

Teil IV

Zusammenfassung / Summary

9 Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit beschreibt Untersuchungen des neuartigen, glykosidierten Phospholipidanalogs Inositol-C2-PAF an humanen Haut- und Blutzellen. Der plättchenaktivierende Faktor, PAF, ist ein potenter Mediator allergischer und inflammatorischer Reaktionen. Klinische Studien weisen auf die Einsatzmöglichkeit modifizierter PAF-Analoga bei der Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen und Protozoen-Infektionen hin.

Im Rahmen des Dissertationsvorhabens konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF bei nicht zytotoxischen Konzentrationen selektiv die Proliferation von HaCaT- und SCC-25-Zellen inhibiert. Die Proliferations-inhibierende Wirkung ist zeit- und konzentrationsabhängig und liegt im unteren mikromolaren Bereich. Im Gegensatz dazu hemmt Inositol-C2-PAF die Proliferation von Fibroblasten und peripheren Blutzellen nicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die anti-proliferative Wirkung auf die Keratinozyten und die Karzinomzellen nicht ausschließlich auf der Induktion der Apoptose beruht, sondern, dass Inositol-C2-PAF die Differenzierung epithelialer Zellen fördert. So ist die Expression und die Aktivität terminaler Differenzierungsmarker erhöht.

Inositol-C2-PAF fördert weiterhin die Zell-Matrix-Adhäsion durch Induktion von β_1 -Integrin-Clustern und die gesteigerte Oberflächenexpression des Integrins $\alpha_6\beta_4$. Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, die sich in verstärkten kortikalen F-Aktin-Spannungsfasern zeigt.

Sowohl die Migration von Keratinozyten im Transwell-Assay als auch die Migration während der Wundheilung werden durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF vermindert. Durch den Einsatz geeigneter cDNA-Konstrukte und pharmakologischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition wahrscheinlich auf der Aktivierung von Cdc42 und der Störung des Zusammenspiels der kleinen GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA beruht.

Die Expression von Oberflächenmarkern und die Ausschüttung von Zytokinen werden weder in stimulierten noch in nicht-stimulierten T-Zellen durch Inositol-C2-PAF beeinflusst, während es in Monozyten pro-inflammatorische Veränderungen bewirkt.

Weiterhin wurden Inositol-C2-PAF-haltige Nanoemulsionen hergestellt. Diese Nanoemulsionen sind durch eine Partikelgrösse von circa $100nm$ und eine homogene Größenverteilung gekennzeichnet. In Penetrationsstudien an humaner Vollhaut wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF metabolisch stabil ist und bis zu einer Hauttiefe von $300\mu m$ in die Haut penetriert.

10 Summary

Investigations concerning the new, glycosidated phospholipid analog Inositol-C2-PAF were conducted in this study. For this approach cells of human skin and blood were used. The platelet-activating factor, PAF, is a potent mediator of allergic and inflammatory reactions. Clinical studies point to application possibilities of modified PAF-analogs as means of treating hyperproliferative skin diseases and infections caused by protozoans.

Within the scope of this doctoral thesis it was shown, that Inositol-C2-PAF leads to a selective inhibition of cell proliferation of HaCaT- and SCC-25-cells at non-toxic concentrations. The anti-proliferative effect follows a time and concentration dependency and lies within the lower micromolar range. In contrast Inositol-C2-PAF does not inhibit the proliferation of human fibroblasts and peripheral blood cells. For keratinocytes and carcinoma cells it could be shown that the anti-proliferative effect was not solely due to the induction of apoptosis but that Inositol-C2-PAF positively effected epithelial cell differentiation. This positive effect could be demonstrated by the up-regulation of the expression and activity of markers of the terminal differentiation.

Furthermore, Inositol-C2-PAF strengthens cell-matrix adhesion via the induction of β_1 -integrin clusters and the up-regulation of the expression of the $\alpha_6\beta_4$ -integrin. This leads to a reorganisation of the cytoskeleton that is characterised by more cortical F-actin fibres.

Incubation with Inositol-C2-PAF leads to a reduced migration of keratinocytes in both transwell-assays and during wound-healing studies. Using appropriate cDNA constructs and pharmacological inhibitors it could be shown that this inhibition was most likely due to the activation of the small GTPase cdc42 and the disturbance of the crosstalk between the small GTPases cdc42, rac1 and rhoA.

Inositol-C2-PAF does neither influence the surface expression of stimulated or unstimulated T-cell markers nor the cytokine secretion, although it leads to pro-inflammatory changes within monocytes.

Beyond, nanoemulsions containing Inositol-C2-PAF were prepared. These nanoemulsions are characterised by a homogenous distribution of particles, with a mean diameter of about $100nm$. Penetration studies using human whole-skin showed that Inositol-C2-PAF was metabolically stable and penetrated into $300\mu m$ depth of the skin.