektiver gehemmt. Bei der 48stündigen Inkubation wurde ein IC_{50} -Wert von $\geq 0,6\mu M$ festgestellt. Im Gegensatz dazu wirkt Inositol-C2-PAF auf primäre Fibroblasten deutlich schwächer antiproliferativ. Für diese Zellen konnte ein IC_{50} -Wert von $\geq 20\mu M$ ermittelt werden. Ein sehr ähnliches Verhalten zeigt sich auch bei der Inkubation peripherer Blutzellen mit Inositol-C2-PAF. Sowohl stimulierte als auch unstimulierte PBMCs weisen bei Inkubationszeiten von bis zu 72 Stunden einen IC_{50} -Wert auf, der oberhalb von $20\mu M$ liegt.

Werden HaCaT-Zellen mit HePC inkubiert, zeigt sich im Gegensatz zu Inositol-C2-PAF, dass der anti-proliferative Effekt unabhängig von der Inkubationsdauer ist. Hier liegt der IC_{50} -Wert oberhalb von $10\mu M$. In SCC-25-Zellen verschiebt sich der IC_{50} -Wert auf $\geq 1,25\mu M$, ist aber auch hier unabhängig von der Inkubationszeit. Wie auch

Inositol-C2-PAF wirkt HePC deutlich schwächer anti-proliferativ gegenüber Primärfibroblasten, stimulierten und unstimulierten peripheren Blutzellen. In diesen Zelllinien liegt der IC₅₀-Wert oberhalb von 20 μ M.

Die Etherbindungen, als charakteristisches Strukturmerkmal der Antitumoretherlipide, verleihen diesen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine sehr große metabolische Stabilität. Die meisten AELs sind durch die Verknüpfung eines langkettigen Substituenten in der *sn-1*-Position und eines kurzkettigen Substituenten in der *sn-2*-Position des Glycerols gekennzeichnet. In der *sn-3*-Position befindet sich die Phosphocholinkopfgruppe. Am Beispiel von HePC ist gezeigt, dass das Glycerolgrundgerüst keine notwendige Voraussetzung für die Antitumor-Aktivität darstellt (Arthur und Bittman, 1998). Betrachtet man die anti-proliferative Wirkung von Ilmofosine[®] (BM 41.440), einem Thioether-Analogen von PAF, so sieht man auch hier große, zelltypspezifische Unterschiede. So beträgt der IC₅₀-Wert in Lungenkarzinomzellen 10 μ M, in Brustkarzinomzellen aber nur 2 μ M (Bittman et al., 1997). Weitere Modifikationsformen sind Edelfosine[®] (ET-18-OCH₃), das in der *sn-2*-Position des Glycerols lediglich eine Methylgruppe trägt und Glc-PAF, das in der *sn-2*-Position des Glycerols Glukose trägt. Samadder und Mitarbeiter charakterisierten die Wirkung von Edelfosine[®] und ermittelten einen IC₅₀-Wert von 2 μ M in Brustkarzinomzellen (Samadder et al., 1999). In der Arbeit von Mickleit und Mitarbeitern wird gezeigt, dass der IC₅₀-Wert für Glc-PAF bei der Inkubation von HaCaT-Zellen bei 4,8 μ M liegt (Mickleit et al., 1998). In Primärkeratinozyten wurde für Miltefosine[®] ein IC₅₀-Wert von 3 μ M bestimmt (Wieder et al., 1998). Inositol-C2-PAF wirkt somit stärker anti-proliferativ als das strukturell sehr verwandte Glc-PAF.

Die in dieser Arbeit für HePC ermittelte anti-proliferative Wirkung ist schwächer als von Wieder et al. in diesem Zellsystem beschrieben. Das hierfür verwendete Keratinozyten-Wachstumsmedium hat einen Serumäquivalentgehalt von 2%. Phospholipidanaloga sind in der Lage, mit Serumproteinen Lipid:Protein-Komplexe zu bilden, diese Komplexe verschmelzen mit den Plasmamembranen der Zellen, so werden die Lipidanaloga dem zellulären Phospholipidpool zugeführt (Andreesen et al., 1978). Dass Phospholipide durch Serum beeinflusst werden, belegen Arbeiten von Wieder und Mitarbeitern, die zeigen, dass in Gegenwart von 10% Rinderserum der IC₅₀-Werte von HePC auf 27,4 μ M ansteigt (Wieder et al., 1998).

Um unterschiedliche hydrophile und lipophile Anteile in einem Molekül zu charakterisieren, verwendet man den HLB-Wert (Hydrophilic Lipophilic Balance; Hydrophilie-Lipophilie-Gleichgewicht). Da Inositol-C2-PAF deutlich hydrophiler als HePC ist, werden

vermutlich das Verteilungsgleichgewicht und die Beweglichkeit der Substanz in den Zellmembranen entscheidend beeinflusst. Durch Variationen im Serumgehalt und Unterschiede des HLB-Werts der jeweiligen Lipidanaloga ist es also möglich, die Zusammensetzung der Lipid:Protein-Komplexe und damit auch Wirkungseintritt und -dauer der Lipidanaloga zu modulieren.

Inkubiert man HaCaT-Zellen mit geringen Konzentrationen ($\leq 5\mu M$) von Inositol-C2-PAF oder HePC, ist der anti-proliferative Effekt durch die Gabe des epithelialen Wachstumsfaktors (EGF) reversibel. Bei höheren Konzentrationen der Lipidanaloga vermag EGF nicht mehr, deren anti-proliferative Wirkung zu kompensieren. Die Tatsache, dass die Hemmung der Proliferation nicht vollständig durch EGF-Gabe aufzuheben ist, weist darauf hin, dass Phospholipid-Ether mehr als einen Angriffspunkt in den Zellen haben. Somit werden auch andere Signalwege als der EGF-Rezeptor-vermittelte Signalweg durch die Phospholipidanaloga angesprochen.

Die Hemmung der Proliferation durch Antitumorlipide wird in der Literatur als die Blockade der Signaltransduktion mitogener Stimuli diskutiert. So beeinflusst Edelfosine[®] weder die Dauer noch das Ausmass der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors. Trotzdem ist es vorstellbar, dass durch die Akkumulation der Alkyletherlipide in der Plasmamembran deren Mikrodomänenzusammensetzung und -fluidität verändert wird (Arthur und Bittman, 1998). Das könnte sich auch auf die Translokation und Verankerung zytosolischer Proteine zur und in der Plasmamembran erstrecken. Die Inhibition der Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran oder die beschleunigte Dissoziation von der Membran scheinen die initialen Angriffspunkte der Phospholipid-Ether zu sein. Infolge dessen werden die Kinasen Mitogen-Activated/Extracellular Signal-Regulated Kinase (MEK) und Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) nicht phosphoryliert. Die phosphorylierte Form von ERK wird in den Zellkern transloziert und führt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und c-fos (Hill und Treisman, 1995; Hill, 1995). Die Hemmung dieses Signalweges führt folgerichtig zum Erliegen der Proliferation. Die zytosolischen Substrate der ERK umfassen auch strukturgebende Proteine wie Talin. Ein Teil der Effekte einer Inkubation mit Phospholipid-Ethern könnte also auch durch die verminderte Phosphorylierung dieser Proteine erklärt werden (Arthur und Bittman, 1998).

Aber Phospholipid-Ether, wie HePC und HePS, inhibieren auch die Phosphocholin-Synthese auf der Stufe der Phosphocholin-Cytidyltransferase. Da dies ein intranukleäres Protein ist, bedeutet das, dass die Phospholipid-Ether auch in den Zellkern gelangen könnten (Detmar et al., 1994; Brachwitz und Vollgraf, 1995; Attard et al., 2000).

Das natürlich vorkommende PAF hemmt bereits bei einer Konzentration von $0,1\mu M$ rezeptorvermittelt die Proliferation subkonfluenter Keratinozyten um 50%. Diese anti-proliferative Wirkung wird durch den PAF-Rezeptorantagonisten WEB 2086 aufgehoben. Dass Keratinozyten und auch HaCaT-Zellen funktionelle PAF-Rezeptoren exprimieren, belegen die Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppen (Shimada et al., 1998; Alappatt et al., 2000; Southall et al., 2001). Eine optimale Interaktion zwischen dem Phospholipid und dem PAF-Rezeptor findet jedoch nur statt, wenn das Phospholipid verschiedene Voraussetzungen erfüllt. So muss in der *sn-1*-Position des Glycerols eine Alkylkette mit einer Länge von 13-17 C-Atomen über eine Etherbindung verknüpft sein. Die *sn-2*-Position muss eine Acetylgruppe tragen; sobald diese durch Acetylhydrolasen abgespalten wird, ist das entstandene Lyso-PAF nicht mehr in der Lage, mit seinem Rezeptor zu interagieren. Die *sn-3*-Position muss die Phosphocholingroupe tragen (Hanahan, 1986; Honda et al., 2002). Inositol-C2-PAF trägt in der *sn-2*-Position einen deutlich grösseren Liganden als PAF. Aufgrund dieser Tatsachen scheint es unwahrscheinlich, dass Inositol-C2-PAF seine Effekte über den PAF-Rezeptor ausübt. Aber die Möglichkeit einer allosterischen PAF-Rezeptor-Modulation durch Inositol-C2-PAF kann nicht ausgeschlossen werden.

Gegen eine Interaktion von Inositol-C2-PAF oder HePC mit dem PAF-Rezeptor spricht, dass weder Inositol-C2-PAF noch HePC in der Lage sind, die Aggregation von Blutplättchen auszulösen (eigene Vorarbeiten, Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten durch die strukturelle Unterschiedlichkeit der Phospholipidanaloga im Vergleich zu *R*-PAF erklärt werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, ist nur das *R*-PAF Enantiomer, nicht aber *S*-PAF, in der Lage, den PAF-Rezeptor zu aktivieren (Ishii et al., 2000; Honda et al., 2002). Die Inositolgruppe oder auch die verbindende Ethylgruppe an der *sn-2*-Position scheinen eine direkte Interaktion zwischen Inositol-C2-PAF und dem PAF-Rezeptor zu erschweren. Auch HePC erfüllt die strukturellen Voraussetzungen einer direkten Rezeptorinteraktion nicht.

Auch für die Proliferationshemmung durch Antitumorlipide in Leukozyten gibt es sehr große, zell- und substanzspezifische Differenzen. So ist beispielsweise die humane, leukämische Zelllinie U 937 hoch sensibel gegen Miltefosine[®] (IC_{50} -Wert $=8\mu M$), die Zelllinie K 562 weist demgegenüber einen IC_{50} -Wert von $66\mu M$ auf (Fleer et al., 1993). Im Vergleich dazu rufen sowohl Inositol-C2-PAF als auch HePC in unstimulierten wie auch in aktivierten peripheren Blutzellen bei Konzentrationen von $20\mu M$ nur geringe antiproliferative Effekte hervor.

8.2 Substanzinduzierte Zytotoxizität

Um zu überprüfen, ob der durch Inositol-C2-PAF- bzw. HePC-verursachte anti-proliferative Effekt auf HaCaT-Zellen einfach durch nekrotischen Zelltod bewirkt wird, wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika, die das Mikrotubuli-Skelett (Vincristin) oder die DNA (Cisplatin) angreifen, wirken Phospholipid-Ether auch auf ruhende Zellen, weil ihr Hauptwirkort die Zellmembran ist (Arthur und Bittman, 1998; van der Luit et al., 2003). In HaCaT-Zellen ist eine konzentrationsabhängige Zunahme der Inositol-C2-PAF-vermittelten Zytotoxizität zu beobachten. Nach 48 Stunden Inkubation beträgt der LC_{50} -Wert $15\mu M$. Die Proliferation von HaCaT-Zellen wird durch niedermolekulare Konzentrationen von Inositol-C2-PAF gehemmt, die keine zytotoxischen Folgen in diesen Zellen auslösen.

In SCC-25-Zellen ist eine Zytotoxizität schon in sehr viel geringerer Konzentration zu beobachten (LC_{50} -Wert $\leq 0,6\mu M$). Wiederum besteht ein großer Zelltyp-spezifischer Unterschied. Bei primären Fibroblasten sind zytotoxische Effekte erst bei sehr viel höheren Konzentrationen (LC_{50} -Wert $\geq 20\mu M$) zu verzeichnen.

Auch bei der Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC zeigen sich ähnliche Tendenzen. So liegt der LC_{50} -Wert bei $10\mu M$ und beträgt nur noch $0,6\mu M$ bei der Inkubation von SCC-25-Zellen. Auch hier zeigen sich primäre Fibroblasten mit einem LC_{50} -Wert $\geq 20\mu M$ nach 48stündiger Inkubation mit HePC deutlich insensitive.

Für die 24stündige Inkubation von HaCaT-Zellen mit Glc-PAF ist ein LC_{50} -Wert von $9\mu M$ angegeben (Mickeleit et al., 1998). Damit liegt zwischen dem IC_{50} -Wert und dem LC_{50} -Wert nur ein Faktor von 2. Für Inositol-C2-PAF konnte ein Faktor von 5 zwischen dem IC_{50} - und dem LC_{50} -Wert bestimmt werden, so dass Inositol-C2-PAF eine deutlich verbesserte therapeutische Breite als Glc-PAF oder HePC aufweist.

Die Zytotoxizität einer 4stündigen Inkubation von HePC auf konfluenten HaCaT-Zellen wird mit $\geq 25\mu M$ bestimmt (Wieder et al., 1998). Die Differenzen mit der vorliegenden Arbeit können hauptsächlich in den unterschiedlichen Kulturbedingungen, wie andere Zellzahl und andere Kulturmedien, begründet sein.

Die fehlende Kontaktinhibition erhöht die Proliferationsrate der SCC-25-Zellen im Gegensatz zu HaCaT-Zellen. Möglicherweise ist durch die erhöhte Syntheserate und den damit verbundenen gestiegenen Bedarf an Membranlipiden eine grössere Empfindlichkeit gegenüber Eingriffen in das Lipidgleichgewicht der Membranen gegeben. Hinweise darauf ergeben sich unter anderem sowohl aus der erhöhten Zytotoxizität als auch durch die Verschiebung der IC_{50} -Werte nach 48stündiger Inkubation mit Inositol-C2-PAF oder HePC

zu kleineren Konzentrationen.

Schon seit den 80er Jahren sind die vielfältigen Wirkungen von Lysophosphatidsäure und Phospholipid-Etherverbindungen, wie Sphingosin-1-phosphat, bekannt (Moolenaar, 1999). Die Toxizität dieser Substanzen wird durch die Formation von Poren und das reversible Öffnen von „tight junctions“ ausgelöst. Als zugrunde liegenden Mechanismus vermutet man, dass durch die Insertion der AELs in die Plasmamembran die Anordnung der integralen Proteine der „tight junctions“ oder deren Verbindung zu ihren zytoskelettalen Partnern gestört ist (Fleer et al., 1992; Leroy, et al., 2003).

Swiss 3T3-Fibroblasten und MDA MB-231-Mammakarzinomzellen haben einen sehr ähnlichen Phospholipid- und Cholesterolgehalt, trotzdem sind Fibroblasten deutlich insensitive gegen die HePC-vermittelte Toxizität als die Mammakarzinomzellen (Fleer et al., 1993). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Daten dieser Arbeit wider. Erst die Inkubation mit sehr hohen Konzentrationen an Inositol-C2-PAF oder HePC löst in Primärfibroblasten eine substanzinduzierte, zytotoxische Reaktion aus.

Aufgrund der nicht-sättigbaren Aufnahmekinetik verstärkt eine längere Inkubation die Toxizität durch Phospholipidanaloga. Auch dies konnte in den Daten der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Fleer et al., 1992). Somit könnte auch Inositol-C2-PAF, trotz der möglichen sterischen Hinderung durch den Inositol-Ring und der erhöhten Hydrophilie, wie HePC, direkt mit den Zellmembranen interagieren.

8.3 Apoptoseinduktion

Die Inkubation mit den Phospholipidanaloga führt zu Veränderungen im Zellzyklus von HaCaT-Zellen. Innerhalb von 24 Stunden löst Inositol-C2-PAF aber noch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Kontrollzellen aus, sondern erst bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden. Dann führt Inositol-C2-PAF zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl der Zellen der subG1/G0-Phase, von 6% auf 19%. Die subG1/G0-Phase ist durch einen hypodiploiden Chromosomensatz gekennzeichnet und charakteristisch für apoptotische Zellen. Bei der Inkubation mit HePC sieht man schon nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg der Zellzahl der subG1/G0-Population, von 3% auf 15%. Nach 48 Stunden erhöht sich dieser Prozentsatz der Zellen dieser Phase auf 37%.

In SCC-25-Zellen verändert Inositol-C2-PAF schon nach 24stündiger Stimulation den Zellzyklus. So ist der Anteil der Zellen in der G1/G0- und der S-Phase erhöht, und der Anteil der Zellen in der G2-Phase im Vergleich zu Kontrollzellen erniedrigt. Der Anteil der

Zellen in der apoptotischen, subG1/G0-Phase bleibt jedoch konstant. Nach 48 Stunden erhöht Inositol-C2-PAF ausschließlich die Anzahl der Zellen der subG1/G0-Phase, von 3% auf 21%. Die 24stündige Inkubation von SCC-25-Zellen mit HePC löst Effekte aus, die der Stimulation mit Inositol-C2-PAF entsprechen. Verlängert man die Inkubationsdauer unter HePC Stimulation, sieht man keinen Einfluss auf den Zellzyklus von SCC-25-Zellen.

In peripheren Blutzellen haben Inositol-C2-PAF oder HePC keinen Einfluss auf das Verteilungsgleichgewicht zwischen lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen.

In Phytohämagglutinin-stimulierten peripheren Blutzellen führen Inositol-C2-PAF sowie HePC zu einer Zunahme apoptotischer Zellen, Inositol-C2-PAF wirkt hierbei stärker als HePC.

Auch für das strukturell verwandte Phospholipid Glc-PAF ist beschrieben, dass es in HaCaT-Zellen Apoptose auslöst (Mickeleit et al., 1998). Der Effekt ist dabei noch offensichtlicher ausgeprägt als bei der Inkubation mit Inositol-C2-PAF, was aber durch Unterschiede in der Methodik bedingt sein könnte. Denn Mickeleit et al. haben sehr spezifisch DNA-Fragmente, Mono- und Oligonukleosome, detektiert. Während in der hier vorliegenden Arbeit bei Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellzyklus' die subG1/G0-Population als apoptotische Population gewertet wurde.

Das Phospholipid ET-18-OCH₃ reichert sich in Membranmikrodomänen, den sogenannten lipid rafts, an und wird durch Endozytose in epitheliale Zellen aufgenommen. Der Befund, dass Lyso-Phosphocholin nicht endozytotisch aufgenommen wird, belegt die Bedeutung der Etherbindungen für die endozytotische Aufnahme (van der Luit et al., 2003; Gajate et al., 2004; Mollinedo et al., 2004). Auch Inositol-C2-PAF und HePC unterscheiden sich in der Anzahl der Etherbindungen, so dass die differierenden Wirkungen beider Substanzen auch auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen in die Zellen zurückzuführen sein können. Auffällig ist der Unterschied zwischen Inositol-C2-PAF und HePC, denn HePC vermag in HaCaT-, nicht aber in SCC-25-Zellen Apoptose auszulösen. Für die 24stündige Inkubation mit 20 μ M ET-18-OCH₃ ist eine um 50% erhöhte Apoptoserate in A431-Zellen (humane, squamöse Epithelzellen) angegeben (Ruiter et al., 2003). Allerdings wurden die Messungen in Gegenwart von 8% Serum durchgeführt, was die Wirksamkeit der Antitumorlipide nachweislich senkt (Wieder et al., 1998).

Synthetische Alkylphospholipide lösen in myeloiden Zellen den programmierten Zelltod über Aktivierung von CD95 (Fas-Rezeptor, APO-1), Cytochrom c-Freisetzung und die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 aus. Zudem wirken Alkylphospholipide stärker bei

leukämischen Zellen als bei gesunden Blut- und Blutvorläuferzellen (Gajate et al., 2000; Matzke et al., 2001; Budd et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Befunden führt Inositol-C2-PAF zu einer verstärkten Erniedrigung des Anteils lebender Blutzellen, wenn diese bereits mit PHA vorstimuliert wurden. Zudem löst Inositol-C2-PAF grössere apoptotische Veränderungen in SCC-25- als in HaCaT-Zellen aus.

Auch das Alkylphosphocholin *S*-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan führt zu Clusterbildung und zur Ko-Lokalisation von Fas-Rezeptoren innerhalb der Membranmikrodomänen. Aber auch der mitochondrienabhängige Weg zur Induktion von Apoptose wird durch *S*-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan in hämatopoetischen Zellen eingeleitet (Oberle et al., 2005).

HePC induziert Apoptose über die Aktivierung des pro-apoptotischen Stressaktivierte Proteinkinase/c-jun N-terminale Kinase-Weges (SAPK/JNK-Weg) in epithelialen Zellen. Gleichzeitig wird der anti-apoptotische, PI3K-abhängige, Proteinkinase B/Akt-Signalweg (PKB/Akt-Weg) gehemmt (Wang et al., 2001; Ruiter et al., 2003).

Die Inhibition der Phosphocholinbiosynthese scheint nicht der primäre Weg der HePC-induzierten Apoptose zu sein. Durch die Inhibition der Phosphocholinbiosynthese kommt es zur Anreicherung intrazellulären Ceramids, wodurch das Verhältnis von Diacylglycerol:Ceramid zu Gunsten des Ceramids verschoben wird. Dies gilt als Auslöser apoptotischer Prozesse. Van der Sanden und Mitarbeiter weisen jedoch nach, dass Konzentrationen von $10\mu M$ HePC ausreichen, um Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran zur Aussenseite zu translozieren. Wohingegen eine Inhibition der Phosphocholinbiosynthese erst bei $75\mu M$ - $100\mu M$ HePC beobachtet wird (Wieder et al., 1998; van der Sanden et al., 2004). Zusätzlich zu der Beeinflussung der vorher genannten, stressinduzierten Apoptose-Signalwege besteht die Möglichkeit, dass HePC durch Akkumulation in lysosomalen oder mitochondrialen Membranen zu Brüchen in der Membranstruktur führt. Apoptose wäre dann eine direkte Konsequenz (Ghafourifar et al., 1999; Kagedal et al., 2001).

In Kombination mit den Ergebnissen aus den Proliferationsstudien lässt sich schließen, dass die Hemmung der Proliferation durch Inositol-C2-PAF nicht ausschließlich auf der Induktion der Apoptose in einer kleinen Zellpopulation von HaCaT-Zellen beruht.

8.4 Einfluss auf die Differenzierung

Inositol-C2-PAF sowie HePC fördern zeitabhängig die Expression des terminalen Differenzierungsmakers Involucrin in HaCaT-Zellen. Beide Substanzen beeinflussen jedoch nicht

die Expression des Keratinozyten-Differenzierungsmarkers Transglutaminase.

Auch in SCC-25-Zellen wird die Involucrinexpression durch Inositol-C2-PAF und HePC zeitabhängig gesteigert. Wiederum ist in diesen Zellen durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF oder HePC kein Einfluss auf die Expression der Transglutaminase zu beobachten.

In den anschließenden Untersuchungen zur Transglutaminaseaktivität in Primärkeratinozyten konnte eine Erhöhung der Aktivität durch Inositol-C2-PAF festgestellt werden. Die Aktivitätssteigerung ist mit der durch die Inkubation mit Sphingosin-1-phosphat verursachten Aktivitätserhöhung vergleichbar.

Das Ziel der terminalen, epidermalen Differenzierung ist der Aufbau einer Permeabilitätsbarriere, die einerseits den unkontrollierten Wasserverlust und andererseits den Eintritt schädlicher Substanzen verhindern soll. Der Prozess der terminalen Differenzierung der Epidermis beginnt, wenn mitotisch aktive Keratinozyten aufhören zu proliferieren. Die Zellen migrieren vom *Stratum basale* durch das *Stratum spinosum* zum *Stratum granulosum* und bilden letztendlich das *Stratum corneum*. Jeder dieser Schritte ist durch die Expression charakteristischer Markerproteine gekennzeichnet (Fuchs, 1990; Fuchs und Byrne, 1994; Santoro und Gaudino, 2005). Die Expression der zugehörigen Gene wird auf Transkriptionsebene reguliert. Mehrere Studien weisen dem Transkriptionsfaktor „Activator Protein 1“ (AP1) dabei eine wichtige Rolle zu. Verschiedene Arbeitsgruppen haben jedoch gezeigt, dass die Spezifität von AP1 wahrscheinlich auf der Interaktion mit anderen Ko-Transkriptionsfaktoren wie AP2, Sp1, C/EBP, POU Domänen-Faktoren oder STATs beruht und nicht nur auf der Formation verschiedener DNA/AP1-Komplexe (Eckert und Welter, 1996; Rossi und Jang, 1998; Dotto, 1999; Eckert et al., 2004).

Rice und Mitarbeiter wiesen nach, dass die Vorläufer-Proteine des „cornified envelope“ und die quervernetzenden Enzyme schon im Zytoplasma adhärenter Zellkulturen vorliegen und dass eine Reduktion der Proliferation um $\geq 90\%$ zur Einleitung des Differenzierungsprozesses führt (Rice und Green, 1978). Durch die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF wird die Proliferation drastisch reduziert und die Morphologie der Zellen geändert, so dass ein Einfluss auf die Differenzierung angenommen werden kann. Aber auch Veränderungen in der Zusammensetzung der Plasmamembran, die dazu führen könnten, dass die Vorläufer-Proteine des „cornified envelope“ zu der Membran transloziert werden, und damit in die räumliche Nähe von Enzymen wie Transglutaminasen gelangen, sind möglich. Für einen solchen Mechanismus der Translokation der Transglutaminasen sprechen auch Studien, die zeigen, dass Transglutaminasen nicht konstitutiv an der Plas-

mamembran angereichert vorliegen (Buxman und Wuepper, 1975).

Involucrin wird von Zellen des *Stratum spinosum* synthetisiert. Mit der Transkription weiterer terminaler Differenzierungsmarker wie Profilaggrin und Loricin geht die Zunahme der Expression der Keratine K1 und K10 einher. Durch die quervernetzende Aktivität membrangebundener Transglutaminasen, die kovalente Bindungen von Polypeptidseitenketten mit Glutamyl-lysyl-Resten aufbauen, wird eine circa 15nm starke, unlösliche Schicht aufgebaut (Nemes et al., 1999). Diese Schicht enthält die Endprodukte des Differenzierungsprozesses. Dazu zählen kernlose Zellen, die hauptsächlich aus Keratin-Intermediärfilamenten bestehen und in eine Filaggrinmatrix eingebettet sind. Loricin, Involucrin und Keratolinin stellen dabei die Primärsubstrate des Enzyms Transglutaminase dar (Baden et al., 1987). Die Aktivität des Enzyms beschränkt sich fast ausschließlich auf die differenzierten Schichten humaner Haut, ausserdem weisen sowohl Keratinozyten als auch viele andere Zellen eine lösliche Form der Transglutaminase auf. Diese Form des Enzyms unterscheidet sich von der membrangebundenen Form und trägt nicht zur Formation des „cornified envelope“ bei (Rice und Green, 1978; Esmann et al., 1989).

Kashiwagi und Mitarbeiter berichten in ihrer Arbeit, dass in humanen Keratinozyten PKC η ein direkter Aktivator der Src-Kinase Fyn ist. Der aus der Fyn-Aktivierung resultierende Wachstumsstop (G1/G0-Arrest) wird durch Inhibition der Aktivität der Cyclin-abhängigen-Kinase 2 bewirkt. Ausserdem werden durch PKC η -Aktivierung die Kinasen ERK1/2 gehemmt. Diese Veränderungen im Gleichgewicht der MAPK sind mit einer steigenden Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP α und somit einer gesteigerten Expression des Involucringens verbunden (Kashiwagi et al., 2002; Papp et al., 2003). In hierarchisch übergeordneter Position zu den PKCs befinden sich die Phospholipasen. Für Keratinozyten beschreiben Jung und Mitarbeiter, dass die anhaltende Aktivierung der Phospholipase D, über die Generierung von Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat, die Aktivierung der PKC zur Folge hat. Dadurch wird aktiv die späte Differenzierung von Keratinozyten gefördert (Jung et al., 1999). Beide Wege könnten über die für Alkyletherlipide beschriebene Aktivierung der PKC und Phospholipase D eingeleitet werden. Denn HePC führt bei einer Konzentration von 25 μ M schon bei 30minütiger Inkubation sowohl auf einem PKC-unabhängigem als auch auf einem PKC-abhängigem Weg zur Aktivierung der Phospholipase D (Wieder et al., 1996; Lucas et al., 2001).

Weiterhin haben Ceramide einen negativen Einfluss auf die DNA-Synthese und einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Primärkeratinozyten (Wakita et al., 1994; Jung et al., 1999). Durch diesen Befund lässt sich eine Verbindung zur Induktion der

Apoptose durch Etherlipide herstellen (s. Kapitel 7.1.3.). Es besteht also die Möglichkeit, dass durch die Akkumulation von Ceramiden, bei nicht zytotoxischen Konzentrationen an Phospholipiden, Einfluss auf die terminale Differenzierung genommen wird.

McMullan und Mitarbeiter berichten, dass durch die Gabe des ROCK-Inhibitors Y-27632 Keratinozyten in ihrer Fähigkeit zur terminalen Differenzierung gehemmt werden. Das eröffnet die Möglichkeit, dass ROCK eine essentielle Rolle in der Balance zwischen Proliferation und Differentiation einnimmt (McMullan et al., 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Transwell-Migrationsstudien, der Transfektionstudien mit geeigneter cDNA und pharmakologischen Inhibitoren in HaCaT-Zellen zeigen, dass Inositol-C2-PAF in das Gleichgewicht zwischen den kleinen GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA eingreift. Hypothetisch besteht damit auch die Möglichkeit, dass Inositol-C2-PAF auf diesem Weg die Differenzierung epithelialer Zellen fördert.

Möglicherweise wird durch die Alkylphospholipide die Balance zwischen mitogenen Signalen, wie Phosphorylcholin, und strukturellen Signalen, wie Phosphatidylcholin, so beeinflusst, dass die Zellen eher in Richtung Apoptose oder Differenzierung als zur Proliferation getrieben werden.

8.5 Integrinabhängige Matrixadhäsion und Integrinexpression

Inositol-C2-PAF vermag die Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Collagen IV, Fibronectin und Laminin zu steigern. Diese Steigerung verläuft zeit- und konzentrationsabhängig und setzt schon nach zweistündiger Inkubation ein, ist aber nach 48 Stunden immer noch deutlich ausgeprägt. Im Gegensatz dazu führt HePC erst nach 48 Stunden zu einer signifikanten Steigerung auf Fibronectin und Laminin.

Zell-Matrix-Adhäsion wird durch Integrine vermittelt. Integrine sind transmembranäre Glykoproteine vom Typ I, die als nicht-kovalent gebundene Heterodimere vorliegen. Jedes Dimer besitzt eine große extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne und, mit Ausnahme der β_4 -Integrinuntereinheit, eine kurze zytoplasmatische Domäne (Hynes, 2002). Die dynamische Regulation der Adhäsion wird durch das Zusammenspiel von gesteigerter Affinität, hervorgerufen durch Konformationsänderungen und erhöhter Avidität, die durch die erhöhte Anzahl der Integrin-Ligand Bindungen erzielt wird, erreicht. Dazu kommen noch Einflussmöglichkeiten über die Beweglichkeit der Rezeptoren und Liganden, die entweder passiv oder aktiv sein können. Wie Carman und Springer in ihrer Arbeit vorstellen,

gibt es mehrere Arten der Cluster-Bildung: die passive, diffusionsgetriebene, ligandeninduzierte Adhäsionsverstärkung und im Gegensatz dazu die aktive, ligandenunabhängige Adhäsionsverstärkung, bspw. durch Polarisierung der Zelle für die Migration (Carman und Springer, 2003). Durch die Insertion der Phospholipide in die Zellmembran könnte man von abgeschwächten zytoskelettalen Hindernissen und von vergrößerten Diffusionsmöglichkeiten der Integrine ausgehen, was zur Vergrößerung der fokalen Adhäsionen führen könnte. Es besteht aber auch die Möglichkeit der ligandenunabhängigen, aktiven Mikroclusterbildung, wenn Integrine durch die veränderte Membranzusammensetzung vermehrt entweder homotypisch assoziieren oder in „lipid rafts“ assoziiert sind (Humphries 1996; Bazzoni und Hemler, 1998).

Für HaCaT-Zellen ist die Expression der Integrine α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_V , β_1 und β_4 nachgewiesen (Gabriel, Dissertation, FU Berlin 1999). Somit stehen für die Adhäsion auf Kollagen IV ($\alpha_2\beta_1$), auf Fibronectin ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_V\beta_1$) und auf Laminin-1 und -5 ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$) die entsprechenden Rezeptoren zur Verfügung (Ekblom et al., 1998; Gabriel, Dissertation, FU Berlin 1999).

Inositol-C2-PAF erhöht schon nach kurzzeitiger Inkubation die Expression der β_4 -Integrinuntereinheit. Verlängerte Inkubationszeiten führen zu einer weiteren Erhöhung der Expression der β_4 -, aber auch der α_6 -Integrinuntereinheiten. Somit lässt sich die durch Inositol-C2-PAF gesteigerte Adhäsion auf Laminin vermutlich durch die verstärkte Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins erklären. Für die β_1 -Integrinuntereinheit konnte keine gesteigerte Oberflächenexpression nachgewiesen werden, jedoch belegen Immunfluoreszenzanalysen, dass es durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zum vermehrten Clustern von β_1 -Integrinen kommt. Somit könnte die Inositol-C2-PAF-vermittelte Adhäsionssteigerung auf den getesteten Matrixproteinen durch die erhöhte Avidität der β_1 -Integrine erklärt werden.

Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit HePC hat einen transienten Anstieg der α_6 -Integrinuntereinheit nach 24 Stunden zur Folge. Aber auch hier belegen Immunfluoreszenzanalysen, dass es zur Clusterbildung der β_1 -Integrinuntereinheit kommt. Das kann sowohl die durch HePC-gesteigerte Adhäsion auf Fibronectin als auch auf Laminin erklären.

Das Ausmaß der Steigerung der Adhäsion ist grösser als die Steigerung der Expression der Integrinuntereinheiten. Das legt nahe, dass durch Inositol-C2-PAF oder HePC neben der Avidität auch die Affinität der Integrine erhöht wird..

Auch in SCC-25-Zellen löst Inositol-C2-PAF eine Adhäsionssteigerung aus, im Vergleich zu HaCaT-Zellen jedoch zeitverzögert. Während die Adhäsion auf Collagen IV und Fi-

bronektin erhöht ist, bleibt die Adhäsion auf Laminin unbeeinflusst. HePC steigert in SCC-25-Zellen die Adhäsion erst nach 48 Stunden. Hierbei wird ausschliesslich die Bindung an Fibronektin erhöht. Im Vergleich zu HaCaT-Zellen ist der Einfluss der Analoga auf die Adhäsion von SCC-25-Zellen schwächer ausgeprägt, tritt erst nach längeren Inkubationszeiten, aber schon bei geringeren Konzentrationen der Analoga auf.

Wie auch in HaCaT-Zellen wird in SCC-25-Zellen die oberflächenständige Expression der Integrinuntereinheiten durch Inositol-C2-PAF erst nach 24stündiger Stimulation beeinflusst. Hier werden unter anderem die α_6 -, β_1 - und β_4 -Integrinuntereinheit verstärkt exprimiert. Es gibt zwei mögliche Mechanismen, mit deren Hilfe die Adhäsionssteigerung erklärt werden könnte. In Kombination mit den Immunfluoreszenzanalysen, die belegen, dass es auch hier zu einem verstärkten Clustern der β_1 -Integrinuntereinheit kommt, kann man die These aufstellen, dass die Inositol-C2-PAF-vermittelte Steigerung der Adhäsion auf Collagen IV und Fibronektin nach 24 Stunden durch das Clustern der β_1 -Integrinuntereinheit bewirkt wird. Während die Adhäsionssteigerung auf Laminin nach 48stündiger Stimulation auch durch die gesteigerte Expression des $\alpha_6\beta_1$ -Integrins vermittelt wird. Bei der Inkubation von SCC-25-Zellen mit HePC wird innerhalb von 24 Stunden kein Einfluss auf die Expression oberflächenständiger Integrine beobachtet. Immunfluoreszenzstudien belegen jedoch, dass es hier schon zu einem vermehrten Clustern der β_1 -Integrinuntereinheit kommt. Das vermehrte Clustern scheint jedoch keinen Einfluss auf die Adhäsionsstärke zu nehmen. Nach 48stündiger Inkubation kommt es zu einem Anstieg der α_6 - und β_1 -Integrinuntereinheiten, der Einfluss auf die Clusterbildung der β_1 -Integrinuntereinheiten ist jedoch schon wieder abgeschwächt.

HePC ($10\mu M$) vermindert die Matrixadhäsion von HaCaT-Zellen um 50% (Schön et al., 1996). Die hier vorgestellten Ergebnisse, die keinen Einfluss auf die Adhäsion bei 2- oder 24stündiger Inkubation und Erhöhung der Adhäsion bei 48stündiger Inkubation zeigen, stehen im Widerspruch dazu. Zum Teil können die Abweichungen mit den Variationen der experimentellen Durchführung erklärt werden. Wie Schön und Mitarbeiter in ihrer Arbeit zeigen, kommt es durch die Inkubation mit den Phospholipiden in HaCaT-Zellen nicht zur vermehrten Expression der entsprechenden Integrinuntereinheiten α_1 und β_1 .

Möglicherweise wird durch die Zugabe der Phospholipide die Konformation der β_1 -Integrinuntereinheit verändert und so stabilisiert, dass sie mehr der aufgerichteten, aktiven Form entspricht. Dies steht in Einklang mit den Aussagen von Whittard und Akiyama, die zeigen konnten, dass die Aktivierung der β_1 -Integrinuntereinheit zu einer fünf- bis sechsfachen Steigerung der Zelladhäsion führt (Whittard und Akiyama, 2001).

Phosphoinositide der Plasmamembran sind am geordneten Aufbau fokaler Adhäsionen beteiligt (Martel et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme von Inositol-C2-PAF auf adhäsionsabhängige Signalwege könnte darin bestehen, die Synthese oder das Gleichgewicht von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu beeinträchtigen. PIP₂ resultiert aus der Aktivierung von PI 4-Kinase und PIP 5-Kinase und kann mit Integrinen assoziiert sein.

8.6 Einfluss auf die Zell-Migration und die Wundheilung

Nicht nur für die Erneuerung der Haut, sondern auch für die Gewebereparatur und die Immunabwehr ist die Zell-Migration von großer Bedeutung (Mercurio et al., 2001). Die Migration ist ein zyklischer Prozess, an dessen Anfang die Polarisation der Zelle steht. Anschließend werden Membranausstülpungen gebildet, die durch Adhäsion an die extrazelluläre Matrix stabilisiert werden.

Zellmigration, die durch Adhäsionsrezeptoren ausgelöst wird, bezeichnet man als haptotaktische/haptokinetische Migration. Sie unterscheidet sich von der chemotaktischen/chemokinetischen Migration, die durch Chemokine oder Wachstumsfaktoren ausgelöst wird (Wells, 2000). In Übereinstimmung mit der verstärkten Adhäsion durch die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF und HePC, wird die haptotaktische Migrationsfähigkeit der Zellen durch die Analoga vermindert.

Die Gabe von Inositol-C2-PAF vermindert die Anzahl migrierender HaCaT-Zellen in einem Transwell-Assay schon bei zweistündiger Inkubation drastisch. Auch HePC hemmt die Migration von HaCaT-Zellen. In Wundheilungsstudien konnte die Hemmung der Migration durch Inositol-C2-PAF ebenfalls gezeigt werden. Eine Inositol-C2-PAF-behandelte Wunde ist nach 24 Stunden erst zu 38% verschlossen. Die Wundbreite in Kontroll- und HePC behandelten-Zellen beträgt nach dem selben Zeitraum nur noch circa 25%. Durch die Inhibition der Rho-Kinasen mit Y-27632 wird die Wundheilung von Phospholipidanaloga-behandelten Zellen verzögert. So ist nach dreistündiger Migration die Wunde in Kontroll- und HePC-behandelten Zellen nur erst zu circa 60% verschlossen. Inositol-C2-PAF verzögert den Wundverschluss in Y-27632-behandelten Zellen nochmals, so dass die Wunde erst zu circa 20% verschlossen ist. 24 Stunden nach dem Setzen der Wunde ist kein Unterschied zwischen Y-27632-behandelten Kontrollzellen und Y-27632 + Phospholipidanaloga-behandelten Zellen feststellbar.

Die transiente Transfektion von 61L Rac1 in HaCaT-Zellen hebt in Transwell-Assays den

migrationsverzögernden Effekt sowohl von Inositol-C2-PAF als auch von HePC vollständig auf. Die transiente Transfektion von 17N Rac1 führt in Inositol-C2-PAF oder HePC-behandelten HaCaT-Zellen zu keiner weiteren Reduktion der Anzahl migrierender Zellen. Die Inkubation mit Y-27632 hemmt die Anzahl migrierter HaCaT-Zellen um die Hälfte. Dieser Effekt bleibt auch während der Inkubation mit Inositol-C2-PAF oder HePC bestehen. Transiente 61L Rac1- oder 17N Rac1-transfizierte HaCaT-Zellen, die mit Inositol-C2-PAF stimuliert werden, zeigen zudem nochmals eine deutliche Hemmung der Anzahl migrierender Zellen. Bei der Stimulation transient 61L Rac1- oder 17N Rac1-transfizierter HaCaT-Zellen mit HePC wird kein Einfluss auf die Anzahl migrierter Zellen beobachtet. In Wundheilungsstudien führt die transiente Transfektion der Rac-Konstrukte zu anderen Ergebnissen. Die Wundheilung von 61L Rac1-transfizierten Kontrollzellen ist nach 24 Stunden deutlich verzögert, der Wundverschluss beträgt nur circa 50%. Die Gabe von Inositol-C2-PAF verzögert diesen verlangsamten Prozess zusätzlich, so dass nach 24 Stunden die Wunde erst zu etwa 40% geschlossen ist. Die Stimulation 61L Rac1-transfizierter Zellen mit HePC hat keinen Einfluss auf den Verschluss der Wunde. Innerhalb der ersten drei Stunden der Wundheilung führt die transiente Transfektion mit 17N Rac1 in Kontrollzellen zu einer Beschleunigung der Wundheilung. Im weiteren Verlauf übt diese Transfektion jedoch eine migrationsverzögernde Wirkung aus. Dieser späte, hemmende Effekt ist auch bei der Inkubation mit Inositol-C2-PAF oder HePC zu beobachten. Auch die Gabe von Y-27632 zeigt auf Kontrollzellen einen anderen Effekt. Im Gegensatz zu der hemmenden Wirkung in Transwell-Assays ist kein Einfluss auf die Migration in Wundheilungsstudien zu beobachten. Aber in Inositol-C2-PAF- und Y-27632-behandelten Zellen ist die Wundheilung nach drei Stunden deutlich verzögert. Nach 24 Stunden ist jedoch kein Unterschied zwischen Kontroll- oder Phospholipidanaloga-behandelten Zellen sichtbar. Auch bei der transienten Transfektion von 61L Rac1 in Y-27632-behandelten HaCaT-Zellen führt Inositol-C2-PAF zu einer Verzögerung des Wundverschlusses innerhalb der ersten drei Stunden. Aber auf den Endpunkt nach 24 Stunden hat die Inositol-C2-PAF-Gabe keinen Einfluss. Wiederum besteht zwischen Kontroll- und HePC-behandelten Zellen kein Unterschied. In Y-27632-behandelten Zellen führt die transiente Transfektion von 17N Rac1 zu einer beschleunigten Wundheilung von Inositol-C2-PAF- oder HePC-behandelten Zellen.

Immunfluoreszenzstudien zeigen, dass 61L Rac1-positive Zellen einen deutlich kleineren und abgerundeteren Phänotyp als Vektor- oder 17N Rac1-transfizierte Zellen aufweisen. Das ermöglicht diesen Zellen, passiv den Transwell-Filter zu passieren und auf der angebotenen Matrix zu adhären. Dadurch kann es zu falsch-positiven Annahmen aus den

Transwell-Assays kommen. Immunfluoreszenzstudien belegen, dass 61L Rac1-positive Zellen hinter der Migrationsfront nicht-transfizierter Zellen zurückbleiben.

Diese Daten weisen darauf hin, dass sich Rac in HaCaT-Zellen in übergeordneter Position von Rho befindet, während Cdc42 unabhängig von von Rac/Rho reguliert ist. Inositol-C2-PAF übt wahrscheinlich einen aktivierenden Einfluss auf Cdc42 aus, was sich in der Filopodienbildung zeigt. Wird vermehrt dominant negatives Rac1 exprimiert, hat das einen negativen Einfluss auf Rho, was sich in der Ausbildung langgestreckter Zellkörper zeigt. Dieser Phänotyp ist auch durch die Gabe von Y-27632 induzierbar, kann aber durch Inositol-C2-PAF revidiert werden. Allerdings hemmt die Gabe von Y-27632 die, vermutlich über die Steigerung der Cdc42-Aktivität induzierte, Filopodienbildung. Dieses Verhalten kann nicht durch die Gabe von Inositol-C2-PAF aufgehoben werden.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Wundheilung epithelialer Zellen durch die Transfektion mit konstitutiv aktivem RhoA stark verzögert ist. Zum einen ist die Ausrichtung der Zellen am Wundrand innerhalb der ersten vier Stunden verringert, zum anderen bilden sich keine „Führerzellen“. Im Gegensatz dazu führt sowohl die Transfektion von dominant negativem RhoA als auch die Rho-Kinasen-Inhibition durch Y-27632 zur Ausbildung dieser „Führerzellen“, die große Lamellipodien in den Wundbereich erstrecken (Omelchenko et al., 2003). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Y-27632 die Wundheilung beschleunigt.

Proteine, die die Dynamik und Organisation des Aktingerüsts beeinflussen, wie VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein), WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein), Profilin und auch der Arp2/3-Komplex sind in Membranausstülpungen lokalisiert. Um die zur gerichteten Migration notwendige Polarisation aufzubauen und zu erhalten, muss die Expression und Aktivität verschiedenster Moleküle (kleine GTPasen: Cdc42, Rac und Rho; PI3Kinasen, Integrine, Mikrotubuli und vesikuläre Transportsysteme) genau reguliert werden (Okkenhaug und Vanhaesebroeck, 2001; DeMali et al., 2002). Cdc42 ist an der Spitze der migrierenden Zellen aktiv und reguliert dadurch die lokale Formation des Lamellipodiums. Weiterhin wird dadurch das „Microtubuli-organising-centre“ (MTOC) und der Golgi-Apparat vor dem Kern, in Bewegungsrichtung der Zellen, lokalisiert (Cau und Hall, 2005). Auch die Phosphoinositol-Kinasen sind in der migrierenden Zellspitze lokalisiert, wohingegen die Phosphatase PTEN an den Zellrändern und der Rückseite zu finden ist. Auch aktives Rac und der Rac-Effektor PAK (p21-aktivierte Kinase) sind an der Migrationsfront lokalisiert, unterstützt durch die Aktivierung verschiedener RacGEFs, die wiederum von Produkten der PI3-K aktiviert werden (Manser et al., 1994). Aber Rac kann

auch selbst die Rekrutierung und Aktivierung der PI3-K zur Plasmamembran bewirken. Zusätzlich bewirkt Rac, dass das Mikrotubuligerüst stabilisiert wird, was zur Formation neuer Adhäsionen führt. Dadurch werden auch Integrine aktiviert, die ihrerseits einen positiven Rückkopplungseffekt auf Rac ausüben. Um die Polarität aufrechtzuerhalten, wird von einem Antagonismus zwischen Rac und Rho ausgegangen (Tsuji et al., 2002; Caron, 2003; Maddala et al., 2003). Rho und Rho-Effektoren, wie die Rho-Kinasen (p160ROCK), sind am Abbau der Adhäsionskontakte im hinteren Teil der Zelle verantwortlich (Mae-kawa et al., 1999). Die Auflösung dieser Kontakte wird sowohl an der Migrationsspitze, wo gleichzeitig neue Zell-Ausstülpungen gebildet werden, als auch am Zellende beobachtet. Um der Verschiedenheit der Mechanismen des Auf- und Abbaus der Adhäsionen gerecht zu werden, bezeichnet man das Lösen der Kontakte am Zellende als Abbau und das Lösen der Kontakte innerhalb der migrierenden Zellfront als Recycling (turnover). Wenn einige dieser Kontakte nicht aufgelöst werden, reifen sie zu grösseren, stabileren fokalen Adhäsionen. Verschiedene Proteinkinasen und Phosphatasen regulieren diesen Turnover, wie FAK, Src, Yes, Fyn, Erk und Calpain (Webb et al., 2002; Ridley et al., 2003; Webb et al., 2004). Der Auf- und Abbau von Adhäsionskontakten ist für die gerichtete Bewegung von großer Bedeutung, deren Mechanismen aber noch nicht vollständig verstanden sind. Wahrscheinlich steht am Anfang die Bildung von Mikroclustern, die die Lamellipodien unterstützen. Zellen mit großen Integrinclustern (fokalen Adhäsionen) sind eher stationär oder sehr langsam in ihrer Bewegung. Das zeigt sich auch in den Ergebnissen der Migrationsstudien dieser Arbeit. In die Bildung und Reifung dieser Adhäsionskontakte sind Rho und die Myosin-induzierte Kontraktilität involviert (Gutjahr et al., 2005).

Hemidesmosome bilden spezialisierte Verankerungskomplexe zwischen der Basalmembran und den basalen Zellen, die für die mechanische Belastbarkeit der Haut wichtig sind. Das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin ist Bestandteil des Hemidesmosoms und verbindet so die Laminine der Basalmembran mit dem Keratinnetzwerk im Inneren der Zelle (Dowling et al., 1996; Mercurio et al., 2001). Ausserdem aktiviert das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin die kleine GTPase RhoA und führt zu deren Rekrutierung zur Plasmamembran (O'Connor et al., 2000). Die Fähigkeit von HaCaT-Zellen zur haptotaktischen Migration wird durch das Zusammenspiel der beiden Laminin-5-Rezeptoren $\alpha_6\beta_4$ und $\alpha_3\beta_1$ bestimmt. Die Expression von $\alpha_6\beta_4$ -Integrin vermindert die Migrationsfähigkeit von HaCaT-Zellen. Die Autoren dieser Studie führen dies auf die Aktivierung der PI3K zurück. Diese Aktivierung kann nicht direkt über das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin vermittelt werden, sondern über die an das Integrin assoziierte Rezeptortyrosinkinase erbB-2 (Hintermann et al., 2001). Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate

weisen ebenfalls auf eine migrationsinhibierende Funktion des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins hin, das auch als Rezeptor für Laminin-1 dient (Rabinovitz und Mercurio, 1996).

Bei der Inkubation von SCC-25-Zellen mit Inositol-C2-PAF zeigt sich ein migrationsvermindernder Effekt nur bei 24stündiger Inkubation. Gleichzeitig ist die Adhäsion der SCC-25-Zellen durch Inositol-C2-PAF auf Collagen verstärkt. Die Expression der β_1 -Integrinuntereinheit in SCC-25-Zellen wird nicht beeinflusst, so dass dieser Effekt nicht ausschliesslich durch eine Adhäsionsverstärkung über dieses Integrinheterodimer erklärt werden kann. Die Inkubation von SCC-25-Zellen mit HePC zeigt einen schwächeren Einfluss auf das Migrationsverhalten dieser Zellen.

Im Vergleich zu Fibroblasten oder Makrophagen weisen Tumorzellen eine deutlich verminderte Migrationsrate auf (Entschladen et al., 2005). Das konnte auch in den Daten dieser Arbeit gezeigt werden. Diese Tatsache könnte erklären, warum die Phospholipidanaloga die Migration von SCC-25-Zellen weniger beeinflussen als die von HaCaT-Zellen.

8.7 Untersuchungen an humanen Blutzellen

Blutzellen werden von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks gebildet und vereinfacht in Zellen myeloiden Ursprungs, wie Erythro-, Granulo- und Monozyten, sowie Blutplättchen oder lymphoiden Ursprungs, wie B-, T- und NK-Zellen, eingeteilt.

Inositol-C2-PAF zeigt auch in höheren Konzentrationen von $20\mu M$ nur geringe anti-proliferative Wirkung auf periphere Blutzellen. So ist nach zweistündiger Inkubation die Proliferation stimulierter oder unstimulierter Zellen lediglich um 25% gehemmt. Im Gegensatz dazu führt HePC bei geringen Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten zu einer Zunahme der Proliferation. Verlängerung der Inkubationszeiten und höhere Konzentrationen zeigen auch hier wieder anti-proliferative Effekte, die nach 72 Stunden in stimulierten sowie unstimulierten Blutzellen maximal 30% erreichen.

Untersuchungen ergaben, dass sowohl Inositol-C2-PAF als auch HePC erst nach 48stündiger Inkubation die Anzahl lebender Zellen verringern und gleichzeitig die Anzahl früh- und spätapoptotischer Zellen erhöhen. In stimulierten Blutzellen bewirken die Phospholipidanaloga eine Verstärkung des pro-apoptotischen, Phytohämagglutinin-induzierten Effekts. Unter der Annahme, dass der Anstieg der apoptotischen Zellzahl in PHA-stimulierten Blutzellen durch den Anstieg der CD95-Expression charakterisiert wird, zeigt sich, dass bei Ko-Inkubation von Inositol-C2-PAF mit PHA gleichzeitig die intrazellulären Apoptose-Mechanismen verstärkt ablaufen müssen. Denn bei der Ko-Inkubation wird die Prolifera-

tion nicht gehemmt, die Expression von CD95 bleibt unbeeinflusst, aber der Anteil der apoptotischen Zellen erhöht sich. Bei der Ko-Inkubation von HePC mit PHA kann die Proliferationshemmung durch die Verstärkung der CD95-Expression und die Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen erklärt werden.

FACS-Analysen zeigen, dass innerhalb von 24 oder 48 Stunden weder Inositol-C2-PAF noch HePC die Oberflächenexpression der getesteten T-Zell-Marker beeinflussen. Aber nach 48stündiger Inkubation PHA-vorstimulierter T-Zellen führt die Gabe von Inositol-C2-PAF zur Steigerung der CD25-Expression. Die Gabe von HePC zu PHA-vorstimulierten T-Zellen führt darüber hinaus zum Anstieg der Expression von CD69 und CD95.

In Kontrollzellen nimmt die Expression der getesteten Monozyten-Marker nach 48 Stunden zu. Inositol-C2-PAF fördert diesen Verlauf schon innerhalb einer 24stündigen Inkubation. Nach Verlängerung der Inkubation auf 48 Stunden kommt es zu einer drastischen Erniedrigung der Expression von CD163 und HLA-DR. Auch HePC führt schon innerhalb von 24 Stunden zu einem Anstieg der getesteten Marker. Die Inkubation mit Interferon γ führt in Kontrollzellen zur Erhöhung der Expression der Marker CD16, CD86 und HLA-DR, während in Übereinstimmung mit der Literatur die Expression des Markers CD163 auf die Hälfte des Niveaus unbehandelter Zellen reduziert wird (Volk et al., 1985). In Interferon γ -vorstimulierten Monozyten führt die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer Erhöhung der CD86-Expression. Bei der Inkubation Interferon γ -vorstimulierter Monozyten mit HePC kommt es zu einem Anstieg der Expression der getesteten Marker.

Es wird zwischen angeborener und erworbener Immunität unterschieden. Die angeborene Immunität wird durch Epithelbarrieren, Phagozytose durch neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, das Komplementsystem und natürliche Killer-Zellen vermittelt. Die erworbene Immunität wird nach Infektionen ausgebildet und durch B- und T-Zellen vermittelt. T-Zellen können keine Antikörper produzieren und erkennen nur Antigene, die an Zelloberflächen gebunden sind. Die diskriminierende Erkennungsfunktion von T-Zellen wird nicht nur durch das Antigen, sondern auch durch Genprodukte des Wirts beeinflusst. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA; MHC „Major Histocompatibility Complex“) ist der dafür verantwortliche Genbezirk.

Die Expression verschiedener oberflächenständiger Proteine kann für die Charakterisierung des Aktivitätszustandes von T-Zellen herangezogen werden. So dient die Expression von CD69 (Synonym: early T-cell activation antigen p60) als Zeichen der frühen, die Expression von CD25 (Synonym: IL2-R alpha-Kette) als Zeichen der späten Aktivierung von

T-Zellen (Zola, 2000). Die Expression von CD95 (Synonym: Fas-Rezeptor) dient als Zeichen Fas-Rezeptor-vermittelter apoptotischer Prozesse. Regulatorische T-Zellen (CD4- und CD25-positive Zellen) sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegen eigene Antigenstrukturen. Störungen innerhalb dieser T-Zellsubpopulation gehen mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Entzündungsreaktionen einher (Nixon et al., 2005; Raghavan und Holmgren, 2005). CD69 ist ein Mitglied der Natürlichen-Killer-Zell-Rezeptor-Genfamilie und als solches in der Lage, an Signaltransduktionskaskaden teilzunehmen (Sancho und Gomez, 2005). CD69 wird auf aktivierten T- und B-Zellen sowie auf Monozyten, Blutplättchen und epidermalen Langerhans-Zellen konstitutiv exprimiert. Desweiteren ist CD69 an der Pathogenese von Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Marzio et al., 1999).

Monozyten werden aus dem Blutstrom über einen Zytokingradienten, der von aktivierten T-Zellen produziert wird, in entzündetes Gewebe geleitet. Die Interaktion von T-Zellen und Monozyten führt zur Umwandlung von Monozyten in aktivierte Makrophagen, deren Aufgabe das Internalisieren und Prozessieren bakterieller Antigene ist. In Verbindung mit MHC-Proteinen werden diese Antigene dann T-Helfer-Zellen präsentiert. Diese Umwandlung ist durch die Expression verschiedener Markerproteine gekennzeichnet, von denen in dieser Arbeit der Ko-Stimulator CD86 (Synonym: B7-2), CD163 (Protein der „scavenger receptor“-Familie) und HLA-DR (MHC II-Protein) untersucht wurden. Während MHC I-Proteine wichtige Erkennungsstrukturen für zytotoxische T-Zellen darstellen, besitzen T-Helfer-Zellen Rezeptoren für MHC II-Proteine und werden durch diese aktiviert (Carpenter, 1982). Unter pathologischen Bedingungen können sich die quantitativen Verhältnisse im Expressionsmuster der MHC II-Proteine verschieben und somit beispielsweise als Marker für Erkrankungen der Haut herangezogen werden (Volc-Platzer et al., 1984; Diezel et al., 1985; Zheng und Mrowietz, 1997). Inositol-C2-PAF scheint eine ähnliche immunmodulatorische Wirkung zu zeigen wie $\text{INF}\gamma$.

Die exakte Funktion von CD163 ist noch nicht vollständig geklärt, aber bisherige Beobachtungen legen nahe, dass die Expression von CD163 eine wichtige Rolle beim Abklingen der inflammatorischen Immunantwort einnimmt (Ritter et al., 1999). Zu den Liganden von CD163 gehören Lipide, polyanionische Moleküle, Polysaccharide, aber auch Pathogene, wie Gram-positive oder -negative Bakterien. Eine mögliche Verbindung zu den synthetischen Phospholipiden Inositol-C2-PAF und HePC bietet die CD163-vermittelte Endozytose Lipid-konjugierter Proteine. Die vermehrte Endozytose führt zu einer vermehrten Antigen-Präsentation durch Makrophagen und dendritische Zellen (Peiser und Gordon,

2001). Die Erniedrigung der CD163-Expression durch Inositol-C2-PAF der HePC könnte auf eine proinflammatorische Wirkung der Analoga hinweisen. Die Analoga verstärken aber die $\text{INF}\gamma$ -induzierte Immunantwort von Monozyten nicht.

Die Funktion von Ko-Effektoren besteht in der Modulation positiver (durch CD28 vermittelte) oder negativer (durch CTLA-4 vermittelte) Signale. Die positiven Signale führen zu vermehrtem Wachstum, Differenzierung und Zytokinproduktion der T-Zellen, die negativen Signale sorgen für die Abschwächung oder die vollständige Terminierung dieser Signale. CD86 wird von verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert (Carreno und Collins, 2002; Wang und Chen, 2004).

8.8 Aufnahme der Phospholipidanaloga und Penetrationsstudien phospholipid-haltiger Nanoemulsionen

Die „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight“-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) hat sich in den letzten Jahren zu einer weitverbreiteten Methode zur Analyse von Proteinen, Nukleinsäuresequenzen, Strukturen, Reinheitsgraden und post-translationalen Proteinmodifikationen oder Kohlenhydraten entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Methode eine Analyse der synthetischen Phospholipide direkt aus HaCaT-Zellen oder Hautpräparationen erlaubt. Physikochemische und strukturelle Eigenschaften des penetrierenden Moleküls sowie Struktur und Zusammensetzung der Haut bestimmen den Penetrationsprozess. Die Absorption von Fremd- oder Arzneistoffen über die Hornschicht der Haut ist ein passiver Diffusionsvorgang.

Inositol-C2-PAF und HePC werden kontinuierlich in HaCaT-Zellen aufgenommen. Auch Glc-PAF zeigt eine zeitabhängige Akkumulation in HaCaT-Zellen, diese hat jedoch nach 24 Stunden ihr Maximum erreicht. Bei 48stündiger Inkubation sinkt die Menge Glc-PAF, die detektiert werden kann, wieder ab. Das kann darauf zurückzuführen sein, das Glc-PAF durch Hydrolyse in HaCaT-Zellen abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). Das verdeutlicht die erhöhte metabolische Stabilität von Inositol-C2-PAF im Gegensatz zu Glc-PAF.

Prinzipiell lassen sich drei unterschiedliche Diffusionswege beschreiben: 1) interzelluläre Diffusion durch die Lipidmatrix, 2) transzelluläre Diffusion durch die Kerneozyten und 3) Diffusion entlang der Schweißdrüsen und Haarfollikel. Es gibt verschiedene analytische Methoden, um Fremdstoffe in der Haut nachzuweisen, zum Beispiel Hautextraktio-

nen, Fluoreszenz-, photothermale Messungen oder Autoradiographien. Aus den Untersuchungen zur Permeation einer 2%igen Ketoconazol-Arzneiformulierung (2% Ketoconazol $M_R=532g/mol$ entspricht circa $37mM$) geht hervor, dass es zu einer Anreicherung von Ketoconazol innerhalb der ersten $200\mu m$ in der Haut kommt. Schon in $400\mu m$ Hauttiefe ist nur noch die Hälfte des ursprünglich eingesetzten Arzneistoffes detektierbar. Diese Arbeit zeigt, dass MALDI-TOF-MS eine geeignete Methode ist, um die Permeation von Fremd- oder Arzneistoffen durch humane Haut bis in das unterliegende Bindegewebe zu analysieren. Weiterhin erlaubt MALDI-TOF-MS den Nachweis von Ceramidsubfraktionen, die als Markersubstanzen für das atopische Ekzem dienen können (Bleck et al., 1999; Bunch et al., 2004).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass HePC und Inositol-C2-PAF in HaCaT-Zellen sowohl aufgenommen und angereichert als auch detektiert werden können. Die Daten zeigen ausserdem, dass die Substanzen in den getesteten Zeiträumen gegen Angriffe von bspw. Lipasen oder Hydroxylasen stabil sind.

Als Alternative zu Tierversuchen steht die *in vitro*-Testung der kutanen Wirkstoff-Resorption an vitaler, exzidierter Humanhaut. Damit kann die komplexe *in vivo*-Situation hinreichend gut nachgestellt werden. Wie in *in vivo*-Studien streuen jedoch auch hier die interexperimentell erhobenen Daten erheblich. Weil aber die oft verwendete „suction blister“-Methode und Biopsien von Hautgeweben oder anderen Organen invasive Methoden sind, ist ihre klinische Einsatzmöglichkeit limitiert. MALDI-TOF-MS-Untersuchungen an Fibroblasten an Morbus Farber- (Verlust der sauren, lysosomalen Ceramidase und anschließender Akkumulation von Ceramid) oder Morbus Gaucher- (Verlust der Glucocerebrosidase, gefolgt von der Akkumulation von Glucosylceramid) erkrankten Patienten, belegen den Anstieg der jeweiligen Sphingolipide in diesen Fibroblasten (Fujiwaki et al., 2002).

Um das Penetrationsverhalten von ALP-haltigen Nanoemulsionen zu untersuchen, bedient man sich Diffusionszellen nach Franz (Franz, 1975) bzw. Modifikationen davon. Dermales Restgewebe an den Biopsien ist aufgrund seines hydrophilen Charakters für die Penetration hydrophiler Arzneistoffe kein Störfaktor, jedoch kann die Penetration lipophiler Arzneistoffe dadurch verzögert sein. Die auf das *Stratum corneum* aufgetragenen Formulierungen diffundieren dem 1. Fick'schen Gesetz zu Folge durch die Schichten der Haut.

Die Untersuchungen an $10\mu m$ -starken Gefrierschnitten humaner Vollhaut zeigen, dass beide Substanzen bis in eine Tiefe von $300\mu m$ intakt und nachweisbar sind. HePC findet sich sogar noch in $400\mu m$ Tiefe. Semi-quantitativ lässt sich aus den Daten schlussfolgern, dass

es zu einer Anreicherung innerhalb der ersten $100\mu\text{m}$ der Haut kommt und die Wirkstoffkonzentration danach schnell geringer wird. Beide Analoga erreichen intakt den präferierten Wirkort, das *Stratum basale*. Eine gezielte Anreicherung der Phospholipide, durch die Einbindung in Nanoemulsionen, in der Haut scheint nicht möglich. Für weitere Untersuchungen war geplant, die Phospholipidanaloga in ein Hydrogel und eine ölige Lösung einzuarbeiten. Aufgrund der bestehenden Syntheseprobleme konnten diese Versuche nicht verwirklicht werden. Um eine abschließende Aussage zu treffen, müssen weitere Versuche mit verschiedenen Arzneistoffträgersystemen erfolgen.

Die Lipidzusammensetzung schwankt innerhalb der unterschiedlichen Hautschichten je nach Differenzierungsgrad (Ponec et al., 1988 (B); Ponec et al., 1989; Weerheim und Ponec, 2001). Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde die relative Aufnahme der Phospholipidanaloga bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der Signalintensität des protonierten Analogons zu den Signalintensitäten eines endogenen Lipidgemischs gebildet. Dadurch lassen sich auch intra- und interindividuelle Schwankungen besser berücksichtigen. Nachteilig an diesem Versuchsaufbau ist, dass quantitative Aussagen zur Aufnahmekinetik nicht möglich sind. Wegen der beabsichtigten lokalen Wirkung ist eine optimale Wirkstoff-Anreicherung in der Epidermis erwünscht und ein Abfluss in das Blutgefäßssystem unerwünscht.

HaCaT-Zellen weisen eine eingeschränkte Lipidbiosynthese-Kapazität auf. Durch das Fehlen freier Fettsäuren und durch den zu geringen und unvollständigen Ceramidgehalt ist die Fähigkeit zur regulären terminalen Differenzierung eingeschränkt (Boelsma et al., 1999). Deswegen wurde zur Testung der Penetrations- und Permeationsfähigkeit der lipidhaltigen Nanoemulsionen humane Vollhaut verwendet.

8.9 Einsatz der Nanoemulsionen

Nanoemulsionen sind als Arzneiform attraktiv weil, i) aufgrund der kleinen Partikelgröße die Einwirkung der Schwerkraft gemindert wird und durch die Brown'sche Molekularbewegung überwunden werden kann, so dass die Formulierung nicht während der Lagerung sedimentiert, ii) die kleine Tröpfchengröße bedingt, dass diese schwer deformierbar sind und dadurch das Risiko der Koaleszenz sinkt, iii) aufgrund der Größe der Oberfläche der Formulierung Nanoemulsionen geeignet sind, Arzneistoffe schnell durch die Haut penetrieren zu lassen, iv) im Gegensatz zu herkömmlichen Emulsionen Nanoemulsionen mit erheblich geringerer Menge an Tensiden herstellbar sind ($\geq 20\%$ Tensid im Vergleich zu

den hier eingesetzten 2,5% Tensid) und v) die kleine Tröpfchengrösse eine gleichmässige Verteilung der Formulierung auf der Haut erlaubt (Wu et al., 2001). Die Wirkstoffkonzentrationen wurden mit 0,25%; 0,125% HePC bzw. Inositol-C2-PAF in Anlehnung an kürzlich publizierte Arbeiten ausgewählt (Korting et al., 2002).

Die Inositol-C2-PAF-haltige Nanoemulsion ist durch eine kleinere Tröpfchengrösse als die HePC-haltige Nanoemulsion gekennzeichnet. Im Laufe der Lagerung nimmt dieser Unterschied noch zu. Beide Emulsionen weisen eine große Homogenität auf.

Die Abnahme des Polydispersitätsindex kann mit dem Phänomen der Ostwald'schen Reifung erklärt werden. Emulsionen zeigen die Tendenz zur Instabilität, verantwortlich dafür ist die hohe Grenzflächenenergie des Systems. 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 und dient der Minimierung der Oberflächenenergie des Systems. Selbst wenn Emulsionen durch Tenside gegen Flokkulation und Koaleszenz geschützt werden, kann die Emulsion durch die Ostwald'sche Reifung irreversibel zerstört werden. Die Ostwald'sche Reifung ist ein molekularer Diffusionsprozess, bei dem die Grösse der großen Tropfen auf Kosten der kleinen Tropfen zunimmt. Die theoretische Beschreibung dieses Prozesses durch Lifshitz, Slezov und Wagner (LSW-Theorie) sagt aus, dass im Gleichgewicht die Reifungsrate ω wie folgt bestimmt werden kann: $\omega = d(aN)^3/d(t)$ (aN = mittlerer Teilchendurchmesser; t = Zeit). Daraus folgt, dass der mittlere Partikeldurchmesser mit der dritten Potenz im Laufe der Zeit zunimmt (Sadtler et al., 2002).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Nanoemulsionen herzustellen. Genannt seien die Hochdruckhomogenisation, Niedrig-Energie-Methoden, das ist die langsame Zugabe von Wasser zu einer Lösung des Tensids in Öl, und die Emulgierung unter Ausnutzung der Phasen-Inversions-Temperatur. Emulsionen die durch Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden, weisen die langsamste Rate der Ostwald'schen Reifung auf. Diese Emulsionen sind am stabilsten, so dass dieser Methode der Herstellung von Nanoemulsionen der Vorzug zu geben ist (Tadros et al., 2004). Um eine enge Partikelgrößenverteilung und eine gleichmässige Durchmischung zu erreichen, wurde vorher mit dem Ultra-Turrax eine Präemulsion hergestellt. Nachteilig sind der hohe Energieeintrag während der Herstellung und die Ostwald'sche Reifung der Partikel als grösstes Stabilitätsproblem von Nanoemulsionen. Tensidhaltige Nanoemulsionen erhöhen den transepidermalen Wasserverlust und führen gleichzeitig zu Schäden in der Hornhautstruktur und -zusammensetzung. Der Einsatz von Nanoemulsionen auf vorgeschädigter Haut muss sorgfältig überprüft werden

(Gloor, 2004).

Wegen des hohen Überschusses an Wasser ist davon auszugehen, dass sich eine Emulsion vom Typ Öl-in-Wasser bildet. Die Wirkstoffe, Inositol-C2-PAF oder HePC, können sich zusammen mit dem Emulgator an der Grenzfläche ausrichten. Aber es sind auch weitere kolloidale Übergangs-Strukturen in Emulsionen beschrieben worden (Lam und Schlechter, 1987).

Ausserdem wurde eine Placebo-Emulsion hergestellt. Die Emulsionen wurden anschliessend im Kühlschrank gelagert. Die Lipidphase der Emulsionen wird von Miglyol 812 gebildet. Miglyol 812 ist ein Triglycerid-Gemisch aus gesättigten Fettsäuren, dessen Kettenlänge zwischen C8 und C12 variiert und das bei Kühlschrank- und Raumtemperatur flüssig ist. Es wird als Vehikel für Suspensionen, Lösungen und Weichgelatine kapseln bei Peroralia eingesetzt. Poloxamer 188 ist ein nichtionisches Tensid mit einem HLB-Wert von circa 29. Es gehört zur Gruppe der Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere, die unter anderem als Solubilisatoren, Emulgatoren, Netzmittel oder Verdickungsmittel eingesetzt werden. Wegen der geringen Schaumbildung und weil es nicht hämolytisch wirkt, findet es in der pharmazeutischen Technologie als Emulgator breiten Einsatz. Ausserdem können polymerische Mizellen eine verlängerte Zirkulation im Blut bewirken, sie können der Immunabwehr entgehen und eventuell so modifiziert werden, dass sie den Arzneistoff kontrolliert freisetzen (Kwon, 2003).

Die Emulsionen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und nach 7 bzw. 28 Tagen wurde der Polydispersitätsindex mittels Photonen-Korrelationsspektroskopie bestimmt. Vor den Messungen wurden die Emulsionen auf Raumtemperatur erwärmt. Der Polydispersitätsindex gibt an, wie eng die Partikelgrössenverteilung eines Systems ist. Die Werte des Polydispersitätsindex liegen stets zwischen 0 und 1, je homogener die Partikelgrössen sind, desto kleiner ist der Polydispersitätsindex. Polydispersitätsindex-Werte bis 0,06 weisen auf eine monodisperse Verteilung hin, eine enge Verteilung liegt vor, wenn die Werte zwischen 0,1 und 0,2 liegen.

Für Methotrexat, das in der systemischen Psoriasis-Therapie eingesetzt wird, wurde nachgewiesen, dass aus Emulsionen mit einem Partikeldurchmesser $\leq 150nm$ die Menge freigesetzten Wirkstoffs im Gegensatz zu einer wässrigen Lösung verzehnfacht wird. Auch im Vergleich mit einer öligen Suspension erzielt man durch den Einsatz von Emulsionen dreifach höhere, transdermale Wirkstoffkonzentrationen (Kreilgaard, 2002). Der Wirkstoff Diclofenac-diethylamin wurde in diverse, topisch applizierbare Arzneiformulierungen eingearbeitet. Mikroemulsionen erhöhen den transdermalen Wirkstofftransport signifikant, im

Vergleich zu liposomalen Zubereitungen, wässrigen Lösungen oder Flüssigkristallen (Kriwet und Müller-Goymann, 1995). Eine weitere Studie vergleicht die transdermale Aufnahme von Methylnikotinat aus einer Mikroemulsion, einer liposomalen Zubereitung und einem hydrophilen Gel. Die Mikroemulsion wies die schnellste initiale Penetrationsrate auf, einhergehend damit war auch nach dem Entfernen der Arzneiformulierungen das Abklingen des Effekts der Mikroemulsion am schnellsten (Bonina et al., 1995).

Da Nanoemulsionen eine sehr geringe Oberflächenspannung aufweisen, ist ein sehr intensiver Kontakt zwischen der Haut und der Arzneistoff-Formulierung gegeben. Dadurch wird der Übergang von hydro- oder lipophilen Arzneistoffen aus dem normalerweise relativ hydrophilen Arzneistoff-Träger in das sehr lipophile *Stratum corneum* begünstigt. Durch die sehr gute Löslichkeit von sowohl lipo- als auch hydrophilen Arzneistoffen in Nanoemulsionen kann ein sehr hoher Konzentrationsunterschied zwischen der Arzneistoff-Formulierung und der Haut aufgebaut werden. Das ermöglicht eine bessere transdermale Diffusion in die Haut. Aufgrund der dynamischen Übergangszustände in Emulsionen ist es möglich, dass Tensid-Monomere durch die Haut diffundieren können. Deswegen muss das Haut-irritierende Potenzial der Tensid-Monomere als Quelle möglicher Nebenwirkungen berücksichtigt werden.