

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Einfluss des Etherlipids Inositol-C2-PAF auf
die Viabilität und Differenzierung primärer humaner Hautzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Adrian Schulz
aus Reinbek

Datum der Promotion: 03.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Abstract	6
1 Einleitung	8
1.1 Die Haut als Grenzorgan des Menschen zur Umwelt	8
1.1.1 Zellulärer Aufbau der Epidermis	8
1.1.2 Molekulare Marker von Hautzellen	9
1.1.3 Die Haut als immunologische Barriere	9
1.2 Die Psoriasis als chronisch inflammatorische Erkrankung der Haut	10
1.2.1 Klinik	10
1.2.2 Histopathologie	11
1.2.3 Molekularpathogenese	12
1.2.4 Therapie	14
1.3 Inositol-C2-PAF als mögliche Therapieoption bei Psoriasis	14
1.3.1 Stoffklasse	14
1.3.2 Wirkung und Anwendung ausgewählter Anti-Tumor-Phospholipide	16
1.3.3 Effekte von Inositol-C2-PAF <i>in vitro</i>	16
1.3.4 Wirkung von Inositol-C2-PAF in zwei komplementären Psoriasis-Maus-Modellen	19
1.4 Zwei- und dreidimensionale <i>in vitro</i> -Modelle	20
1.5 Arzneimittelentwicklung	23
1.5.1 Phasen der Arzneimittelentwicklung	23
1.5.2 Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen	24
1.6 Fragestellung	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.2 Chemikalien, Lösungen, Medien und Antikörper	31
2.3 Kultivierung primärer Zellen	33
2.4 Präparation primärer Zellen	35
2.5 Kultivierung der InSphero-3D-Kokultur-Modelle	35
2.6 Methoden zur Bestimmung der Viabilität und Proteinmasse	36
2.6.1 MTT-Assay	36
2.6.2 SRB-Assay	36
2.7 Histologie und Immunhistochemie	37
2.7.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünnschnitten	37
2.7.2 Histologische Methoden	38
2.8 Programme, Auswertung und Statistik	40

3 Ergebnisse	42
3.1 Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität in der 2D-Monokultur . . .	42
3.1.1 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf die metabolische Akti- vität von primären Keratinozyten	42
3.1.2 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf die metabolische Akti- vität von dermalen Fibroblasten	47
3.1.3 Einfluss auf die metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp	52
3.2 Effekt von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt in der 2D-Monokultur	53
3.2.1 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf den Proteingehalt von primären Keratinozyten	53
3.2.2 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf den Proteingehalt von primären dermalen Fibroblasten	58
3.2.3 Einfluss auf den Proteingehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp	63
3.3 InSphero 3D-Kokultur primärer Fibroblasten und primärer Keratinozyten	65
3.3.1 Charakterisierung der 3D-Kokultur	65
3.3.2 Einfluss von TNF α und Inositol-C2-PAF auf die Keratinozyten-Differenzierung	68
4 Diskussion	70
4.1 Effekte von Inositol-C2-PAF in der 2D-Monokultur primärer Hautzellen	70
4.1.1 Inositol-C2-PAF hemmt die metabolische Aktivität und reduziert die Biomasse primärer Zellen	70
4.1.2 Gegenüberstellung des MTT- und des SRB-Assays in der 2D-Monokultur . . .	72
4.1.3 Beeinflussung des mTOR-Signalings als möglicher Mechanismus der Inositol- C2-PAF-Wirkung	73
4.1.4 Induktion der metabolischen Aktivität primärer Fibroblasten mit niedrigen Inositol- C2-PAF-Konzentrationen	75
4.1.5 Einflussfaktoren auf primäre Hautzellen	76
4.2 Die 3D-Kokultur der Firma InSphero als Hautmodell	77
4.2.1 Die 3D-Kokultur weist eine regelrechte Differenzierung der Keratinozyten auf	77
4.2.2 Effekte von Inositol-C2-PAF auf die Keratinozytendifferenzierung in der nor- malen und entzündlich veränderten 3D-Kokultur	78
4.3 Zusammenfassung unter Berücksichtigung der Ausgangsfragestellungen	79
4.4 Ausblick	80
Literaturverzeichnis	82
Eidesstattliche Versicherung	89
Lebenslauf	90
Danksagung	92

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des Schichtaufbaus der Epidermis	8
2	Hautläsion der Psoriasis <i>vulgaris</i>	10
3	Histologische Befunde der Psoriasis	11
4	Pathogenese der Psoriasis unter Hervorhebung der IL-23/IL-17-Achse	12
5	Strukturformeln von PAF und davon abgeleiteter synthetischer Derivate	15
6	Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF	17
7	Charakterisierung des 3D-EpiKutis-Modells aus primären Keratinozyten	21
8	Hanging-Drop-Technik zur Herstellung von sphärischen Zellkulturen	22
9	Phasen der Arzneimittelentwicklung	23
10	Einfluss der Variablen α , EC_{50} und E_{max} auf die Kurve der Hillfunktion	25
11	Dosis-Wirkungs-Beziehung und therapeutischer Index	26
12	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Keratinozyten nach 24h	44
13	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Keratinozyten nach 48h	45
14	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Keratinozyten nach 72h	46
15	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Fibroblasten nach 24h	49
16	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Fibroblasten nach 48h	50
17	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von Fibroblasten nach 72h	51
18	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität primärer Zellen in Abhängig- keit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp	52
19	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Keratinozyten nach 24h	55
20	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Keratinozyten nach 48h	56
21	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Keratinozyten nach 72h	57
22	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Fibroblasten nach 24h	60
23	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Fibroblasten nach 48h	61
24	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt von Fibroblasten nach 72h	62
25	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt primärer Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp	63
26	HE-Färbung der 3D-Kokultur	66
27	Immunfluoreszenzanalyse der 3D-Kokultur	67
28	Expression verschiedener Marker in der 3D-Kokultur	69
29	Vergleich von MTT- und SRB-Assay	72
30	Hillfunktionen aus dem MTT- und SRB-Assay der Fibroblastenspender PF 7 und PF 8	73
31	Gegenüberstellung der klassischen und modifizierten Hillfunktion nach Di Veroli et al.	75

Tabellenverzeichnis

1	Geräte	29
2	Verbrauchsmaterial	30
3	Chemikalien	31
4	Lösungen	32
5	Medien	33
6	Primärantikörper	33
7	Sekundärantikörper	33
8	Paraffineinbettung	37
9	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38
10	Protokoll zur Entparaffinierung und Immunfluoreszenz	39
11	Protokolle der Immunfluoreszenzfärbungen	39
12	Programme	40
13	Immunfluoreszenzaufnahme der PanCK-S100A4-Doppelfärbung	41
14	Immunfluoreszenzaufnahme der Keratin1-Filaggrin-Doppelfärbung	41
15	IC ₅₀ von Inositol-C2-PAF im MTT- und SRB-Assay mit primären Hautzellen	71
16	IC ₅₀ und LC ₅₀ von Inositol-C2-PAF bei verschiedenen Zelltypen	74

Abkürzungsverzeichnis

AgNPs	Silber-Nanopartikel	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
ALI	Air-Liquid-Interface	PBS	Phosphate-buffered saline
AMPs	Antimikrobielle Peptide	pDC	plasmazytische dendritische Zelle
APL	Alkyl-Phospholipide	PFA	Paraformaldehyd
ATL	Antitumor-Phospholipide	PKB	Proteinkinase B
APC	Alkyl-Phosphocholine	P/S	Penicillin/ Streptomycin
BSA	bovines Serumalbumin	rpm	Umdrehungen pro Minute
CIITA	Class-II-Major-Histocompatibility-Complex-Transaktivator	SRB	Sulforhodamin B
cDC	konventionelle dendritische Zelle	TCA	Trichloressigsäure
DISC	Death-Inducing-Signaling-Complex	TLR	Toll-Like-Receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	TNF α	Tumornekrosefaktor- α
DMSO	Dimethylsulfoxid	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration	VCAM	Vascular-Cell-Adhesion-Molecul
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	2D	zweidimensional
FADD	Fas-Associated-Death-Domain-Protein	3D	dreidimensional
FCS	fetales Kälberserum		
FSP-1	Fibroblast-Specific-Protein-1 (Syn: S100A4)		
g	Erdbeschleunigung		
H33342	Bisbenzimid Trihydrochlorid		
HE	Hämatoxylin-Eosin		
IC ₅₀	halbmaximal inhibitorische Konzentration		
ICAM	Intercellular-Adhesion-Molecul		
iDC	inflammatorische dendritische Zelle		
IFN	Interferon		
K	Keratin		
LC ₅₀	halbmaximal letale Konzentration		
MHC	Major-Histocompatibility-Complex		
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid		
nm	Nanometer		

Abstract

Die Psoriasis stellt als chronisch entzündliche Hauterkrankung Betroffene und Behandler*innen vor besondere Herausforderungen. Psoriatische Keratinozyten sind hyperproliferativ und weisen ein Differenzierungsdefizit auf. Neben systemischen bestehen auch topische Therapieoptionen. Das glykosidierte Phospholipid Inositol-C2-PAF könnte sich für die topische Behandlung der Erkrankung eignen. In auf der immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT basierenden *in vitro*-Modellen konnten antiproliferative und differenzierungsfördernde Effekte des Wirkstoffes nachgewiesen werden. Bei murinen *in vivo*-Versuchen wurde die psoriatische Krankheitsaktivität signifikant reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Erkenntnisse auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten erweitert werden. Dafür wurden aus Präputien isolierte Zellen in 2D-Monokulturen mit aufsteigenden Konzentrationen des Wirkstoffes behandelt. Der Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen wurde mit dem MTT-Assay und der Effekt auf die Proteinmasse mit dem SRB-Assay gemessen.

Außerdem wurde eine von der Firma InSphero bereitgestellte, aus humanen primären Keratinozyten und Fibroblasten bestehende 3D-Kokultur charakterisiert. Durch die Gabe des proinflammatorischen, psoriasisrelevanten Zytokins TNF α wurde dieses 3D-Modell in einen entzündlichen Zustand versetzt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Differenzierungsprozess der Keratinozyten unter entzündlichen und nicht-entzündlichen Bedingungen anhand der terminalen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin bestimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff mit steigender Inkubationszeit eine steigende Potenz in der Hemmung der metabolischen Aktivität und der Proteinmasse aufweist. Dabei deutete sich an, dass die Proteinmasse bei niedrigen Konzentrationen des Wirkstoffes eher gehemmt wird als die metabolische Aktivität.

Darüber hinaus zeigte sich, dass Fibroblasten mit einer drei- bis fünffach erhöhten IC₅₀ eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff aufweisen als Keratinozyten. Bei den Fibroblasten konnte die metabolische Aktivität in niedrigen Konzentrationsbereichen induziert werden.

Das 3D-Kokultur-Modell ließ sich als adäquates Hautmodell mit einem dermalen und einem epidermalen Anteil charakterisieren. Die Epidermis zeigte einen mehrschichtigen Aufbau mit Zunahme des Differenzierungsgrades in den höheren Schichten. Es ist jedoch nicht gelungen, die Kultur mit TNF α psoriasisform inflammatorisch zu verändern. Der Effekt von Inositol-C2-PAF auf die Kultur war durch eine Erhöhung der Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin gekennzeichnet.

As a chronic inflammatory skin disease, the psoriasis poses challenges to both patients and practitioners. Psoriatic keratinocytes are hyperproliferative and exhibit a deficit in differentiation. There are topical as well as systemic therapies available. The glycosidated phospholipid Inositol-C2-PAF may be suitable for topical treatment of the disease. *In vitro*-models based on the immortalized keratinocyte cell line HaCaT demonstrated antiproliferative and differentiation-promoting effects of the compound. In murine *in vivo*-experiments the psoriatic disease activity was significantly reduced.

In this work, these findings were extended to primary human keratinocytes and fibroblasts. Cells isolated from foreskin were grown in 2D-monocultures and were treated in the presence of increasing concentrations of the drug. To measure the effect on the metabolic activity of the cells the MTT-assay was used. The influence on the protein mass was determined using the SRB-assay.

In addition, a 3D-coculture consisting of human primary keratinocytes and fibroblasts provided by InSphero was characterized. The administration of the proinflammatory and psoriasis-relevant cytokine $TNF\alpha$ induced an inflammatory state in the 3D-model. Immunofluorescence analysis of two different markers of terminal keratinocyte differentiation, keratin 1 and filaggrin, was used to determine the influence of Inositol-C2-PAF on the differentiation process under inflammatory and non-inflammatory conditions.

In this work, the compound showed an increasing potency in inhibiting the metabolic activity and the protein mass in a time-dependent manner. The protein mass was inhibited at lower concentrations than the metabolic activity.

In addition, fibroblasts had a significantly lower sensitivity to the drug than keratinocytes which resulted in a three- to fivefold increase of their IC_{50} . The metabolic activity of fibroblasts was induced at low concentrations of the compound.

The 3D-coculture model was characterized as an adequate skin model with a dermal and an epidermal portion. The epidermis showed a multilayered structure with an increase in the degree of differentiation in the higher layers. However, $TNF\alpha$ failed to induce psoriasis-like inflammatory changes in the culture. Inositol-C2-PAF induced the differentiation markers keratin 1 and filaggrin.

1 Einleitung

1.1 Die Haut als Grenzorgan des Menschen zur Umwelt

Die Haut ist ein Organ mit verschiedenen Aufgaben. Sie schirmt den Körper vor exogenen Einflüssen wie Pathogenen, mechanischen Einwirkungen oder UV-Strahlung ab. Reziprok verhindert sie den Verlust von Wasser und anderen Substanzen des Körpers an die Umwelt. Sie ist Sinnesorgan und außerdem maßgeblich an der Thermoregulation des Organismus beteiligt. Im gesellschaftlichen Kontext hat die Haut aufgrund ihres Aussehens, ihres Geruchs und ihrer Beteiligung an affektiven Reaktionen eine ausgeprägte soziale Dimension (1).

Die Haut (*Kutis*) liegt der Unterhaut (*Subkutis*) auf. Während die *Subkutis* aus Fett- und Bindegewebe aufgebaut ist, besteht die *Kutis* aus der bindegewebsreichen Dermis und der darüberliegenden Epidermis. In der Epidermis sind Keratinozyten der dominierende Zelltyp (2). Im Gegensatz dazu werden die Eigenschaften der Dermis durch die dermalen Fibroblasten bestimmt, welche die extrazelluläre Matrix synthetisieren (3).

1.1.1 Zellulärer Aufbau der Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Epithel aus Keratinozyten unterschiedlicher Differenzierungsgrade (Abbildung 1). Die proliferativen Stammzellen sind ausschließlich in der untersten Schicht, dem *Stratum basale*, vorhanden. Von dort beginnt der Differenzierungsprozess der Keratinozyten, die dabei nach apikal geschoben werden. Der Prozess der Differenzierung schließt mehrere Stadien ein, die in verschiedenen Schichten innerhalb der Epidermis sichtbar werden. Die erste Schicht ist dabei das *Stratum spinosum* mit seinen polygonalen Zellen. Das darauf folgende *Stratum granulosum* ist durch intrazelluläre Keratohyalin-granula gekennzeichnet, bei denen es sich um Proteinaggregate des Verhornungsprozesses handelt. Lediglich elektronenmikroskopisch sind intrazellulär außerdem Odland-Körperchen identifizierbar, welche Ceramide und andere Lipide enthalten, die im Verlauf in den Extrazellulärraum sezerniert werden und diesen ausfüllen. Die äußerste Schicht ist das *Stratum corneum*. Es besteht aus Keratinozyten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie keine Kerne und Zellorganellen mehr besitzen. Stattdessen sind sie vollständig mit Hornproteinen

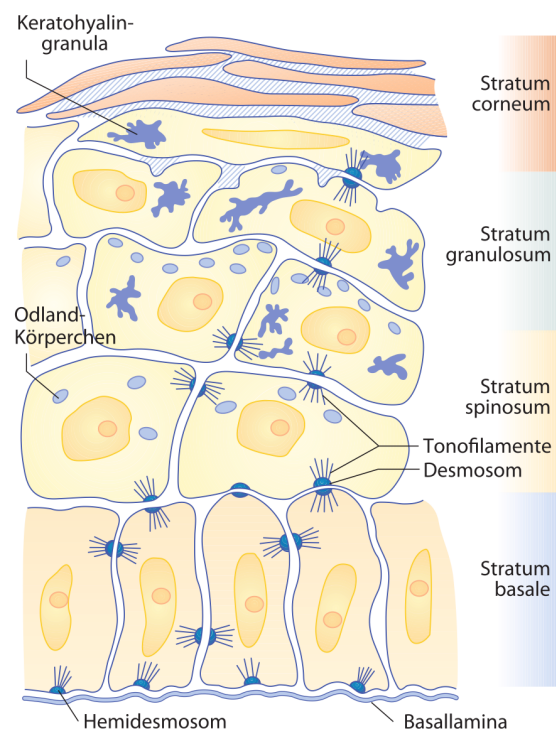


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schichtaufbaus der Epidermis (4) Auf der Basallamina befinden sich epidermale Stammzellen als Teil des *Stratum basale*. Dem schließen sich das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* an. Die äußerste Schicht ist das *Stratum corneum*. Anstelle von Kernen und Zellorganellen enthalten die terminal differenzierten Zellen dieser Schicht Hornproteine.

ausgefüllt. Die Plasmamembran wird durch eine einschichtige Lipidschicht ersetzt, die sowohl mit den intrazellulären Proteinen als auch mit den extrazellulären Lipiden verbunden ist. Es entsteht der sogenannte Cornified-Envelope (2).

1.1.2 Molekulare Marker von Hautzellen

Je nach Stadium ihrer Differenzierung exprimieren Keratinozyten verschiedene Proteine, die sich als Differenzierungsmarker eignen. Hierzu gehören Keratine, die eine ganze Proteinfamilie bilden. Sie kommen ausschließlich in Epithelzellen vor, in denen sie Intermediärfilamente formen. Dabei weisen sie eine hohe Resistenz gegen diverse Einflüsse auf. Weder durch Pepsin noch durch Trypsin lassen sich Keratine abbauen. In vielen Lösungsmitteln sind sie unlöslich. Eine mögliche Einteilung der Keratine erfolgt anhand ihrer chemischen Eigenschaften in basische (z.B. K1-K8) und saure Keratine (z.B. K9-K23). Je nach Lokalisation und entsprechendem Differenzierungsstatus sind unterschiedliche Keratine in den Zellen typisch. Basal werden beispielsweise K5 und K14 exprimiert. K1 und K10 werden im Gegensatz dazu suprabasal exprimiert und gelten deswegen als klassische Marker der terminalen Differenzierung (5). Filaggrin ist ein weiterer Marker der terminalen Differenzierung von Keratinozyten. Der Name Filaggrin steht für Filament-Aggregation-Protein und leitet sich von der Funktion als Vernetzungsprotein zwischen Keratinfilamenten ab. Damit ist Filaggrin integraler Bestandteil des epidermalen Cornified-Envelope (6). Der Cornified-Envelope enthält außerdem die Proteine und Differenzierungsmarker Involucrin und Loricrin. Während Involucrin bereits im oberen Anteil des *Stratum spinosum* exprimiert wird, ist Loricrin erst im *Stratum corneum* nachweisbar. Die beiden Moleküle werden im Cornified-Envelope enzymvermittelt miteinander vernetzt. Die dafür notwendigen Transglutinasen sind ebenfalls Differenzierungsmarker von Keratinozyten (7).

Dermale Fibroblasten besitzen andere Markerproteine, mit denen sie sich von den Keratinozyten unterscheiden lassen. Nach Untersuchungen an Mauszellen verschiedener Gewebe wurde das Fibroblast-Specific-Protein 1 (FSP-1) als klassischer Fibroblastenmarker eingeführt (8). Der Marker, der auch als S100A4 bezeichnet wird, ist Mitglied der S100-Protein-Familie. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe kalziumbindender Proteine, die sowohl an intrazellulären als auch an extrazellulären Signalwegen in vielen Kontexten beteiligt sind. Die größte Untergruppe der S100-Proteine stellt die Gruppe A mit 19 Genen auf Chromosom 1q21 dar (9).

1.1.3 Die Haut als immunologische Barriere

Die Invasion von Pathogenen in den Körper wird von der Haut durch verschiedene Mechanismen verhindert. Zum einen wird durch das epidermale *Stratum corneum* aus terminal differenzierten Keratinozyten eine kompakte physikalische Barriere geschaffen. Zugleich wird unter anderem durch die Degeneration von Filaggrin zu Urocaninsäure ein saures Milieu auf der Haut geschaffen (pH 5,4 - 5,9), das ungünstige Umgebungsbedingungen für Pathogene schafft. Darüber hinaus sezernieren Keratinozyten antimikrobielle Peptide (AMPs). Hierzu zählen die Proteine der Defensin-Familie und Cathelicidine, wie beispielsweise LL-37. AMPs richten sich nicht nur direkt gegen bakterielle Zellmembranen, sondern sind als Zytokine und Chemokine auch an der Rekrutierung des Immunsystems beteiligt. Das Immunsystem ist mit unterschiedlichen Zelltypen dauerhaft in der Haut

vertreten. In der Epidermis handelt es sich um zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) und antigenpräsentierende Langerhans-Zellen. Die in der Dermis vorhandenen Immunzellen sind im Gegensatz dazu diverser. Zu den Zellen der angeborenen Immunabwehr zählen hier Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten. Darüber hinaus sind dermal dendritische Zellen vorhanden, die als Brücke zum adaptiven Immunsystem fungieren, welches mit zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺), T-Helfer-Zellen (CD4⁺) und B-Zellen ebenfalls vertreten ist. Im Falle einer Aktivierung des Immunsystems werden die lokalen durch infiltrierende Immunzellen ergänzt (10).

1.2 Die Psoriasis als chronisch inflammatorische Erkrankung der Haut

1.2.1 Klinik

Die Psoriasis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut und/oder der Gelenke. Sie weist eine beachtliche Prävalenz von ca. 2% in Europa und Nordamerika auf. Klinisch lassen sich verschiedene Verlaufsformen der Psoriasis unterscheiden. Die klassische Plaque Psoriasis (*Psoriasis vulgaris*) ist die mit Abstand häufigste Form. Sie zeichnet sich durch erythematöse, scharf begrenzte und silber beschuppte Plaques aus (Abbildung 2). Prädilektionsstellen sind die Streckseiten der Extremitäten, die Kopfhaut sowie die Periumbilikal- und Analregion. Darüber hinaus zeigen Patient*innen gehäuft Nagelveränderungen, die von kleinen Einziehungen (Tüpfelnägel) bis zur vollständigen Nageldestruktion reichen können. Die Psoriasis *inversa* bildet eine Verlaufsform der Erkrankung, bei der vor allem intertriginöse Areale betroffen sind. Aufgrund der Reibung und Feuchtigkeit in diesen Bereichen sind die Läsionen meist nicht beschuppt. Psoriasis *guttata* beschreibt im Gegensatz dazu eine Verlaufsform mit kleinen, tropfenartigen Läsionen. Bei der Psoriasis *pustulosa* liegen auf erythematösen Plaques sterile Pusteln vor, die im Verlauf konfluieren. Alle Psoriasisformen können in die erythrodermische Psoriasis übergehen, bei der das gesamte Integument betroffen ist (11).

Es existieren zahlreiche Auslöser der Psoriasis. Mechanische Hautirritationen können Läsionen hervorrufen, was als Köbner-Phänomen bezeichnet wird. Außerdem ruft UV-Strahlung in einem Teil der Betroffenen eine Exazerbation der Erkrankung hervor. Gleiches gilt für Luftverschmutzung mit Cadmium. Es gibt viele Medikamente, die das Auftreten der Psoriasis begünstigen, wie zum Beispiel β -Blocker, ACE-Hemmer, Tetrazykline, Interferone und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR). Des Weiteren können Infektionen zum Ausbruch der Erkrankung führen. Hierzu zählen unter anderem Streptokokken-, *Staphylococcus aureus*-, *Candida albicans*- und HIV-Infektionen. Auch Impfungen gegen Influenza und Tuberkulose (BCG-Impfung) haben durch die Aktivierung des Immunsystems das Potential, die Krankheitsaktivität zu steigern. Darüber hinaus erhöht Rauchen das Psoriasisrisiko (12). Die Psoriasis kann sich nicht nur an der Haut, sondern auch an den Gelenken in Form einer Arthritis mit Enthesiopathie manifestieren. Prädilektionsorte sind die Interphalangealgelenke der Hände. Da es sich um eine erosive Arthritis handelt, kann es im Verlauf zu Deviationen an den Gelenken kommen



Abbildung 2:
Hautläsion bei Psoriasis *vulgaris* (11)

(13). Neben den klinischen Symptomen besteht bei der Psoriasis ein erhöhtes Risiko für diverse gravierende Komorbiditäten. Hierzu zählen unter anderem andere entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Uveitiden. Auch das metabolische Syndrom (stammbetonte Adipositas, Dyslipidämie, Bluthochdruck, Insulinresistenz) stellt eine Komorbidität der Psoriasis dar. Als Folge werden vermehrt koronare Herzkrankheit und kardiovaskuläre Ereignisse bei Psoriasispatient*innen festgestellt. Als eigenständiger Risikofaktor erhöht die schwere Psoriasis darüber hinaus auch die Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse. Im Rahmen der Adipositas ist das gehäufte Auftreten des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms zu beobachten. Auch die Prävalenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung ist bei Psoriasispatient*innen erhöht. Bei ihnen besteht ebenfalls eine erhöhte Gefahr des Überganges in eine Steatohepatitis und Leberzirrhose. Darüber hinaus besteht bei der Psoriasis ein erhöhtes Risiko zur Entstehung von Malignomen, wie Lymphomen, Kolon-, Blasen-, Nierenzell- und Pankreaskarzinomen. Gehäuft tritt zudem die chronisch obstruktive Lungenerkrankung auf. Auch psychiatrische Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen gehören zu den Komorbiditäten der Psoriasis (14).

1.2.2 Histopathologie

Die histopathologischen Veränderungen von psoriatischer Haut sind gekennzeichnet durch die Verdickung der Epidermis (Akanthose) und die Verbreiterung der verhornten Epidermisschicht (Hyperkeratose) mit persistierenden Zellkernen (Parakeratose) (Abbildung 3a). Innerhalb der Epidermis kommt es zu Immunezellinfiltraten, die Mikroabzesse ausbilden können (Munro's Mikroabzesse). Außerdem weist psoriatische Haut verlängerte epidermale Reteleisten auf, die zwischen den dermalen Papillen in die Tiefe reichen. Die dermalen Papillen sind gegenüber normaler Haut ebenfalls verändert. Sie zeigen epidermisnah aufgeweitete Blutgefäße (Abbildung 3b) (11).

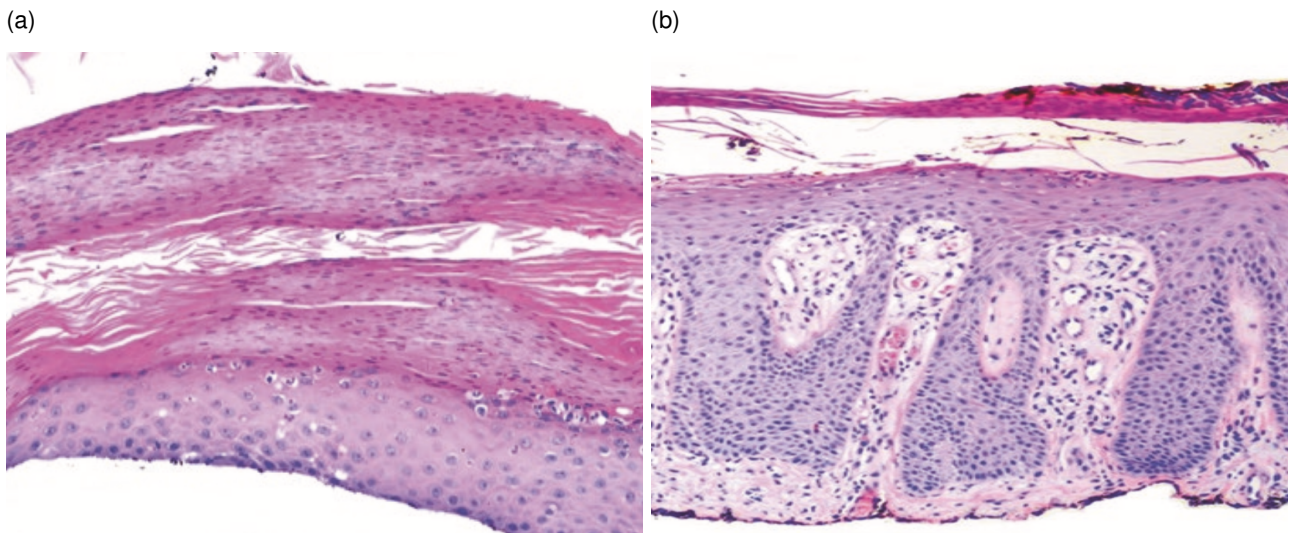


Abbildung 3:
Histologische Befunde der Psoriasis (15) **(a)** Hyperkeratose, Akanthose und Parakeratose der Epidermis
(b) Verlängerte epidermale Reteleisten und dilatierte Gefäße in den dermalen Papillen

durch den Toll-Like-Receptor (TLR) 7 oder 9 aktiviert, was zur Ausschüttung von Interferon- α (IFN- α) führt. Direkt über die Antigenerkennung mit TLR 8 oder indirekt durch den Einfluss von IFN- α lassen sich konventionelle dendritische Zellen (cDC) aktivieren. Außerdem führt IFN- α zur Einwanderung von Monozyten und deren Differenzierung zu inflammatorischen dendritischen Zellen (iDC). Konventionelle und inflammatorische dendritische Zellen stellen eine Verbindung von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort dar, indem sie sowohl zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) als auch T-Helfer-Zellen (CD4⁺) aktivieren. Über das Zytokin IL-12 induzieren sie die Polarisierung von CD4⁺-Zellen zu Th1-Zellen, welche Interferon- γ (IFN- γ) sezernieren. Die IL-12/IFN- γ -Achse galt lange als Hauptmechanismus der psoriatischen Pathogenese. Neuere Studien belegen jedoch, dass die IL-23/IL-17-Achse (rote Pfeile in der Abbildung 4) eine bedeutendere Rolle für das Krankheitsgeschehen der Psoriasis spielen könnte. Ebenfalls von cDCs und iDCs freigesetzt, bewirkt IL-23 die Stimulation von Th17-Zellen, die IL-17 ausschütten (19). Entscheidend zur Pathogenese der Psoriasis trägt auch das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF α) bei. Es aktiviert verschiedene Zelltypen und regt sie zur weiteren TNF α -Ausschüttung an. Zu diesen Zellen gehören die dendritischen Zellen, ebenso wie T-Zellen und Keratinozyten (20). Die Vielseitigkeit des Zytokins zeigt sich auch in den Effekten, die durch TNF α -blockierende Biologika erreicht werden können. Unter der Therapie mit Etanercept, einem TNF α -blockierendem Fusionsprotein, konnten in den Läsionen von Psoriasispatient*innen sowohl inhibitorische Einflüsse auf die IL-23/IL-17- als auch auf die IL-12/IFN- γ -Achse beobachtet werden. Die Expression von IL-22 und IL-17 als Schlüsselzytokine der Th17-Zellen wurde signifikant reduziert. Infolgedessen konnte auch ein Expressionsrückgang der von ihnen regulierten Gene Chemokin-Ligand 20 (CCL20) und β -Defensin 4 (DEFB4) nachgewiesen werden. Ebenfalls gehemmt wurde die Expression der Th1-Zytokine IFN- γ und Lymphotoxin- α , sowie das von ihnen regulierte Gen Myxovirus-Resistance-1 (MX-1) (21).

Die Dermis nimmt nicht nur als Ort der Immunzellrekrutierung eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis ein. Die dermalen Fibroblasten sind auch direkt an der Entstehung und Erhaltung des inflammatorischen Milieus beteiligt. Im Gegensatz zu unbetreffener Haut konnte in der Dermis psoriatischer Läsionen eine erhöhte Chemerinexpression durch die Fibroblasten detektiert werden (22). Chemerin ist ein Chemokin, das die Migration plasmazytischer dendritischer Zellen (pDC) fördert. *In vitro* konnten Fibroblasten mit IL-17, einem Schlüsselzytokin der Psoriasis, zur Synthese von Chemokinen der CXCL-Familie angeregt werden. Außerdem exprimierten sie vermehrt Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und IL-8, was ihren Beitrag zur Unterhaltung des inflammatorischen Milieus verdeutlicht (23). Dermale Fibroblasten zeigen in psoriatischen Läsionen auch eine erhöhte Expression von S100A4. Das betrifft insbesondere die obere Schicht der Dermis, das *Stratum papillare*. Diskutiert wird, dass diese Expressionssteigerung durch inflammatorische Zytokine hervorgerufen wird und über die Modulation von p53 zur Hyperproliferation und Angiogenese in psoriatischen Läsionen beiträgt (24). Neben den dermalen Fibroblasten sind auch Endothelzellen dermalen Blutgefäße ein Faktor in der Pathogenese der Erkrankung. Sie ermöglichen über die Expression von Adhäsionsmolekülen die Migration von Immunzellen in psoriatische Läsionen (11).

In dem inflammatorischen Milieu der Läsionen werden Keratinozyten zur Ausbildung ihres psoriatischen, hyperproliferativen Phänotyps angeregt. Darüber hinaus wird in den Keratinozyten die Synthese proinflammatorischer Zytokine, beispielsweise TNF α und IL-17, induziert. Auch Chemokine werden von den aktivierten Keratinozyten freigesetzt, unter anderem CCL20, welches

chemotaktisch auf cDCs und Th17-Zellen wirkt. Keratinozyten erhöhen auch die Produktion von proinflammatorisch wirksamen, antimikrobiellen Peptiden (AMPs), zu denen humanes β -Defensin 2, Psoriasin (S100A7) und LL37 gehören (20).

Zum psoriatischen Phänotyp der Keratinozyten gehört nicht nur die Synthese immunologisch wirksamer Moleküle. Es liegt auch eine veränderte Expression von Differenzierungsmarkern vor. In psoriatischer Haut sind die terminalen Differenzierungsmarker K1 und K10 vermindert nachweisbar (25), während K6, K16 und K17 überexprimiert sind (26). Die Expression von Filaggrin, ebenfalls einem terminalen Differenzierungsmarker, ist in parakeratotischen Psoriasisläsionen reduziert (27). Auch der terminale Differenzierungsmarker Loricrin wird bei der Psoriasis vermindert exprimiert (28). Involucrin ist im Gegensatz dazu erhöht (29). Während es üblicherweise in nicht proliferativen Keratinozyten der höheren epidermalen Schichten exprimiert wird, kann es bei der Psoriasis auch in proliferativen Keratinozyten detektiert werden (7).

1.2.4 Therapie

Je nach Krankheitsaktivität stehen bei der Psoriasis verschiedene therapeutische Optionen zur Verfügung. Bei milder Psoriasis lassen sich beispielsweise topische Glukokortikoide und Vitamin-D-Derivate einsetzen. In schwereren Fällen können eine Phototherapie (UV-B), eine Photochemotherapie (PUVA: Psoralen und UV-A) oder der Einsatz systemischer Medikamente (Methotrexat, Ciclosporin) notwendig sein (11). Mit der Entwicklung von Biologika sind neue Möglichkeiten in der Psoriasisstherapie entstanden, die sich insbesondere gegen $\text{TNF}\alpha$ und die IL-23/IL-17-Achse richten. Der $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitor Etanercept ist ein $\text{TNF}\alpha$ -bindendes Fusionsprotein aus zwei TNF-Rezeptormolekülen, die an den Fc-Teil eines Immunglobulins G (IgG) gebunden sind (30). Alternativ stehen mit Adalimumab und Infliximab auch monoklonale Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ zu Verfügung (11). Ustekinumab ist ein Antikörper gegen p40, die gemeinsame Untereinheit von IL-12 und IL-23. Ausschließlich gegen die p19-Untereinheit von IL-23 gerichtet sind Tildrakizumab und Risankizumab. Der monoklonale Antikörper Brodalumab hemmt die IL-23/IL-17-Achse durch Bindung an den IL-17-Rezeptor, während Secukinumab gegen das Zytokin selbst gerichtet ist (20).

Die wichtigsten Therapieziele von Psoriasispatient*innen sind laut einer deutschen Studie die Abheilung und schnelle Verbesserung der Hautläsionen (31). Trotz der verschiedenen zur Verfügung stehenden Medikamente scheint es noch erheblichen Verbesserungsbedarf in der Therapie zu geben. In einer ebenfalls deutschen Studie haben 54,6% der befragten Patient*innen angegeben, mit ihrer Therapie nicht zufrieden zu sein. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in den USA (32).

1.3 Inositol-C2-PAF als mögliche Therapieoption bei Psoriasis

1.3.1 Stoffklasse

Inositol-C2-PAF gehört zu der Gruppe der Anti-Tumor-Phospholipide (ATL) (Abbildung 5). Diese wurden als Alternative zu herkömmlichen Chemotherapeutika entwickelt mit dem Ziel, eine Therapie mit weniger Nebenwirkungen bereitzustellen. Innerhalb der Anti-Tumor-Phospholipide existieren ver-

schiedene Klassen. Die Klasse der Alkyl-Phospholipide (APL) zeichnet sich dadurch aus, dass es sich um Derivate des physiologisch vorkommenden plättchenaktivierenden Faktor (PAF) handelt (33).

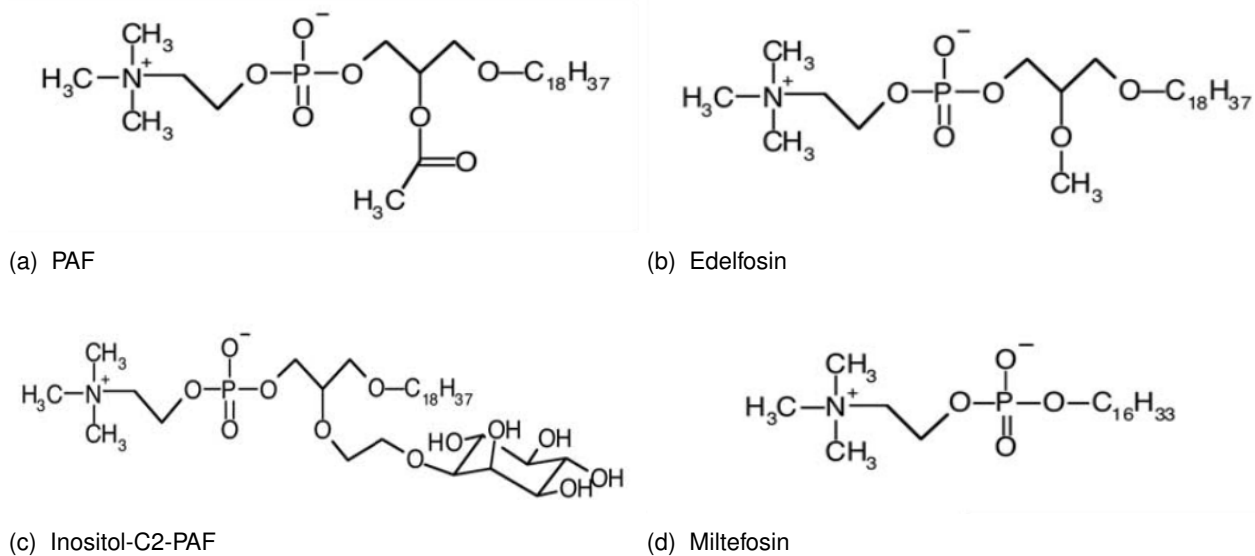


Abbildung 5:

Strukturformeln von PAF und davon abgeleiteter synthetischer Derivate (33)

(a) Der plättchenaktivierende Faktor (PAF) ist aus einem Glycerolgerüst mit Phosphocholin sowie einer Alkyl- und Acetylgruppe als Bindungspartner aufgebaut **(b)** Anders als PAF weist Edelfosin keine Acetyl-, sondern eine Methylgruppe auf **(c)** Inositol-C2-PAF enthält Inositol, welches über eine Brücke aus zwei Kohlenstoffatomen mit dem Glycerolgerüst verbunden ist **(d)** Miltefosin besteht aus einer Alkyl- und einer Phosphocholingruppe

PAF entspricht strukturellchemisch 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin (Abbildung 5a) (34). Das Grundgerüst bildet der Polyalkohol Glycerol, an welchen Phosphocholin gebunden ist. An der zweiten Bindungsstelle des Grundgerüsts befindet sich eine Acetylgruppe. Als dritter Bindungspartner liegt Octadecylgruppe (C_{18}) vor.

Die von PAF abgeleiteten Alkyl-Phospholipide (APL) haben verschiedene Vertreter, beispielsweise Edelfosin (Abbildung 5b). Edelfosin unterscheidet sich von PAF an Position zwei des Glycerolgerüsts. Anstelle der Acetylgruppe wird das Glycerol mit einer Methylgruppe verethert. Eine weitere APL-Klasse stellen die glykosidierten Phospholipide dar, dessen Vertreter Inositol-C2-PAF in dieser Arbeit genauer untersucht wurde (Abbildung 5c). Glykosidierte Phospholipide sind an Position 2 des Glycerolgerüsts mit einem Monosaccharid bzw. einem Monosaccharid-verwandten Molekül verbunden. Ziel der Einführung dieser Moleküle in die Struktur von Anti-Tumor-Phospholipiden ist die Erhöhung hydrophiler Eigenschaften bei gleichzeitiger Beibehaltung des amphiphilen Charakters (33, 35).

Die Alkyl-Phosphocholine (APC) bilden eine zusätzliche Gruppe von Anti-Tumor-Phospholipiden ohne Glycerolgerüst, was sie grundsätzlich von den oben beschriebenen Alkyl-Phospholipiden unterscheidet. Miltefosin als ein bekannter Vertreter dieser Gruppe enthält zwar eine Phosphocholin-Kopfgruppe, welche jedoch über die Phosphatgruppe direkt mit einer Alkylgruppe aus 16 Kohlenstoffatomen verbunden ist (Abbildung 5d) (33).

1.3.2 Wirkung und Anwendung ausgewählter Anti-Tumor-Phospholipide

Die Wirkung von Anti-Tumor-Phospholipiden (ATLs) basiert auf der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion in den Zielzellen. Dabei konnten zahlreiche zu Grunde liegende Mechanismen identifiziert werden. Insbesondere die Hemmung der Synthese von Phosphatidylcholin als einem Hauptbestandteil von Zellmembranen scheint dabei von Bedeutung zu sein. Außerdem interferieren die Wirkstoffe mit mehreren Signalwegen, unter anderem dem MAPK-ERK-, dem PI3K-PKB- und dem SAPK-JNK-Signalweg (36).

Edelfosin als ein Vertreter der Alkyl-Phospholipide hat Wirkungen auf humane Malignomzellen verschiedener Entitäten gezeigt. Hierzu zählen unter anderem Malignomzellen der Prostata, der Lunge und Leukämiezellen (37). Die Apoptoseinduktion durch Edelfosin scheint dabei selektiv entartete Zellen zu betreffen (38). Auch im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten wird der Einsatz von Edelfosin erforscht. Tanzifi et al. haben gezeigt, dass mit *Toxoplasma gondii* infizierte Mäuse unter der Therapie mit Edelfosin nicht nur eine Reduktion erregerspezifischer mRNA (GRA1, MIC3) in verschiedenen Organen aufweisen, sondern auch ein signifikant längeres Überleben gegenüber der Kontrollgruppe haben (39).

Das Alkyl-Phosphocholin Miltefosin ist ein Medikament, das bereits für zwei Indikationen zugelassen ist. Zum einen findet es in der topischen Therapie von kutanen Brustkrebsmetastasen Anwendung. Zum anderen wird es in der Therapie der Leishmaniose genutzt, wobei es nach oraler Applikation systemisch wirkt. Darüber hinaus zeigte Miltefosin in präklinischen Studien Wirkung gegen unterschiedliche Amöben, Bakterien und Pilze (40). Jenseits der infektiologischen und onkologischen Anwendung des Wirkstoffes haben Iacano et al. Hinweise dafür gefunden, dass Miltefosin in der Behandlung der Atherosklerose von Nutzen sein könnte. Die IL-1 β -Sekretion aktivierter Makrophagen, die pathophysiologisch an der Plaqueentstehung beteiligt sind, konnte *in vitro* um rund 75% gesenkt werden. Vor dem Hintergrund, dass IL-1 β -senkende Therapien die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen wie dem Herzinfarkt oder Schlaganfall erfolgreich mindern, könnte auch Miltefosin in diesem Zusammenhang einen therapeutischen Beitrag leisten (41).

1.3.3 Effekte von Inositol-C2-PAF *in vitro*

Zytotoxizität

Die Wirkung von Inositol-C2-PAF wurde bislang vor allem in Hautzellen bestimmt (35, 42, 43, 44). An einer humanen, immortalisierten Keratinozytenzelllinie (HaCaT) konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 5 μ M Inositol-C2-PAF über einen Zeitraum von 48 Stunden keine zytotoxischen Effekte hervorruft. Höhere Konzentrationen führen zu einer konzentrationsabhängigen Schädigung der Zellen. Die Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben (LC₅₀), beträgt dabei 15 μ M (35). Die Klasse der glykosidierten Phospholipide, zu der auch Inositol-C2-PAF gehört, führt in zytotoxischen Konzentrationen zur Ruptur von Zellmembranen. Glc-PAF, ebenfalls ein glykosidiertes Phospholipid, das im Gegensatz zu Inositol-C2-PAF ein Glukosemolekül anstelle des Inositols und der C2-Brücke aufweist, interkaliert in biologische Membranen und führt dadurch in zytotoxischen Konzentrationen zur Bildung von Membranporen und somit zur Zelllyse (45).

Proliferation

Die Proliferationshemmung von HaCaT-Zellen ist eine weitere Wirkung von Inositol-C2-PAF. Die 50%ig inhibitorische Konzentration (IC_{50}) liegt mit 1,8 μM deutlich unterhalb der Grenze zum zytotoxischen Einfluss des Wirkstoffes. In Zellzyklusanalysen kann nach 24 Stunden eine leichte Abnahme der HaCaT-Zellen gezeigt werden, die sich in Phasen der Reproduktion (S- und G2-Phase) befinden. Im Gegensatz dazu steigt die Zahl der Zellen ohne reproduktive Aktivität (G1/G0-Phase) deutlich an. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der antiproliferative Effekt von Inositol-C2-PAF auf einer Regulation des Zellzyklus beruht und nicht durch eine direkte Zelltoxizität zu erklären ist (35). Nach 48 Stunden können bei der Analyse der Zellzyklusphasen zwischen der Kontrolle und den behandelten HaCaT-Zellen keine Unterschiede mehr festgestellt werden. Allerdings liegt der Anteil der apoptotischen Zellen unter Behandlung um ein Vielfaches höher als bei der Kontrolle. Das offenbart nicht nur die apoptoseinduzierenden Eigenschaften des Wirkstoffes. Es wirft auch die Frage auf, ob die antiproliferative Wirkung nicht auch auf die Apoptoseinduktion zurückzuführen sei (35). Außerdem stellt sich die Frage nach den genauen Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF.

Apoptose

Die Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF wurden an einer humanen, immortalisierten T-Zelllinie (Jurkat) erforscht. Dabei zeigte sich, dass sowohl das Fas-Associated-Death-Domain-Protein (FADD) als auch die Caspase 8 daran beteiligt sind (46). Hierbei handelt es sich um Proteine des extrinsischen Apoptoseweges, die üblicherweise vom Todesrezeptor FAS gebunden werden und zusammen den Death-Receptor-Mediated-Death-Inducing-Signaling-Complex (DISC) bilden. Der DISC führt kaskadenartig zum Zelltod. Durch Inositol-C2-PAF kann auch bei FAS-defizienten Jurkat-Zellen die Apoptose induziert werden (46). Der Wirkstoff ist also in der Lage unter Umgehung des Todesrezeptors FAS den extrinsischen Apoptoseweg zu induzieren, indem er zur Bildung eines atypischen DISC führt. Doch auch der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg scheint von Inositol-C2-PAF induzierbar. Jedenfalls zeigen Bcl-2 überexprimierende Jurkat-Zellen eine geringere Anfälligkeit für die Apoptoseinduktion durch den Wirkstoff.

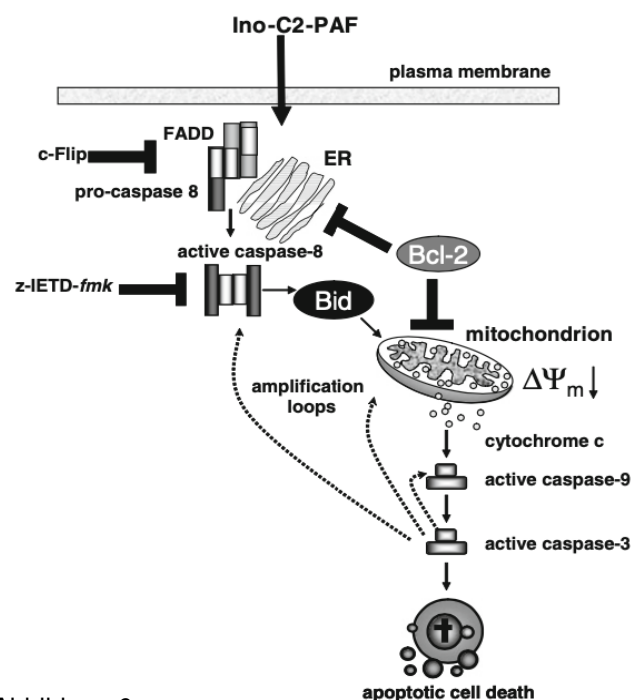


Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF: unter Bildung eines atypischen Death-Receptor-Mediated-Death-Inducing-Signaling-Complex (DISC) aus Fas-Associated-Death-Domain-Protein (FADD) und Caspase 8 wird eine Kaskade initiiert, die über den BH3-Interacting-Domain-Death-Agonist (Bid) den intrinsischen Apoptoseweg induziert. Unter Einfluss folgender Antagonisten kann die Apoptoseinduktion durch Inositol-C2-PAF abgeschwächt werden: c-Flip, z-IETD-fmk, Bcl-2 (46)

Bcl-2 fungiert als Antagonist des intrinsischen Apoptoseweges. Somit kann angenommen werden, dass die proapoptotische Wirkung von Inositol-C2-PAF sowohl auf Mechanismen des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptoseweges beruht, wobei der Todesrezeptor FAS jedoch nicht involviert ist (Abbildung 6) (46).

Differenzierung

Ein weiterer Effekt von Inositol-C2-PAF ist, dass es die Differenzierung von HaCaT-Zellen induzieren kann. So wird der terminale Differenzierungsmarker Involucrin unter Einfluss des Wirkstoffs vermehrt exprimiert. Ein weiterer Differenzierungsmarker, das Enzym Transglutaminase, wird zwar nicht vermehrt exprimiert, jedoch in seiner Enzymaktivität verstärkt (35).

Genexpression

Genomweite DNA-Microarray-Analysen zeigen, dass die Expression von 592 Genen in HaCaT-Zellen unter Einfluss von Inositol-C2-PAF verändert wird. Dabei werden zahlreiche Gene, die Immunsystem und Inflammation betreffen, herunterreguliert. Hierzu gehören beispielsweise die Gene der Proteine Enalafin (PI3) und β -Defensin 2 (hBD-2, DEFB4) (42). Diese Proteine werden in psoriatischer Haut vermehrt exprimiert (47, 48). Durch Inositol-C2-PAF wird in HaCaT-Zellen auch die Transkription verschiedener MHC-II-Moleküle gesenkt (HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR). Insgesamt zeigt der Wirkstoff also ein antiinflammatorisches Wirkprofil (42).

Um Hauterkrankungen wie die Psoriasis *in vitro* zu simulieren, lassen sich inflammatorische Hautmodelle nutzen. Ein solches, zweidimensionales Modell wurde mit HaCaT-Zellen etabliert, indem diese mit IFN- γ , einem wichtigen inflammatorischen Mediator in der Pathogenese der Psoriasis (11), behandelt wurden. Dadurch konnte die Transkription von MHC-I-Genen (HLA-A, -B und -C) und MHC-II-Genen (HLA-DRA1, -DRB1, -DQA1, -DPA1 und -DPB1) in den Keratinozyten gesteigert werden. Unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nahm dieser Effekt wieder ab. Gleiches bestätigte sich für die Translation des HLA-DR-Gens sowie der MHC-I-Gene. Als mögliche Ursache dafür wurde der Class-II-Major-Histocompatibility-Complex-Transaktivator (CIITA) identifiziert. CIITA fungiert als Regulator der MHC-Expression und wird in den inflammatorisch veränderten HaCaT-Zellen vermehrt transkribiert. Auch diese Steigerung ließ sich mit Inositol-C2-PAF inhibieren. Analog zu HaCaT-Zellen zeigten auch primäre humane Keratinozyten unter Einfluss von IFN- γ eine induzierte Transkription ausgewählter MHC-II-Gene (HLA-DPB1 und -DQA1) und MHC-I-Gene (HLA-A und -B), die mit Inositol-C2-PAF wieder gehemmt werden konnte (44).

Um die psoriatisch erhöhte Proliferation von Endothelzellen und ihre Rolle in der Immunzellmigration zu simulieren, lassen sich *in vitro* humane Endothelzellen aus der *Vena umbilicalis* (HUVEC-Zellen) nutzen, die mit TNF α entzündlich verändert werden. Inositol-C2-PAF zeigt einen selektiven proapoptotischen Effekt auf das entzündlich veränderte Endothel, während die nicht entzündlich veränderte Kontrolle keine Änderung der Apoptoserate aufweist. Außerdem werden unter der TNF α -Behandlung die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 vermehrt transkribiert und translatiert. Mit Inositol-C2-PAF lässt sich die Transkription dieser Moleküle wieder um 40-60% reduzieren. Dabei sinkt auch die Oberflächenexpression von VCAM-1 um 65% und von E-Selektin

um 30%. Die Expression von ICAM-1 bleibt hingegen unverändert.

Die Untersuchung der Interaktion von mononukleären Blutzellen (PBMCs) mit Endothelzellen wird durch Experimente in der Strömungskammer ermöglicht. Die Adhäsion der Immunzellen wird durch TNF α -Stimulation des Endothels deutlich gesteigert und kann durch den Einsatz von Inositol-C2-PAF wieder signifikant reduziert werden. An inflammatorischen *in vitro*-Gefäßmodellen kann also gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die Rekrutierung von Immunzellen reduzieren und die Apoptose von entzündlich verändertem Endothel induzieren kann (49).

1.3.4 Wirkung von Inositol-C2-PAF in zwei komplementären Psoriasis-Maus-Modellen

Neben den beschriebenen *in vitro*-Modellen existieren auch inflammatorische Maus-Modelle, die dem humanen Psoriasisphänotyp ähnlich sind. Dazu gehören beispielsweise K5.hTGF β 1-Mäuse. Den Embryonen dieser Mauslinie wurde ein Expressionsvektor mit Keratin-5-Promotor injiziert, der als Transgen die humane Wildtyp-cDNA des transformierenden Wachstumsfaktors β 1 (TGF β 1) enthält (50). Keratin 5 (K5) wird üblicherweise in der Basalschicht der Epidermis von proliferierenden Keratinozyten gebildet, während der Wachstumsfaktor TGF β 1 bei der Psoriasis vermehrt exprimiert wird (50, 51). In den K5.hTGF β 1-Mäusen werden psoriasiforme Läsionen beobachtet, die im zeitlichen Verlauf progredient sind. Es entwickeln sich erythematöse, schuppige Plaques. Die Entwicklung von Läsionen an den geklippten Ohren können als Äquivalent zum Köbner-Phänomen gesehen werden. Auch mikroskopisch lassen sich humane psoriasistypische Phänomene nachweisen. Hierbei handelt es sich um Akanthose, Hyperkeratose, Immunzellinfiltration und Neovaskularisation (50).

Unter intraperitonealer Behandlung mit Inositol-C2-PAF zeigen K5.hTGF β 1-Mäuse einen milderen klinischen Krankheitsverlauf als die Kontrolltiere. Der Unterschied lässt sich mit einem Score quantifizieren, der neben der Größe der betroffenen Hautareale auch die Schuppung, die Rötung und die Alopezie beinhaltet. Während der klinische Zustand der Kontrollpopulation sich im Verlauf immer weiter aggraviert, bleibt der Score für die behandelte Population weitestgehend konstant. Dies mündet in einem hoch signifikanten Unterschied der Scores nach 14 Tagen. Des Weiteren nehmen die behandelten Mäuse in dem Zeitraum gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an Gewicht zu. Neben den makroskopischen lassen sich auch mikroskopische Befunde erheben. Dabei zeigt sich, dass die Behandlung mit Inositol-C2-PAF zu einer Reduktion der epidermalen Akanthose führt. Außerdem wird das kutane Immunzellinfiltrat aus CD8 $^{+}$ -, CD4 $^{+}$ - und Mastzellen reduziert. Die Hypervaskularisation der K5.hTGF β 1-Mäuse kann auf das Niveau von Wildtyp-Mäusen gesenkt werden. Zwischen unbehandelten Wildtyp-Mäusen und Wildtyp-Mäusen, die intraperitoneal mit Inositol-C2-PAF behandelt werden, entsteht kein Unterschied. Weder klinisch noch im Gewichtsverlauf ergeben sich Auffälligkeiten. Gleiches gilt für die histologischen Schnitte der Haut. Im Rahmen der präklinischen Studie konnten also keine zytotoxischen Wirkungen von Inositol-C2-PAF *in vivo* festgestellt werden.

Der antiinflammatorische Einfluss auf den Psoriasisverlauf konnte in einem zweiten Psoriasis-Maus-Modell, den JunB/c-Jun-defizienten Mäusen, bestätigt werden. Auch bei JunB/c-Jun-defizienten Mäusen lässt sich die Progression des psoriatischen Phänotyps abschwächen und eine verstärkte Gewichtszunahme erreichen. Histologische Untersuchungen bestätigen die erhobenen klinischen Befunde dabei mikroskopisch (49).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Inositol-C2-PAF in verschiedenen Modellen *in vitro* und *in vivo* vielversprechende Ergebnisse zeigt. Das proapoptotische, prodifferentielle sowie antiinflammatorische Wirkprofil von Inositol-C2-PAF könnte sich potentiell für die Psoriasis-therapie eignen. Die Reduktion der Krankheitsaktivität in den murinen Tierexperimenten bekräftigt dieses Potential.

1.4 Zwei- und dreidimensionale *in vitro*-Modelle

Grundsätzlich stehen *in vitro* verschiedene Modelle zur Verfügung, um Wirkstoffe pharmakologisch zu untersuchen. Derartige *in vitro*-Modelle sollen helfen, die Effekte der zu entwickelnden Pharmaka zu charakterisieren und mögliche toxische Effekte zu detektieren (52). Damit tragen derartige Modelle im Sinne des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) dazu bei, Tierversuche zu minimieren. Klassischerweise kommen dabei zweidimensionale Zellkulturen (2D-Kulturen) zum Einsatz, in denen alle Zellen als Monolayer den gleichen Zugang zum Medium haben. Zu den Vorteilen dieser Kulturen gehört sowohl eine gute Replizierbarkeit als auch eine einfache Interpretation ihrer Untersuchungsergebnisse. Darüber hinaus sind 2D-Kulturen kostengünstig. 2D-Modelle weisen jedoch auch Nachteile auf. Ihre Zellen zeigen oft eine mangelnde Differenzierung, eine erhöhte Proliferationsrate und eine differentielle Genexpression. Außerdem sind sie häufig empfindlicher gegenüber Wirkstoffeinflüssen und werden schneller apoptotisch (53). Insgesamt eignen sich 2D-Kulturen besonders für die Verwendung im Hochdurchsatz-Screening neuer Arzneimittel (54).

In vivo befinden sich Zellen im dreidimensionalen Kontext eines Gewebes. Dieser Umstand kann durch dreidimensionale Zellkulturen (3D-Kulturen) simuliert werden. Dabei kommt der Interaktion von Zellen untereinander und von Zellen zur extrazellulären Matrix eine besondere Bedeutung zu. Zusätzlich ermöglichen 3D-Kulturen die Differenzierung der Zellen. Außerdem zeigen die Modelle Proliferationsraten und Genexpressionsmuster, die mit denen *in vivo* vergleichbar sind (53). Ein weiterer Vorteil von 3D-Modellen ist, dass sich die Wirkung von Pharmaka *in vivo* präziser abschätzen lässt als mit 2D-Modellen (53, 55). Die Versorgung der Zellen in 3D-Kulturen erfolgt nicht gleichmäßig, sondern über Diffusion. Das gilt sowohl für die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen als auch für die Elimination von CO₂ und anderen Stoffwechselprodukten. Je weiter die Zellen von der Kontaktfläche mit dem Medium entfernt sind, desto stärker ist ihre Versorgung eingeschränkt. Die Heterogenität der Zellen als Folge ihres Versorgungsstatus kann auf der einen Seite zu einer besseren Abbildung der Verhältnisse *in vivo* beitragen. Auf der anderen Seite liegt in der Versorgung von 3D-Kulturen aufgrund der fehlenden Vaskularisierung gleichzeitig ein eindeutiger Unterschied zu Geweben *in vivo* (55). Ein Nachteil von 3D-Kulturen kann die Interpretation erhobener Untersuchungsergebnisse darstellen, die im Rahmen der komplexen Struktur der Modelle schwierig sein kann. Außerdem zählen ihre Kostenintensität und der mit ihnen verbundene Arbeitsaufwand zu den Nachteilen von 3D-Kulturen (53).

Bei den Zellen, die in *in vitro*-Modellen verwendet werden, können grundsätzlich primäre von immortalisierten Zellen abgegrenzt werden. Im Falle von humanen Keratinozyten lassen sich die primären Zellen aus Präputien oder anderen Hautgeweben isolieren, die bei Operationen anfallen. Tjabringa et al. nutzten beispielsweise Hautgewebe, welches im Rahmen von Eingriffen an der Abdominalwand entnommen worden war (56). Primäre Keratinozyten gehen jedoch innerhalb von 20 Verdopplungen in die Seneszenz über. In diesem Zustand setzt ihre Proliferation aus, die Adhäsion zur extrazel-

lulären Matrix verstärkt sich und es bildet sich eine vergrößerte und abgeflachte Zellmorphologie aus (57). Um Keratinozyten langfristig einsetzen zu können, muss auf immortalisierte Zelllinien oder Stammzellen zurückgegriffen werden. Hierzu zählen beispielsweise spontan immortalisierte NM1-Zellen, die über viele hundert Populationsverdopplungen stabil bleiben. Ihr Karyotyp mit einem zusätzlichen Chromosom 8 unterscheidet sich jedoch deutlich von dem primärer Zellen (58). HaCaT-Zellen bilden eine weitere, spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie, die ebenfalls chromosomale Aberrationen aufweist (59). Neben spontan immortalisierten existieren auch künstlich immortalisierte Zelllinien, beispielsweise durch die Transduktion der viralen Onkogene E6 und E7 des humanen Papillomavirus (HPV) (57).

Anhand des dreidimensionalen EpiKutis-Modells der Haut lassen sich die Unterschiede in der Differenzierung und Wirkstoffempfindlichkeit der Zellen gegenüber einer herkömmlichen 2D-Kultur demonstrieren. Der Einfluss von Silber-Nanopartikeln (AgNPs) auf die primären Keratinozyten beider Modelle variiert deutlich mit einer stark reduzierten Toxizität der AgNPs im 3D-Modell. In höheren Konzentrationsbereichen beträgt die Zellviabilität über 80%, während sie in der 2D-Kultur bereits unter 20% liegt (60). Der Grund dafür ist die Struktur des 3D-Modells, die der Situation *in vivo* deutlich näher kommt als der 2D-Monolayer (Abbildung 7). Aufgrund des verhornten *Stratum corneum* werden die Zellen des 3D-Modells von den AgNPs abgeschirmt, was deren toxische Effekte reduziert. Der Anteil von aufgenommenen AgNPs liegt im 3D-Modell bei lediglich 0,9%, während das 2D-Modell 8,8% der Partikel aufnimmt (60). Das 3D-Modell besitzt damit genau wie die Haut eine Barrierefunktion, die dem 2D-Modell fehlt.

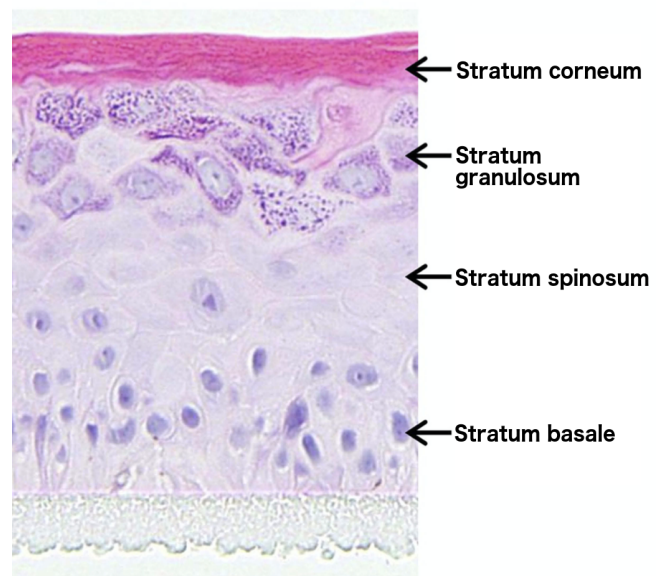


Abbildung 7: Charakterisierung des 3D-EpiKutis-Modells aus primären Keratinozyten, modifiziert nach (60)

3D-Modelle lassen sich durch den Einsatz verschiedener Zelltypen noch weiter an den physiologischen Gewebesaufbau annähern (55). Für Hautmodelle bedeutet dies konkret eine Kokultur von Fibroblasten, welche die Dermis repräsentieren, und Keratinozyten, die ein mehrschichtiges Epidermisäquivalent bilden. Ein Beispiel dafür ist das von Lee et al. (61) mittels Bioprinting etablierte Hautmodell. Mit dem Bioprinter werden erst Kollagen und Fibroblasten (HFF-1) schichtweise übereinander aufgetragen. Darüber folgt der Biodruck einer Keratinozytenschicht (HaCaT). Der gesamte Prozess nimmt ungefähr 40 Minuten in Anspruch. Durch die Reduktion des Mediumvolumens wird im weiteren Verlauf eine Air-Liquid-Interface-Culture (ALI-Culture) geschaffen. Bei der ALI-Culture sind die Keratinozyten an der Oberfläche des Mediums mit Kontakt zur Luft lokalisiert. Unter diesen Kulturbedingungen kommt es zur terminalen Differenzierung der Keratinozyten mit Bildung des *Stratum corneum* (61).

Alternativ zum Bioprinting existiert auch eine konventionellere Methode zur Herstellung von 3D-Kokulturmodellen der Haut. Dabei werden Fibroblasten in einer Kollagenmatrix über mehrere Tage als Monokultur auf einem Filter inkubiert bis sie ein einheitliches Gel bilden. Nun wird eine Zellsuspension aus Keratinozyten hinzugegeben, deren Zellen sich über die Fibroblasten legen. Die Endstrecke zur terminalen Differenzierung mittels ALI-Culture ist bei der Bioprinting-Methode und dem konventionellen Verfahren identisch (61).

Ein weiteres Verfahren zur Fertigung eines Haut-Kokulturmodells wird von der Firma InSphero genutzt. Fibroblasten formieren im Hanging-Drop eine Sphäre, auf deren Oberfläche anschließend Keratinozyten aufgebracht und kultiviert werden (Abbildung 8) (62). Dafür ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verfahren kein Einsatz einer artifiziellen Kollagenmatrix notwendig. Stattdessen wird die extrazelluläre Matrix analog zur Situation *in vivo* eigenständig von den Fibroblasten hergestellt. Ein weiterer Unterschied ist, dass das InSphero-Modell komplett in Medium eingetaucht ist. Eine ALI-Culture ist nicht notwendig, auch wenn diese die physiologische Umgebung der Haut besser abbilden könnte (63).

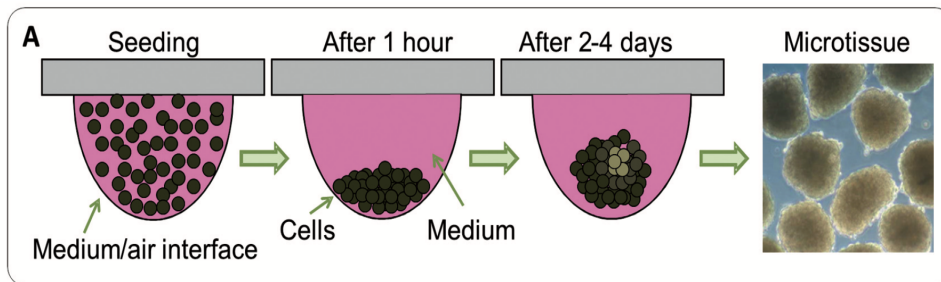


Abbildung 8:
Hanging-Drop-Technik zur Herstellung von sphärischen Zellkulturen (62)
Aus einer Zellsuspension wird ein hängender Tropfen gebildet, in dem die Zellen absinken und sphärische Mikrogewebe bilden

1.5 Arzneimittelentwicklung

1.5.1 Phasen der Arzneimittelentwicklung

In der Entwicklung neuer Arzneimittel existieren verschiedene Phasen (Abbildung 9). Grundsätzlich beginnt die Forschung präklinisch und geht in die klinische Prüfung des Arzneimittels über (64). Zu Beginn steht dabei die Einführung eines neuen Pharmakons, die Folge einer Entdeckung oder der Modifikation bereits existierender Wirkstoffe sein kann (65). Anschließend werden durch die präklinische Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen Erkenntnisse über die Hauptwirkung und Toxizität des neuen Wirkstoffes gesammelt. Es werden Nebenwirkungen erfasst und die therapeutische Breite bestimmt. Außerdem werden pharmakokinetische Parameter wie die Resorption, die Verteilung, der Metabolismus und die Elimination untersucht (52). Im Gegensatz zur sich anschließenden klinischen Prüfung geschieht dies in der Präklinik ohne Einbezug menschlicher Proband*innen, sondern mittels *in vitro*-Experimenten und Tierversuchen (64).

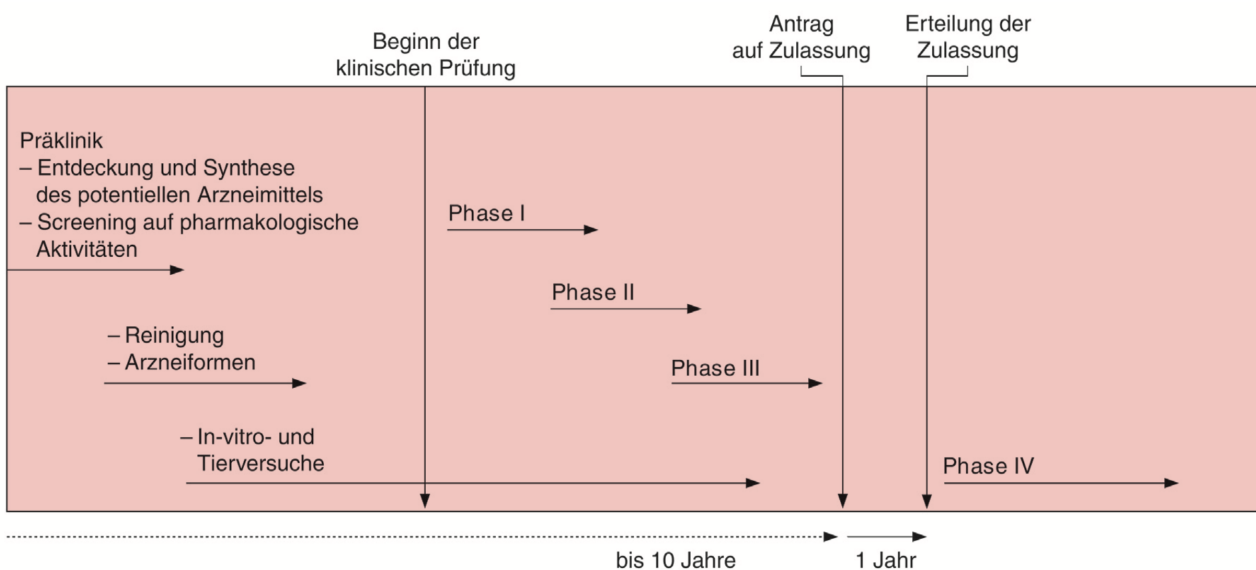


Abbildung 9: Phasen der Arzneimittelentwicklung (64)

Die Arzneimittelentwicklung lässt sich in den präklinischen Abschnitt und die klinische Prüfung unterteilen. Die Präklinik schließt die Entdeckung und Erforschung des Wirkstoffes *in vitro* und in Tierversuchen ein, während die klinische Prüfung an Proband*innen durchgeführt wird. In Phase I handelt es sich um gesunde und in Phase II um erkrankte Proband*innen. Phase III soll den Nachweis erbringen, dass der Wirkstoff einen therapeutischen Nutzen aufweist, bevor es zur Zulassung kommen kann. An die Zulassung schließt sich die Phase IV an, in der eine Langzeitbeobachtung der Sicherheit und möglicher Arzneimittelinteraktionen erfolgt.

Die klinische Prüfung beginnt mit der Phase I, in der das Medikament üblicherweise an einer kleinen Zahl gesunder Proband*innen angewendet wird. Dabei sollen die Verträglichkeit getestet und die präklinischen Erkenntnisse zur Pharmakodynamik und -kinetik auf den Menschen ausgeweitet werden. In Phase II wird der Wirkstoff an einer kleinen, homogenen Patientenpopulation mit therapeutischer Intention eingesetzt. Dabei soll die prinzipielle Wirksamkeit bei einer definierten Indikation erfasst werden. Darüber hinaus sollen die Dosierung und die Sicherheit des Medikamentes genauer untersucht werden. Phase III schließt eine größere Anzahl von Patient*innen ein, an denen der therapeutische Nutzen der Substanz bei der entsprechenden Indikation nachgewiesen werden soll. Klassischerweise werden dazu multizentrische, randomisierte, kontrollierte Doppelblindstudien genutzt. Nach einem erfolgreichen Zulassungsprozess des Arzneimittels beginnt die Phase IV. Hierbei handelt es sich um die Beobachtung der zugelassenen Medikamentenanwendung im

Zusammenhang mit der Langzeitsicherheit sowie der Interaktion mit anderen Arzneimitteln (64).

1.5.2 Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen

In der präklinischen Medikamentenentwicklung müssen Daten zu Hauptwirkung, Nebenwirkungen und Toxizität der Substanzen erhoben werden. Um diese in Form von Dosis-Wirkungs-Beziehungen mathematisch zu beschreiben, kann die Hillfunktion (Formel 4) genutzt werden (66). Das mathematische Modell wurde 1910 durch Archibald Vivian Hill eingeführt (Formel 1), um die Hämoglobinsättigung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in verschiedenen Salzlösungen darzustellen. Die Formel ergab eine gute mathematische Annäherung an die Messergebnisse, die von Barcroft und Camis erhoben wurden. Gleichzeitig war die Formel mit ihren zwei Konstanten (K und α) leicht anwendbar und erforderte weniger Rechenarbeit als alternative mathematische Modelle (67, 68). Wird der Faktor 100 aus der originalen Hillfunktion durch die Variable y_{\max} ersetzt und die Variable K durch $c = K^{-1/\alpha}$ entsteht eine allgemeinere Darstellung der Hillformel mit drei Konstanten (α , c und y_{\max}) (Formel 2). Um Dosis-Wirkungs-Beziehungen darzustellen, lassen sich die Variablen dieser allgemeinen Hillfunktion für die Verwendung in der Pharmakologie anpassen (Formel 3). Die Variable y wird zum beobachteten Effekt eines Pharmakons (E), die Variable y_{\max} zum maximalen Effekt (E_{\max}). Der unabhängigen Variable x wird die Wirkstoffkonzentration bzw. -dosis (C) zugeordnet. Die ursprüngliche Variable c wird durch die halbmaximale Konzentration bzw. Dosis (EC_{50}) ersetzt. Die Konstante α wird als Hill-Exponent bezeichnet. Bei der Analyse von pharmakologischen Effekten sollte eine zusätzliche Variable in die Hillfunktion eingefügt werden. Dabei handelt es sich um den messbaren Effekt in Abwesenheit des Wirkstoffes (E_0). Als Resultat entsteht eine Hillfunktion mit insgesamt vier Konstanten (E_0 , E_{\max} , EC_{50} und α) (Formel 4) (68).

$$(1) \quad y_1 = 100 \frac{Kx^\alpha}{1 + Kx^\alpha}$$

y_1 = Hämoglobinsättigung in %
 x = Sauerstoffpartialdruck in mmHg
 α und K : Konstanten der Funktion

$$(2) \quad y = \frac{y_{\max}x^\alpha}{c^\alpha + x^\alpha}$$

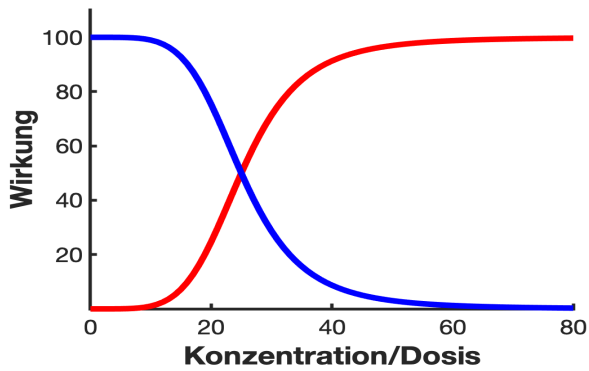
y = abhängige Variable
 x = unabhängige Variable
 α , c und y_{\max} : Konstanten der Funktion

$$(3) \quad E = \frac{E_{\max}C^\alpha}{EC_{50}^\alpha + C^\alpha}$$

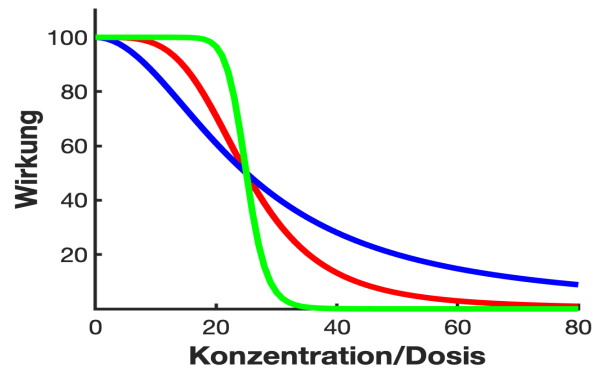
E = Effekt des Wirkstoffes
 C = Konzentration bzw. Dosis
 E_{\max} = maximaler Effekt
 EC_{50} = halbmaximale Konzentration bzw. Dosis
 α = Hill-Exponent

$$(4) \quad E = E_0 + \frac{E_{\max}C^\alpha}{EC_{50}^\alpha + C^\alpha}$$

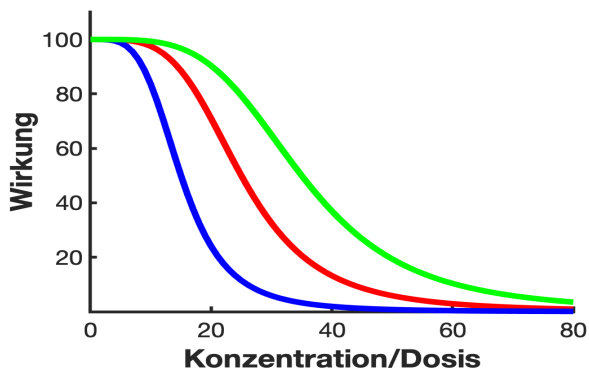
E = Effekt des Wirkstoffes
 E_0 = Effekt ohne Stoffeinfluss
 C = Konzentration bzw. Dosis
 E_{\max} = maximaler Effekt
 EC_{50} = halbmaximale Konzentration bzw. Dosis
 α = Hill-Exponent



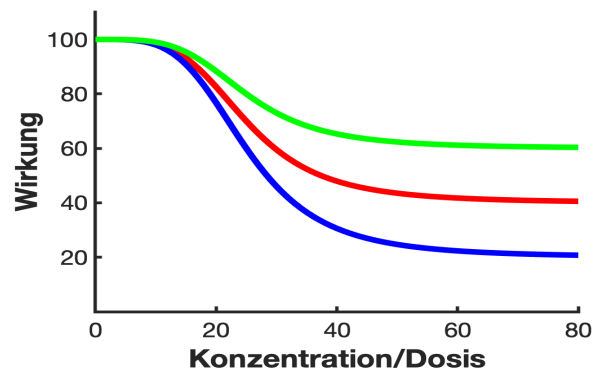
(a) Vorzeichenänderung des Hill-Exponenten α



(b) Betragsänderung des Hill-Exponenten α



(c) Änderung der halbmaximalen Konzentration EC_{50}



(d) Änderung des maximalen Effektes E_{max}

Abbildung 10:

Einfluss der Variablen α , EC_{50} und E_{max} auf die Kurve der Hillfunktion

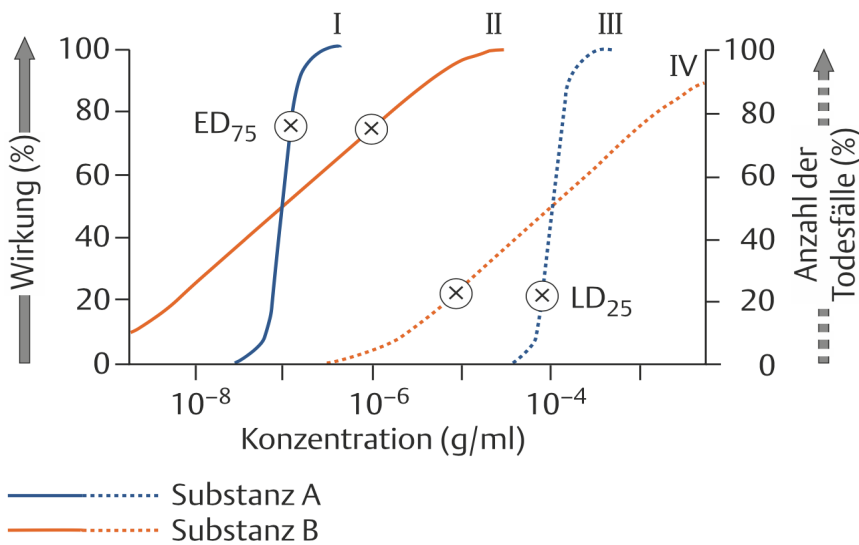
(a) eigene Darstellung, (b)-(d) modifiziert nach (66)

(a) Die aufsteigende Kurve (rot) wird durch die Vorzeichenänderung des Hill-Exponenten (α) zu der absteigenden Kurve (blau) **(b)** Die Steilheit der Kurve ist abhängig vom Betrag des Hill-Exponenten (α) **(c)** Eine Änderung der halbmaximalen Konzentration (EC_{50}) führt zu einer Rechts- bzw. Linksverschiebung der Kurve **(d)** Die Asymptote, an die sich die Kurve annähert, wird durch den maximal erreichbaren Effekt (E_{max}) bestimmt

Die Hillfunktion weist vier Konstanten auf, die Einfluss auf die Form der kontinuierlich ansteigenden, sigmoidalen Kurve haben. Dem Hill-Exponenten (α) kommt hierbei eine doppelte Bedeutung zu. Durch einen Vorzeichenwechsel des Hill-Exponenten (α) lässt sich ein kontinuierlich sinkender, sigmoidaler Kurvenverlauf erreichen (Abbildung 10a) (68). Außerdem steuert der Hill-Exponent (α) mit seinem Betrag die Steilheit der Kurve, wobei die Steilheit mit dem Betrag zunimmt (Abbildung 10b). Bei der zweiten Konstanten handelt es sich um das Ausgangsniveau (E_0), welches durch Messung einer unbehandelten Kontrolle erhoben werden kann. In Abbildung 10b bis 10d schneiden alle Kurven die y-Achse bei 100, was somit E_0 entspricht. Die dritte Konstante ist die 50%ige Effektivkonzentration (EC_{50}), bei der ein Wirkstoff seine halbmaximale Wirkung entfaltet. Bei steigender EC_{50} kommt es zur Rechtsverschiebung der Kurve, bei sinkender EC_{50} wird die Kurve nach links verschoben (Abbildung 10c). Die vierte Konstante ist das Wirkmaximum E_{max} . Es definiert den Wert, auf welchen die Kurve in hohen Dosisbereichen zuläuft (Abbildung 10d) (66).

Aus Dosis-Wirkungs-Kurven lassen sich verschiedene Informationen gewinnen. Die Potenz eines Medikamentes lässt sich auf zellulärer Ebene mit der 50%ig effektiven Konzentration (EC_{50}) beschreiben (69). Je geringer diese ist, desto höher ist die Potenz des Wirkstoffes. Für hemmende Wirkstoffe

kann zur Quantifizierung der Potenz die 50%ig inhibitorische Konzentration (IC_{50}) herangezogen werden (70). Bei der Untersuchung der Toxizität kann die Konzentration beschrieben werden, bei der die Hälfte der Zellen stirbt (LD_{50}) (71).



(a) Dosis-Wirkungs-Kurven und Dosis-Letalitäts-Kurven

Substanz	$\frac{LD_{50}}{ED_{50}}$	$\frac{LD_{25}}{ED_{75}}$	$\frac{LD_{10}}{ED_{90}}$
A ———	1000	≈ 500	≈ 250
B ———	1000	≈ 10	≈ 0,25

(b) Therapeutische Indices

Abbildung 11:

Dosis-Wirkungs-Beziehung und therapeutischer Index der Wirkstoffe A und B im Vergleich (72)

$ED_{50/75}$: 50%ige bzw. 75%ige Effektivdosis, $LD_{50/25}$: 50%ig bzw. 25%ig letale Dosis

(a) Die Dosis-Wirkungs-Kurve (Linie) und die Dosis-Letalitäts-Kurve (gestrichelte Linie) der Substanz A verlaufen deutlich steiler als die Kurven der Substanz B. Gleichzeitig weisen beide Substanzen die selbe ED_{50} und LD_{50} auf (Schnittpunkte der Kurven)

(b) Der therapeutische Index einer Substanz variiert mit der Art der Effektivdosis und letalen Dosis, die zur Berechnung herangezogen werden. Der Quotient LD_{50} / ED_{50} ergibt für die Substanzen A und B den selben therapeutischen Index von 1000. Im Gegensatz dazu beträgt der therapeutische Index aus dem Quotienten LD_{25} / ED_{75} für Substanz A 500 und für Substanz B 10.

Die therapeutische Breite ist eine weitere Größe, die aus Dosis-Wirkungs-Kurven entnommen werden kann. Sie beschreibt den Dosisabstand zwischen der gewünschten Arzneimittelwirkung und der toxischen Wirkung eines Medikaments. Anhand von Abbildung 11a lassen sich die Prinzipien der therapeutischen Breite gut veranschaulichen. Kurve I stellt die Dosis-Wirkungs-Kurve von Substanz A dar und Kurve III dessen Dosis-Letalitäts-Kurve. Die Kurven verlaufen nahezu senkrecht sowie parallel zueinander. Folglich entsteht zwischen ihnen ein Dosisbereich, der von keiner der Kurven durchkreuzt wird. Dieser Dosisbereich entspricht der therapeutischen Breite der Substanz A.

Etwas komplizierter gestaltet sich die Charakterisierung der therapeutischen Breite von Substanz B. Die Kurven II und IV sind zwar ebenfalls parallel verschoben, da sie allerdings eine flache Steigung

aufweisen, setzt die Toxizität bereits ein, bevor die Wirkung ihr Maximum erreicht. Konkret bedeutet dies, dass sich die maximale Wirkung der Substanz B nur erreichen lässt, wenn dafür der toxisch bedingte Tod eines behandelten Anteils in Kauf genommen wird.

Substanz B besitzt also eine geringere therapeutische Breite als Substanz A, obwohl beide Substanzen die selbe 50%ige Effektivdosis (ED_{50}) bzw. 50%ig letale Dosis (LD_{50}) aufweisen (Kurven I und II sowie Kurven III und IV schneiden sich jeweils bei 50%). Der entscheidende Unterschied liegt also in der Steigung der Kurven. Während bei Substanz A die Steigerung der Dosis eine kräftige Wirkungssteigerung zur Folge hat (steile Kurve), wird bei Substanz B die Wirkung in geringerem Maße gesteigert (flache Kurve).

Um die therapeutische Breite zu quantifizieren, lässt sich der therapeutische Index nutzen. Er wird aus dem Quotienten eines Punktes der Dosis-Letalitäts-Kurve und eines Punktes der Dosis-Wirkungs-Kurve gebildet. Wählt man für die Substanzen A und B jeweils die LD_{50} und ED_{50} zur Berechnung des therapeutischen Index erhält man die selbe Zahl (Abbildung 11b). Wie oben bereits beschrieben, liegt der Grund darin, dass die LD_{50} und ED_{50} beider Substanzen identisch sind und keinerlei Aussage über die Steigung der Kurven zulassen.

Um der Kurvensteigung beim therapeutischen Index gerecht zu werden, müssen also andere Punkte auf den Kurven gewählt und miteinander ins Verhältnis gesetzt werden. Je weiter die gewählten Punkte von der LD_{50} bzw. ED_{50} entfernt sind, desto genauer wird die Steigung im therapeutischen Index abgebildet. Gleichzeitig steigt zu den Randbereichen der Kurven hin jedoch die experimentelle Unsicherheit der gemessenen Werte. Daher sollten die gewählten Punkte einen Kompromiss zwischen der Berücksichtigung der Kurvensteigung und der Messsicherheit darstellen. Deswegen ist in Abbildung 11b die LD_{25} und die ED_{75} gewählt, um die therapeutischen Indices von Substanz A und B zu vergleichen. Substanz A hat dabei mit 500 einen deutlich höheren therapeutischen Index als Substanz B mit 10 und damit auch die größere therapeutische Breite (72).

Insgesamt bieten Hillfunktionen und ihre sigmoidalen Kurven also gute Möglichkeiten die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Pharmaka *in vivo* und *in vitro* zu charakterisieren.

1.6 Fragestellung

Diese Arbeit steht im Kontext eines potentiellen Einsatzes des glykosidierten Phospholipids Inositol-C2-PAF als topisches Therapeutikum der Psoriasis. Zur Behandlung dieser chronisch entzündlichen Hauterkrankung stehen bereits topische und systemische Medikamente zur Verfügung. Inositol-C2-PAF könnte diese sinnvoll ergänzen, zumal sich die systemischen Medikamente durch eine kumulative Toxizität (z.B. MTX) oder hohe Kosten (Biologika) auszeichnen. Inositol-C2-PAF zeigt *in vitro* differenzierungsfördernde, antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften bei der Behandlung von immortalisierten Keratinozyten. Auch *in vivo* konnte die Wirksamkeit von Inositol-C2-PAF an zwei komplementären Psoriasis-Mausmodellen gezeigt werden.

In dieser Arbeit soll der Einfluss des Wirkstoffs auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten verschiedener Spender bestimmt werden. Dabei sollen konzentrationsabhängige Effekte auf die metabolische Aktivität und die Zellzahl beider Zelltypen über die Zeit erfasst werden. Zur Auswertung der Datenreihen wird die Hillfunktion als mathematisches Modell von Dosis-Wirkungs-Beziehungen herangezogen.

Darüber hinaus soll in dieser Arbeit der Einfluss des Wirkstoffs auf die Differenzierung humaner Keratinozyten charakterisiert werden. Hierfür wird das in der β -Testung befindliche 3D-Kokultur-Modell aus primären Keratinozyten und Fibroblasten der Firma InSphero herangezogen. 3D-Kokulturen bieten gegenüber 2D-Kulturen den Vorteil, der *in vivo*-Situation besonders nahe zu kommen. In diesem Rahmen soll auch untersucht werden, ob Effekten von $\text{TNF}\alpha$, einem zentralen Zytokin in der Pathogenese der Psoriasis, durch Inositol-C2-PAF entgegengewirkt werden kann. Von besonderem Interesse dabei sind mit Keratin 1 und Filaggrin zwei terminale Differenzierungsmarker von Keratinozyten, die bei der Psoriasis vermindert exprimiert werden.

Dementsprechend lassen sich folgende Fragestellungen formulieren:

- 1) Wie beeinflusst Inositol-C2-PAF die metabolische Aktivität und den Proteingehalt primärer humaner Hautzellen?
- 2) Ist das 3D-Kokultur-Modell von der Firma InSphero geeignet, um präklinische Untersuchungen in der Arzneimittelentwicklung durchzuführen?
- 3) Welchen Effekt haben $\text{TNF}\alpha$ und Inositol-C2-PAF auf die Keratinozytendifferenzierung im 3D-Kokultur-Modell?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller	Sitz des Herstellers
Absaugsystem Vacusafe & Vacuboy	Integra Biosciences	Zizers, CH
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Airstream Class II Biological Safety Cabinet AC2-4E1	Esco Lifesciences	Friedberg, D
Inkubationsbad Typ 1004	GFL	Burgwedel, D
Präzisionswaage Adventurer Analytical AR2140	Ohaus	Parsippany, NJ, USA
Digital-pH-Meter 646	Knick	Berlin, D
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, D
Lichtmikroskop Diavert	Leica	Wetzlar, D
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss	Oberkochen, D
AxioCam b/w 412-311	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Fluoreszenzkontrollgerät Colibri Controller	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Vortex-Mixer Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY , USA
Absorbance Microplate Reader Sunrise	Tecan	Männedorf, CH
Pinzetten	Megro	Solingen, D
Scheren	Megro	Solingen, D
Rotationsschüttler Stuart Gyro-Rocker SSL3	Cole-Parmer	Wertheim, D
Rotationsschüttler Typ 3005	GFL	Burgwedel, D
Gitternetz	Heizung & Sanitär Eichelkraut	Teltow, D
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	Lauda Königshofen, D
Inkubator 6000 (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus	Hanau, D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Zentrifuge 1K15	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Micro-Zentrifuge Tomy Capsulefuge PMC-060	Tomy Kogyo	Tokio, J

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Sitz des Herstellers
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic	Chicago, IL, USA
Spritzen	Braun	Melsungen, D
Kanülen	Braun	Melsungen, D
Sterilfilter (20µm)	Sarstedt	Nümbrecht, D
Nunc Kryoröhrchen (1ml)	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Falcon Cell Strainer (70µm)	Corning	Corning, NY , USA
Falcon Cell Culture Dishes (100x20mm, 60x15mm)	Corning	Corning, NY , USA
Falcon Conical Tubes (15ml, 50ml)	Corning	Corning, NY , USA
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Sarstedt	Nümbrecht, D
Falcon Tissue Culture Treated Flasks (75cm ² , 25cm ²)	Corning	Corning, NY , USA
Falcon 96-Well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate	Corning	Corning, NY , USA
GravityTRAP 96-Well-Platte	InSphero	Schlieren, CH
ImmunoPen	Merck	Darmstadt, D
Deckgläser	Menzel	Braunschweig, D
Pipettenspitzen (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 300µl, 1000µl)	Sarstedt	Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (200µl, 5000µl)	Eppendorf	Hamburg, D

2.2 Chemikalien, Lösungen, Medien und Antikörper

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Sitz des Herstellers
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Ziegenserum	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Calcium-Chlorid	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
RPMI-1640	Lonza Bioscience	Basel, CH
Fluoromount	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Skin Reaktivierung Medium	InSphero	Schlieren, CH
FibroLife	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Transferrin	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
TGF- α	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Epinephrin	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Insulin	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Hydrocortisol	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Extract P	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
L-Glutamin	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
2,5% Trypsin in PBS	Biowest	Nuaille, FRA
Kollagen A (1 mg/ml)	Biochrom	Berlin, D
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Dispase-II	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Kollagenase-Pulver	Biochrom	Berlin, D
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäure	Merck	Darmstadt, D
Salzsäure (HCl)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Isopropanol	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Agarose	Lonza	Basel, CH
TNF α	ImmunoTools	Friesoythe, D
Rotihistol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Tween20	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Inositol-C2-PAF	Synthese von Vadim Shmanai (Minsk, BLR) nach dem Protokoll von Fischer et al. 2006 (35)	

Fortsetzung Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Sitz des Herstellers
Gibco Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)	Corning	Corning, NY, USA
Bisbenzimid Trihydrochlorid (H33342)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ HPO ₄)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe, D
DermaLife K Complete Medium	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, D
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid (MTT)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D

Tabelle 4: Lösungen

Kollagenbeschichtung	0,002% Kollagen-A in Aqua dest
Dispase-II-Lösung	0,5% Dispase-II in RPMI-1640 + 1% 100x P/S + 1% 10x L-Glutamin
Kollagenase-Lösung	0,1% Kollagenase in RPMI-1640
PBS-EDTA	1,7 mM EDTA in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung	0,25% Trypsin, 2,21 mM EDTA, 1x Natriumbicarbonat
Sulforhodamin B-Lösungen	Keratinocyten: 0,057% SRB in 1% Essigsäure Fibroblasten: 0,5% SRB in 1% Essigsäure
MTT-Lösung	12 mM MTT in PBS
Triton-X-100-Lösungen	Permeabilisierung histologischer Schnitte: 0,1% Triton-X-100 in PBS Zelllyse: 4% Triton-X-100 in PBS
Saure Isopropanol-Lösung	5% 1M Salzsäure in Isopropanol
PFA-Lösung	4% PFA in PBS
Agarose-Lösung	2% Agarose in PBS
10x PBS (pH7,8)	1,4 M NaCl + 110 mM Na ₂ HPO ₄ + 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ in Aqua dest. Titration mit HCl auf pH7,8
Natrium-Citrat-Lösung (pH6)	10 mM Tri-Natriumcitrat Dihydrat in Aqua dest. + 0,05% Tween20 Titration mit HCl auf pH6
Tween20-Lösungen	0,1% Tween20 in PBS Lösung von Sekundärantikörpern/H33342: 0,05% Tween20 in PBS
Ziegenserum-Lösung	10% Ziegenserum in 0,1%-Tween20-Lösung
BSA-Lösung	3% BSA in PBS
FCS-DMSO-Lösung	10% DMSO in FCS

Tabelle 5: Medien

Transportmedium	500ml RPMI-1640 + 10% FCS + 1% 100x P/S + 1% 10x L-Glutamin
Isolationsmedium	500ml RPMI-1640 + 1% 100x P/S + 1% 10x L-Glutamin
Keratinocyten-Kulturmedium	500ml DermaLife K Complete Medium + 1% 100x P/S + 5µg/ml Transferrin + 0,5ng/ml TGF-α + 1µM Adrenalin + 5µg/ml Insulin + 100ng/ml Hydrocortisol + 0,4% Extract P + 6mM L-Glutamin + 0,14mM Calcium-Chlorid
Fibroblasten-Kulturmedium	500ml DMEM + 10% FCS + 1% 100x P/S + 1% 10x L-Glutamin
Fibroblasten-Assaymedium	FibroLife
3D-Kokultur-Medium	Skin-Reaktivations-Medium

Tabelle 6: Primärantikörper

Antigen	Wirt	Hersteller	Sitz des Herstellers
S100A4	Rabbit	Acris	Herford, D
Pan-Cytokeratin (AE1/AE3)	Mouse	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Keratin 1	Rabbit	Covance / HISS	Princeton, NJ, USA
Filaggrin	Mouse	Santa Cruz	Dallas, TX, USA

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Sitz des Herstellers
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA

2.3 Kultivierung primärer Zellen

Kultur von Zellen

Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Primäre Keratinozyten wurden dafür auf Kollagen-A-beschichteten Flaschen ausgesät. Als Kulturmedium diente DermaLife + 0,14 mM Ca²⁺.

Für die Kultivierung primärer Fibroblasten war keine Beschichtung der Kulturflaschen notwendig. Als Kulturmedium wurde DMEM + 10% FCS genutzt. Der Mediumwechsel erfolgte sowohl für Fibroblasten als auch für Keratinozyten alle 2-3 Tage. Dafür wurden die Zellen stets mit PBS gewaschen. Bei einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Kulturen gesplittet. Das Ablösen der Zellen erfolgte mittels fünfminütiger Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Falcon-Gefäß überführt und für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes blieb ein Zellpellet zurück, welches im entsprechenden Medium resuspendiert wurde. Die Suspension wurde entweder zur Durchführung von Experimenten, für die Erhaltungskultur oder zur Kryokonservierung verwendet.

Zählen von Zellen

Die Zellzahlermittlung in Zellsuspensionen erfolgte mittels Trypan-Blau-Färbung und Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 mit Trypan-Blau-Lösung verdünnt. Die lebenden Zellen in den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt. Aus den ermittelten Werten der Quadranten wurde das arithmetische Mittel gebildet und mit der Formel 5 die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnet.

$$(5) \quad \text{Lebende Zellen / ml Suspension} = \text{Mittelwert der Quadranten} \cdot 5 \cdot 10^4$$

Einfrieren von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die kultivierten Zellen zunächst mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend für 7 Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Gefäß überführt und für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in FCS-DMSO-Lösung resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden in Isopropanol gelagert und bei -80 °C eingefroren.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen bei ca. 37 °C erwärmt. Die aufgetaute DMSO-haltige Zellsuspension wurde in einem Falcon-Gefäß mit ebenfalls ca. 37 °C warmem Medium verdünnt. Es folgte die Zentrifugation für 3 Minuten bei 900 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung wurde die gewünschte Zellzahl in Kulturflaschen überführt.

Kollagenbeschichtung

Die Kulturflaschen und 96-Well-Platten der Keratinozyten wurden mit einer 0,002%igen Kollagen-A-Lösung in Aqua dest. über Nacht bei 4 °C beschichtet. Vor Gebrauch wurden sie mit PBS gewaschen.

2.4 Präparation primärer Zellen

Zur Präparation von primären Fibroblasten und primären Keratinozyten dienten Präputien von Zirkumzisionen aus medizinischer Indikation. Ein positives Ethikvotum lag vor (Antragsnummer EA1/192/15). Vor der Präparation wurden die Präputien für 30 Sekunden mit 80%igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit PBS gespült. Die ringförmigen Gewebe wurden aufgeschnitten und die Subkutis von der Dermis und Epidermis mit Schere und Pinzette abgetrennt und verworfen. Das verbliebene Gewebe aus Dermis und Epidermis wurde auf ein Gitternetz aufgespannt und in Dispase-II-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Epidermis mit der Pinzette vorsichtig von der Dermis abgezogen, in kleine Stücke von ca. 5mm² Größe zerteilt und in Trypsin-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Mit der Entstehung einer gräulichen Schattierung der Epidermisstücke wurde der Trypsinverdau mit serumfreiem RPMI-Medium gestoppt. Die Epidermisstücke wurden einzeln auf einen Cellstrainer transferiert, der sich über der Öffnung eines Falcon-Gefäßes befand. Anschließend wurden sie mit einem Spritzenstempel vorsichtig auf dem Cellstrainer zerdrückt und wiederholt mit serumfreiem RPMI-Medium umspült, wodurch die Keratinozyten in das Falcon-Gefäß gelangten. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Keratinozyten-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und anschließend in einer Dichte von $2,6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ in Kollagen-A-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Isolierung der Fibroblasten erfolgte aus der Dermis, die nach dem Abziehen der Epidermis zurückblieb. Die Dermis wurde ebenfalls in kleine Stücke von ca. 5mm² Größe zerschnitten. Die Stücke wurden in Kollagenase-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend in serumfreiem RPMI-Medium mit Hilfe des Cellstrainers von den Geweberesten abgetrennt. Die Zellen wurden bei 1.200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in DMEM + 10% FCS resuspendiert. Ohne vorherige Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in eine unbeschichtete Kulturflasche (75cm²) überführt.

2.5 Kultivierung der InSphero-3D-Kokultur-Modelle

Die sphärischen 3D-Kokulturen aus primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten wurden von der Firma InSphero bezogen. Gemäß den Angaben der Firma wurden die GravityTRAP-96-Well-Platten erst bei 250g für 2 Minuten zentrifugiert und dann ihre Plastikfolien entfernt. Noch am selben Tag wurden den Herstellerangaben folgend aus den Wells 70-75 µl Überstand durch Skin-Reaktivations-Medium ersetzt. Am Folgetag wurden 75 µl Überstand durch Medium ohne Zusätze (Kontrolle), Medium mit 1,25 µM Inositol-C2-PAF, Medium mit 1 ng/ml TNFα sowie Medium mit Inositol-C2-PAF und TNFα in Kombination ersetzt. Am vierten Tag wurde diese Behandlung wiederholt. Alle Kokulturen wurden zu allen Zeitpunkten, an denen nicht mit ihnen gearbeitet wurde, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Gewebe wurden zur Beendigung des Experimentes am fünften Tag für 60 Minuten mit 4% PFA in PBS fixiert. Die fixierten Gewebe wurden in einem Reaktionsgefäß in ca. 37°C warmer 2%iger Agarose in Aqua dest. eingebettet und kurz zentrifugiert. Die in Agarose eingebetteten Gewebe wurden paraffiniert, geschnitten und für Hämatoxylin-Eosin- sowie verschiedene Immunfluoreszenzanalysen weiter verwendet.

2.6 Methoden zur Bestimmung der Viabilität und Proteinmasse

2.6.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay basiert auf 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid (MTT), das durch den mitochondrialen Stoffwechsel metabolisiert wird. Zellkulturen werden mit MTT-Salz inkubiert, welches intrazellulär zu Formazan reduziert wird. Anschließend werden die Zellen lysiert und das Formazan aufgelöst. Von der entstehenden homogenen Lösung wird die optische Dichte bestimmt (73). Somit kann im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle auf die Zellviabilität geschlossen werden (74).

Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die untersuchten Zellen in der entsprechenden Konzentration in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl der Fibroblasten betrug dabei $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Well. Als Medium wurde FibroLife verwendet. Die Keratinozyten wurden mit einer Zellzahl von $1,68 \times 10^4$ pro Well ausgesät, wobei die Wells vorher mit Kollagen-A beschichtet wurden. Als Medium wurde für primäre Keratinozyten DermaLife + $0,14 \text{ mM Ca}^{2+}$ genutzt.

Nach der Adhärenz der Zellen erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS sowie ein Mediumwechsel und die Inkubation der Kulturen bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ über Nacht. Am nachfolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den angegebenen Konzentrationen Inositol-C2-PAF behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 Stunden wurde der Überstand mit $10 \mu\text{L } 12\text{mM MTT}$ -Lösung versetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Einige Wells mit unbehandelten Zellen wurden mit $4\% \text{ Triton-X-100}$ in PBS für 20 Minuten lysiert. Die lysierten Zellen stellten die Negativkontrolle für 100% tote Zellen dar. Nach der vierstündigen Inkubation mit MTT wurde der komplette Überstand abgesaugt und die Zellen mit $100 \mu\text{L}$ saurem Isopropanol behandelt. Lichtgeschützt wurden die 96-Well Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Wippe gelagert. Schließlich erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 570nm .

2.6.2 SRB-Assay

Beim SRB-Assay wird die Eigenschaft des Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) genutzt, pH-abhängig Proteine von TCA-fixierten Zellen zu binden. Unter sauren Bedingungen wird SRB an basische Aminosäuren gebunden während es im basischen Milieu wieder dissoziiert. Die Färbung erfolgt durch Zugabe von Farbstoff, der in Trichloressigsäure (TCA) gelöst ist. Um den gebundenen Farbstoff wieder zu lösen und die optische Dichte der Lösung auszuwerten, wird die Base TRIS verwendet. Der gebundene Farbstoff ist dabei direkt proportional zur Zellmasse. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei 564 nm . Um einen linearen Zusammenhang bei der Messung zu gewährleisten, wird jedoch ein Wellenlängenbereich von 490 bis 530 nm empfohlen (75).

Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die untersuchten Zellen in der entsprechenden Konzentration in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl der Fibroblasten betrug dabei $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Well. Als Medium wurde FibroLife verwendet. Die Keratinozyten wurden mit einer Zellzahl von $1,68 \times 10^4$ pro Well ausgesät, wobei die Wells vorher mit Kollagen-A beschichtet wurden. Als Medium wurde für primäre Keratinozyten DermaLife + $0,14 \text{ mM Ca}^{2+}$ genutzt.

Nach der Adhärenz der Zellen erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS sowie ein Mediumwechsel und die Inkubation der Kulturen bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht. Am nachfolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den angegebenen Konzentrationen Inositol-C2-PAF behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 Stunden wurden die Zellen mit 5% TCA für eine Stunde bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die fixierten Zellen wurden mit 100µl SRB in 1%iger Essigsäure für 30 Minuten wippend bei Raumtemperatur gefärbt. Die SRB-Konzentration wurde für den jeweiligen Zelltyp optimiert und betrug bei den Fibroblasten 0,5% und bei den Keratinozyten 0,057%. Im Anschluss wurden die Zellen viermal mit 1%iger Essigsäure gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Mit 200 µl TRIS-Lösung pro Well wurde der Farbstoff über 5 Minuten auf der Wippe bei Raumtemperatur gelöst. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 492nm.

2.7 Histologie und Immunhistochemie

2.7.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünnschnitten

Die fixierten und in Agarose stabilisierten InSphero-3D-Kokulturen wurden am Institut für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe und mit Aceton dehydriert (Tabelle 8). Es folgte die Behandlung mit Xylol und schließlich die Einbettung in Paraffin. Mit dem Mikrotom wurden die gewebehaltigen Paraffinblöcke geschnitten (Schnittdicke 4-5 µm) und auf Objektträger aufgezogen.

Tabelle 8: Paraffineinbettung

Agenzien	Applikationszeit
70% Ethanol	2 Stunden
80% Ethanol	1,5 Stunden
95% Ethanol	1,5 Stunden
95% Ethanol	2 Stunden
100% Ethanol	2 Stunden
100% Ethanol	3 Stunden
Ethanol / Aceton (1:1)	1,5 Stunden
Aceton	1 Stunde
Xylol	2 Stunden
Xylol	2 Stunden
Paraffin	2 Stunden
Paraffin	2 Stunden

2.7.2 Histologische Methoden

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Ebenfalls am Institut für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Gewebsschnitte (Tabelle 9). In einer absteigenden Ethanolreihe wurden die Gewebe dafür zuvor hydriert und anschließend gefärbt.

Tabelle 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Agenzien	Applikationszeit
99,8% Ethanol	10 Minuten
96% Ethanol	1 Minute
70% Ethanol	1 Minute
Hämalaun-Lösung nach Mayer	10 Minuten
Aqua dest.	10 Minuten
0,5% Eosin-Lösung	5 Minuten
96% Ethanol	1 Minute
70% Ethanol	1 Minute

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Gewebsschnitte zunächst entparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanolreihe hydratisiert (Tabelle 10). Für die PanCK-S100A4-Doppelfärbung wurden die Schnitte der Kokulturen mit 0,1% Triton-X-100 in PBS für 10 Minuten permeabilisiert und für 2 Minuten in PBS gewaschen. Bei der Keratin1-Filaggrin-Doppelfärbung war keine Permeabilisierung erforderlich. Es folgte die Antigendemaskierung mittels Natrium-Zitrat-Puffer und die Blockierung, welche bei der PanCK-S100A4-Doppelfärbung mit 3%iger BSA-Lösung und bei der Keratin1-Filaggrin-Doppelfärbung mit 0,1%iger Tween20-Lösung mit 10% Ziegen Serum erfolgte. Die Primärantikörper wurden bei 4 °C, die Sekundärantikörper und Bisbenzimid Trihydrochlorid (H33342) für die Kernfärbung bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 11). Zum Eindecken der Objektträger wurde Fluoromount verwendet.

Tabelle 10: Protokoll zur Entparaffinierung und Immunfluoreszenz

Protokoll	Agenzien	Applikationszeit
Entparaffinieren	Rotihistol	2 x 5 Minuten
Hydratisieren	100% Ethanol	2 x 3 Minuten
	95% Ethanol	1 Minute
	80% Ethanol	1 Minute
	Aqua dest.	1 Minute
Ggf. Permeabilisieren	antikörperabhängig	antikörperabhängig
Antigendemaskierung	Natrium-Zitrat-Puffer 100°C	25 Minuten
	Natrium-Zitrat-Puffer RT	20 Minuten
Waschen	0,1% Tween20 in PBS	2 x 2 Minuten
Blockieren	antikörperabhängig	30 Minuten
Waschen	0,1% Tween20 in PBS	1 Minute
Primärantikörper	antikörperabhängig	über Nacht
Waschen	0,1% Tween20 in PBS	3 x 5 Minuten
Sekundärantikörper / H33342	antikörperabhängig	antikörperabhängig
Waschen	0,1% Tween20 in PBS	3 x 5 Minuten
Trocknen	-	2 Stunden
Eindecken	Fluoromount	-

Tabelle 11: Protokolle der Immunfluoreszenzfärbungen

Färbung	Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper/Farbstoff
PanCK-S100A4	3% BSA in PBS	PanCK-AK(1:150), S100A4-AK(1:150) in 3%iger BSA-Lsg über Nacht bei 4°C	H33342(1:3000), GAR594(1:750), GAM488(1:4000) in 0,05%iger Tween20-Lsg für 2 Stunden bei RT
Keratin1-Filaggrin	10% Ziegense- rum in 0,1%iger Tween20-Lsg	Keratin1-AK(1:500), Filaggrin-AK(1:40) in 0,1% Tween20- Lsg über Nacht bei 4°C	H33342(1:3000), GAM594(1:750), GAR488(1:2000) in 0,05%iger Tween20-Lsg für 1 Stunde bei RT

2.8 Programme, Auswertung und Statistik

Tabelle 12: Programme

Zotero	Literaturverwaltung
MATLAB	Erstellung von Graphiken
AxioVision	Immunfluoreszenzaufnahmen am Inversmikroskop Axiovert 200 mit der Kamera AxioCam b/w 412-311 in Kombination mit dem Fluoreszenzkontrollgerät Colibri
ImageJ	Bearbeitung und Quantifizierung von Immunfluoreszenzen
GIMP	Bildbearbeitung
Microsoft Excel	Datenbank, Statistische Tests, Annäherung von Hillfunktionen an Messdaten mit dem Solver-Add-In durch Modellierung des Hill-Exponenten und der IC ₅₀

Auswertung von SRB- und MTT-Assay

Die Auswertung des MTT- und SRB-Assays erfolgte für jeden Spender einzeln. Von den Messdaten wurde zuerst der Blindwert subtrahiert. Unter Verwendung hoher Wirkstoffkonzentrationen kam es in Einzelfällen zu Messwerten, die unterhalb des Blindwertes lagen. Diese Messwerte wurden in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Aus den technischen Replikaten wurde das arithmetische Mittel gebildet. Anschließend wurden diese Mittelwerte auf den Durchschnittswert der Kontrolle bezogen, um eine prozentuale Skala zu erhalten (Formel 6). An die prozentualen Daten wurde die Hillfunktion $f(C)$ angenähert (Formel 7). Das Minimum (Min) wurde dabei auf 0% und das Maximum (Max) auf 100% gesetzt. Die jeweilige Konzentration (C) war durch die experimentell eingesetzte Wirkstoffkonzentration vorgegeben. Der Hill-Exponent (H) und die halbmaximal inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurden durch das Excel-Solver-Add-Inn modelliert, um die bestmögliche Annäherung der Hillfunktion an die Messdaten zu erreichen.

$$(6) \quad \% \text{ der Kontrolle} = \left(\frac{OD_C}{OD_{\text{Kontrolle}}} \right) \cdot 100 \quad (7) \quad f(C) = \text{Max} + \frac{(\text{Min} - \text{Max}) \cdot C^H}{C^H + IC_{50}^H}$$

OD = Optische Dichte

C = Konzentration

Max = Maximum (100%)

Min = Minimum (0%)

C = Konzentration

H = Hill-Exponent

IC₅₀ = halbmaximal inhibitorische Konzentration

Auswertung der Immunfluoreszenz

Die Schnitte der InSphero-3D-Kokulturen wurden nach ihrer Immunfluoreszenzfärbung entsprechend der in den Tabellen 13 und 14 dargestellten Bedingungen am Inversmikroskop Axiovert 200 mit der Kamera AxioCam b/w 412-311 in Kombination mit dem Fluoreszenzkontrollgerät Colibri aufgenommen.

Tabelle 13: Immunfluoreszenzaufnahme der PanCK-S100A4-Doppelfärbung

Antikörper/Farbstoff	Optovar/Objektiv	Filter	Belichtungszeit
PanCK	1x / 40x	grün	300 ms
S100A4	1x / 40x	rot	300 ms
H33342	1x / 40x	blau	300 ms

Tabelle 14: Immunfluoreszenzaufnahme der Keratin1-Filaggrin-Doppelfärbung

Antikörper/Farbstoff	Optovar/Objektiv	Filter	Belichtungszeit
Keratin1	1,6x / 63x	grün	300 ms
Filaggrin	1,6x / 63x	rot	1.000 ms
H33342	1,6x / 63x	blau	300 ms

Es folgte die einheitliche Nachbearbeitung der Graustufendarstellung in den Bildern eines Kanals der selben Färbung, um das Signal bestmöglich darzustellen. In den so visualisierten Geweben wurden anhand der Fluoreszenzmuster verschiedene Bereiche der Gewebe, wie das bindegewebige Zentrum, die basale Schicht und die äußere Schicht der Keratinozyten, aber auch die gesamte Epidermis identifiziert. In den jeweiligen Bereichen wurde die Fluoreszenzintensität relativ zur Fläche bestimmt (Mean Grey Value). Da die vorherige Bearbeitung der Graustufendarstellung keinen Einfluss auf die Rohdaten der Bilder hat, war die Intensitätsbestimmung davon unabhängig. Zur Auswertung wurde, sofern möglich, für jedes Gewebe das arithmetische Mittel aus 2 verschiedenen Bildausschnitten herangezogen. Anschließend wurde der Mittelwert aus allen Geweben gebildet. Die Zählung der mit H33342 gefärbten Zellkerne erfolgte an der Kontrolle der PanCK-S100A4-Doppelfärbung (Optovar: 1x, Objektiv: 10x, Filter: blau, Belichtungszeit: 600 ms). Die Kerne in der Basal- und Außenschicht der Epidermis wurden gezählt und für jedes Gewebe die Kernzahl pro 1.000 Pixeln berechnet. Aus den so erhaltenen Kerndichten wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Statistik

Für jeden Spender wurde zu jedem Zeitpunkt eine individuelle IC_{50} durch die Annäherung einer Hillfunktion an die Messdaten des MTT- und des SRB-Assays errechnet. Diese Werte wurden für die weitere statistische Auswertung genutzt, wobei ein zweiseitiger T-Test für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz verwendet wurde. Für die Quantifizierung von Immunfluoreszenzen wurden die durchschnittliche Signaldichte jedes Gewebes bestimmt und für die statistische Auswertung ebenfalls ein zweiseitiger T-Test für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz angewandt. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit primärer Zellen waren die Stichprobengrößen vergleichsweise klein. Aus diesem Grund wurde auf eine Testung auf Normalverteilung und eine Korrektur für multiples Testen im Zusammenhang mit den verwendeten T-Tests verzichtet. Nichtparametrische Tests wie der Mann-Whitney-U-Test stellten bei der vorhandenen Stichprobengröße kein gutes alternatives Testverfahren dar. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Symbol * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), wobei die Ergebnisse aufgrund der verhältnismäßig kleinen Stichprobengrößen grundsätzlich als explorativ anzusehen sind. Die statistische Analyse erfolgte in Korrespondenz mit dem Institut für Biometrie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität in der 2D-Monokultur

Im Rahmen der präklinischen Erforschung von Inositol-C2-PAF sollte der Einfluss des Wirkstoffes auf die metabolische Aktivität von primären Zellen der Haut untersucht werden. Grund dafür waren die *in vitro* und *in vivo* identifizierten Eigenschaften des Wirkstoffes, die potentiell Anwendung in der topischen Therapie der Psoriasis finden könnten. In den Untersuchungen der metabolischen Aktivität primärer Hautzellen sollte mit dem MTT-Assay die Konzentration ermittelt werden, bei der eine Abnahme der Aktivität um 50% gegenüber der unbehandelten Kontrolle eintritt (IC_{50}). Hierzu wurden Keratinozyten und Fibroblasten verwendet, die aus Präputien isoliert worden waren. Ein positives Ethikvotum mit der Antragsnummer EA1/192/15 lag zur Durchführung dieser Untersuchungen vor.

3.1.1 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf die metabolische Aktivität von primären Keratinozyten

Um den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von primären Keratinozyten zu erfassen, wurden die Zellen in einer Konzentration von $1,68 \times 10^4$ Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde die Behandlung der Zellen mit Inositol-C2-PAF in verschiedenen Konzentrationen begonnen. In einem Pilotprojekt mit Zellen von Spender PK 9, die mit Konzentrationen bis $30 \mu\text{M}$ behandelt wurden, sollte der zu untersuchende Konzentrationsbereich für die weiteren Spender festgelegt werden. Da bereits $10 \mu\text{M}$ ausreichten, um die IC_{50} zu erreichen, wurde diese Konzentration als Maximum in den weiteren Untersuchungen eingesetzt. Mögliche zeitabhängige Veränderungen in der Wirkung von Inositol-C2-PAF wurden durch Untersuchungen nach drei verschiedenen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 Stunden) analysiert. Zu den entsprechenden Zeiten wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 570nm . Für jede Inkubationszeit und Konzentration des Wirkstoffes wurden pro Spender 4 technische Replikate angelegt. Aus den Messwerten dieser Replikate wurde das arithmetische Mittel gebildet und auf die unbehandelte Kontrolle (100% metabolische Aktivität) bezogen. An die ermittelten Daten wurde eine Hillfunktion angenähert. Deren Maximum wurde bei 100% und das Minimum bei 0% festgelegt. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden durch das Excel-Solver-Add-In modelliert. Die Experimente wurden mit den Keratinozyten der Spender PK 9 - 12 durchgeführt.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität der Zellen der 4 Spender gemessen (Abbildung 12), wobei sich bei Spender PK 9 bei einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ eine 30%ige Hemmung der zellulären metabolischen Aktivität einstellte. Mit zunehmender Konzentration verstärkte sich die Hemmung weiter. Die IC_{50} lag bei $4,88 \mu\text{M}$. Spender PK 10 mit einer IC_{50} von $8,27 \mu\text{M}$ wies ab $5 \mu\text{M}$ eine deutliche Reduktion der metabolischen Aktivität auf. Die Zellen von Spender PK 11 zeigten bei $0,6 \mu\text{M}$ und $1,25 \mu\text{M}$ eine leichte Reduktion um ca. 10 %, die unter $2,5 \mu\text{M}$ nicht mehr zu beobachten war. Bei $5 \mu\text{M}$ betrug die Hemmung der metabolischen Aktivität 20% und bei $10 \mu\text{M}$ knapp über 50%. Die IC_{50} betrug $9,73 \mu\text{M}$. Bis einschließlich $2,5 \mu\text{M}$ zeigte der Wirkstoff bei den Zellen von Spender PK 12 keinen Effekt. Bei $5 \mu\text{M}$ wurde die metabolische Aktivität um ca. 35% und bei $10 \mu\text{M}$ um ca. 50% gesenkt. Die IC_{50} betrug $9,26 \mu\text{M}$. Die metabolische Aktivität unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach 48 Stunden (Abbildung 13) blieb bei den Zellen von Spender PK 9 bis $1,25 \mu\text{M}$ unverändert. Bei $2,5 \mu\text{M}$ lag sie noch bei 80% im

Vergleich zur Kontrolle. Bei 5 μM war eine Abnahme der Aktivität auf 70% und bei 10 μM auf 20% zu beobachten. Die IC_{50} lag bei 6,41 μM . Die Zellen von Spender PK 10 wiesen bei 5 μM bereits eine Reduktion ihrer metabolischen Aktivität um 65% auf, was zu einer IC_{50} von 3,63 μM führte. Bei Spender PK 11 nahm die zelluläre metabolischen Aktivität unter 5 μM auf 55 % im Vergleich zur Kontrolle ab. Die IC_{50} lag bei 5,65 μM . Die Zellen von Spender PK 12 wurden durch 5 μM des Wirkstoffes in ihrer metabolischen Aktivität um 25% und durch 10 μM um 70% gehemmt. Die IC_{50} betrug 7,53 μM .

Nach 72 Stunden (Abbildung 14) zeigte sich bei Spender PK 9 bei 5 μM eine Hemmung der zellulären metabolischen Aktivität um 25%. Bei 10 μM war sie bereits um 80% gehemmt. Die IC_{50} lag bei 6,54 μM . Die Zellen von Spender PK 10 wurden bis 2,5 μM Inositol-C2-PAF nur wenig in ihrer metabolischen Aktivität beeinflusst. Im Gegensatz dazu lag bei 5 μM bereits eine Reduktion um 90% vor, was eine IC_{50} von 3,54 μM zur Folge hatte. Die Zellen von Spender PK 11 wiesen bei einer Konzentration von 2,5 μM eine metabolische Aktivitätsabnahme um 40%, bei 5 μM um 60% und bei 10 μM um 80% auf. Die IC_{50} lag bei 3,58 μM . Bei Spender PK 12 war bei 2,5 μM eine Reduktion der zellulären metabolischen Aktivität um 20% vorhanden, die sich unter 5 μM auf ca. 50% steigerte. Die IC_{50} konnte bei 4,90 μM interpoliert werden.

24 Stunden

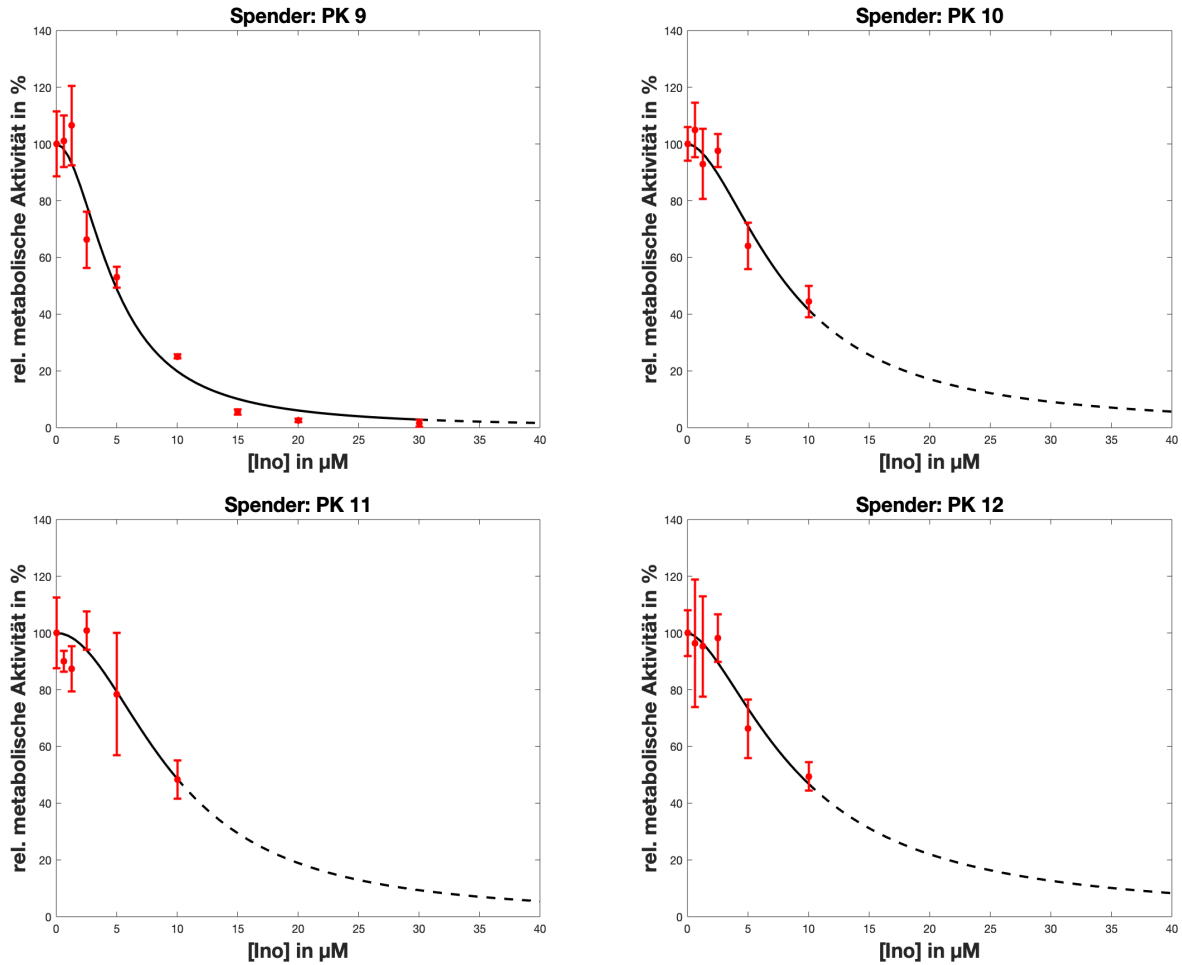


Abbildung 12:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von primären Keratinozyten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

48 Stunden

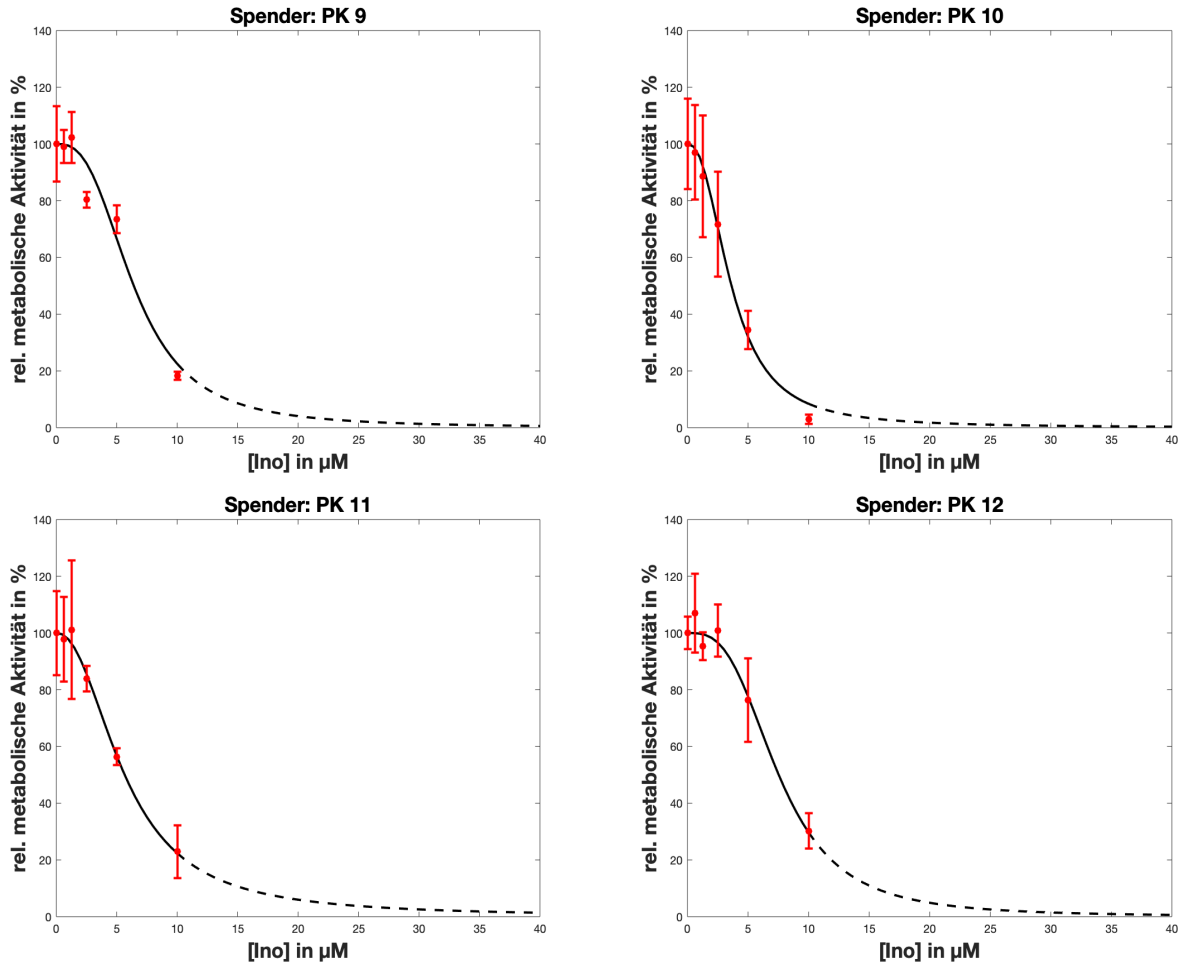


Abbildung 13:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von primären Keratinozyten nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

72 Stunden

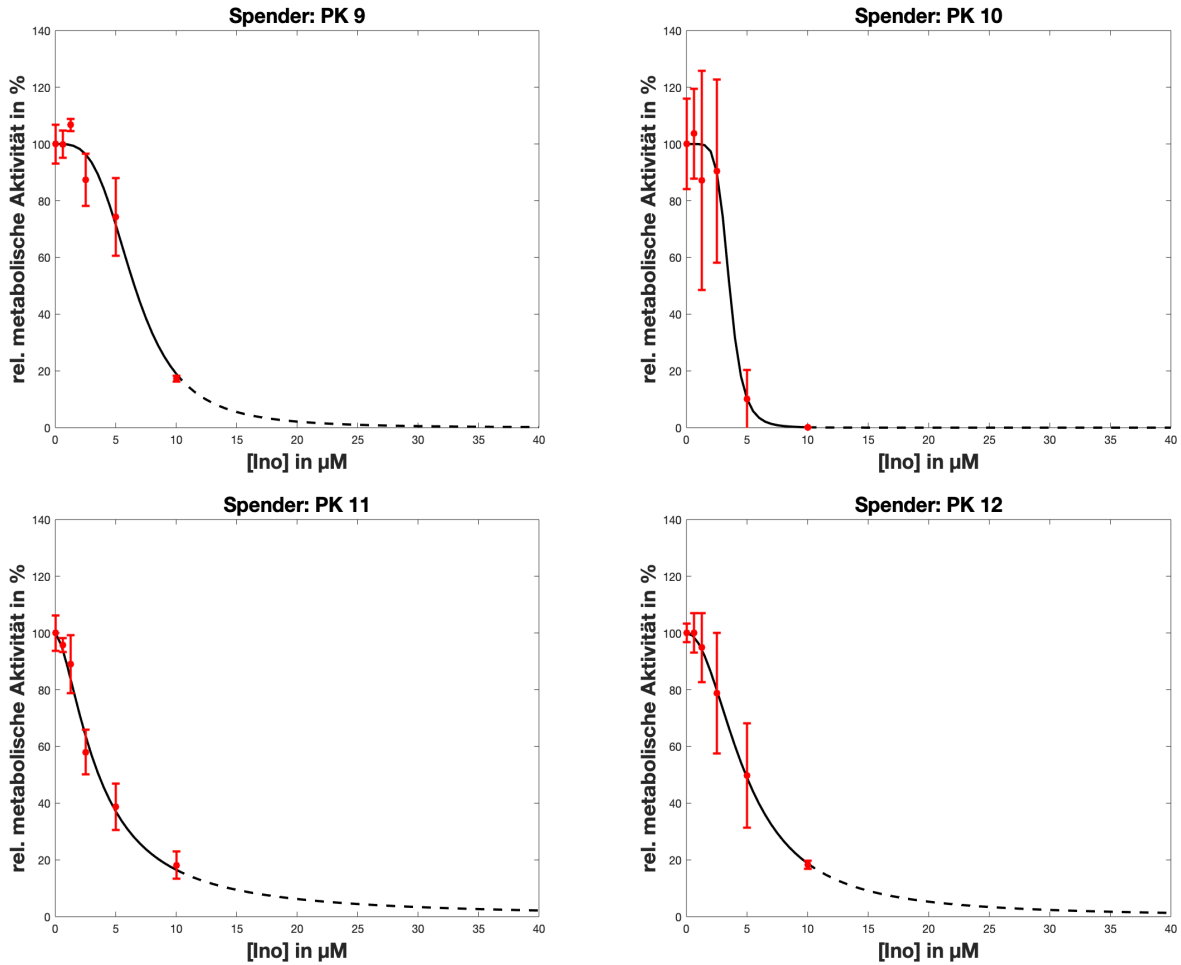


Abbildung 14:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von primären Keratinozyten nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

3.1.2 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf die metabolische Aktivität von dermalen Fibroblasten

Um den kutanen Einsatz des Wirkstoffes Inositol-C2-PAF zu ermöglichen, sollte sein Einfluss auch auf die metabolische Aktivität von primären dermalen Fibroblasten präklinisch untersucht werden. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde die Behandlung der Zellen mit Inositol-C2-PAF in verschiedenen Konzentrationen begonnen. Als Pilotprojekt wurden die Zellen der Spender PF 5 und 6 mit maximal $20 \mu\text{M}$ Inositol-C2-PAF behandelt, um den Konzentrationsbereich zu identifizieren, in dem die IC_{50} liegt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentrationen für die weiteren Spender erhöht und optimiert werden mussten, um die IC_{50} interpolieren zu können. Um eine zeitabhängige Veränderung des Stoffeinfusses erfassen zu können, wurden mit 24, 48 und 72 Stunden drei verschiedene Inkubationszeiträume gewählt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 570nm. Für jede Inkubationszeit und Konzentration des Wirkstoffes wurden pro Spender 4 technische Replikate angesetzt. Aus den Messwerten dieser Ansätze wurde das arithmetische Mittel gebildet und auf die unbehandelte Kontrolle (100% metabolische Aktivität) bezogen. An die erhobenen Daten wurde eine Hillfunktion angenähert. Deren Maximum wurde bei 100% und das Minimum bei 0% festgelegt. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden durch das Excel-Solver-Add-In modelliert.

Die MTT-Assays mit primären Fibroblasten wurden für die Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden mit den Spendern PF 5 bis 10 durchgeführt. Für die Inkubationszeit von 72 Stunden wurden nur die Zellen der Spender PF 5 bis 8 untersucht (Abbildung 15 bis 17). Nach 24 Stunden zeigte als einziger Spender PF 5 eine geringe Abnahme der Aktivität bei einer Konzentration von $0,6 \mu\text{M}$. Bei den nächst höheren Konzentrationen war zunächst kein hemmender Effekt zu beobachten. Erst mit dem Erreichen der höchsten eingesetzten Konzentration von $20 \mu\text{M}$ konnte wieder eine Reduktion der metabolischen Aktivität erreicht werden. Diese betrug jedoch lediglich 20%, weshalb die IC_{50} nicht interpoliert werden konnte. Auch bei Spender PF 6 konnte die IC_{50} bei einer Hemmung der zellulären metabolischen Aktivität von 30% unter $20 \mu\text{M}$ Inositol-C2-PAF nicht interpoliert werden. Die Untersuchungen an den Spendern PF 5 und PF 6 zeigten, dass die IC_{50} bei dermalen Fibroblasten nach 24-stündiger Inkubation mit Inositol-C2-PAF oberhalb von $20 \mu\text{M}$ zu erwarten war. Dementsprechend wurden die eingesetzten Konzentrationen erhöht. Bei Spender PF 7 konnte die IC_{50} daraufhin bei $24,82 \mu\text{M}$ interpoliert werden. Die Zellen des Spenders wurden in ihrer metabolischen Aktivität unter $20 \mu\text{M}$ um 20% gehemmt. Bei $25 \mu\text{M}$ betrug die Hemmung ca. 50% und bei $30 \mu\text{M}$ war nahezu keine metabolische Aktivität mehr nachweisbar. Bei Spender PF 8 ergab sich eine deutliche Schwankung der Messwerte, was zu größeren Standardabweichungen und Fehlerbalken führte. $15 \mu\text{M}$ führten hierbei zu einer leichten Abnahme der metabolischen Aktivität auf 90%, während 18 und $20 \mu\text{M}$ eine Abnahme auf ca. 65% bedingten. Bei $25 \mu\text{M}$ betrug die Aktivität nur noch 15% des Ausgangswertes und war bei $30 \mu\text{M}$ kaum mehr nachzuweisen. Die IC_{50} betrug $20,84 \mu\text{M}$. Genau wie bei Spender PF 8, zeigte der Spender PF 9 unter Einsatz von $18 \mu\text{M}$ Inositol-C2-PAF eine stärkere Hemmung der metabolischen Aktivität als bei $20 \mu\text{M}$. Die Unterschiede zwischen den beiden Werten lagen jedoch nur im einstelligen Prozentbereich. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen kommt dieser Unregelmäßigkeit keine Bedeutung zu. Die Zellen von Spender PF 9 wiesen eine IC_{50} von $22,93 \mu\text{M}$ auf. Bei Spender PF 10 betrug die IC_{50} $25,13 \mu\text{M}$. Insgesamt konnten bei den Zellen aller Spender nach 24 Stunden induktive Effekte von Inositol-C2-PAF im Sinne eine

erhöhten metabolischen Aktivität in niedrigen Konzentrationsbereichen bis einschließlich 10 µM festgestellt werden. Bei den Spendern PF 7, 9 und 10 konnte sogar noch bei 15 µM eine Erhöhung nachgewiesen werden.

Nach 48-stündiger Inkubationszeit (Abbildung 16) zeigten die Zellen von Spender PF 5 bei 20 µM eine Senkung der metabolischen Aktivität um fast 50%. Da 20 µM die höchste eingesetzte Konzentration war, konnte die IC_{50} nicht interpoliert werden. Bei Spender PF 6 wurde die zelluläre metabolische Aktivität bei 20 µM bis auf 20% gesenkt. Dadurch war die Interpolation der IC_{50} bei einer Konzentration von 18,18 µM prinzipiell möglich, jedoch mit einer Unsicherheit behaftet, da keine Messpunkte zwischen 10 µM und 20 µM vorlagen. Das große Messintervall wurde genutzt, um den Konzentrationsbereich zu identifizieren, in dem Änderungen der metabolischen Aktivität zu erwarten wären. Bei den folgenden Spendern wurde dieser Bereich durch entsprechende Messungen genauer dargestellt. Bei Spender PF 7 konnte eine IC_{50} von 20,75 µM interpoliert werden. Ab 15 µM Inositol-C2-PAF nahm die metabolische Aktivität kontinuierlich ab, wobei bei 20 µM noch eine metabolische Aktivität von 60% bestand, während sie bei 25 µM kaum noch nachzuweisen war. Die Messwerte bei Spender PF 8 schwankten stark. Ebenfalls ab 15 µM setzte ein hemmender Effekt des Wirkstoffes ein. Die IC_{50} lag bei 16,20 µM. Die Zellen von Spender PF 9 zeigten bei jeder eingesetzten Konzentration eine Hemmung der metabolischen Aktivität, wodurch die IC_{50} bei 16,46 µM ermittelt werden konnte. Bei Spender PF 10 konnten keine Effekte von Inositol-C2-PAF bis zu einer Konzentration von 10 µM festgestellt werden. Die hemmende Wirkung auf die Zellen setzte bei 15 µM ein und verstärkte sich mit steigender Konzentration. Die IC_{50} lag bei 20,16 µM. Nach 48 Stunden konnte noch bei der Hälfte der Spender (PF 5, PF 6, PF 8) eine erhöhte zelluläre metabolische Aktivität unter Einfluss von niedrigen Wirkstoffkonzentrationen bis maximal 15 µM nachgewiesen werden.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde bei den vier Spendern PF 5 bis 8 die jeweilige IC_{50} mit den eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen bis 20 µM erreicht (Abbildung 17). Deshalb wurde auf die Untersuchung von höheren Konzentrationen an weiteren Spendern verzichtet. Die Zellen von Spender PF 5 zeigten ab einer Konzentration von 5 µM eine Abnahme der metabolischen Aktivität. Deutlich war die Abnahme aber erst bei 20 µM mit einer 20%igen Restaktivität. Die IC_{50} betrug 14,54 µM. Bei Spender PF 6 trat ein deutlicher Rückgang der zellulären metabolischen Aktivität auf 70% bereits bei 10 µM auf. Die IC_{50} lag bei 11,58 µM. Die Zellen von Spender PF 7 wiesen bis einschließlich 10 µM Inositol-C2-PAF keine erniedrigten Messwerte auf. Mit einer IC_{50} von 19,88 µM wurde die Abnahme der metabolischen Aktivität ab einer Konzentration von 15 µM beobachtet. Die Zellen von Spender PF 8 wurden im Gegensatz dazu bereits mit niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes in ihrer metabolischen Aktivität gehemmt. Ihre IC_{50} betrug 12,87 µM.

24 Stunden

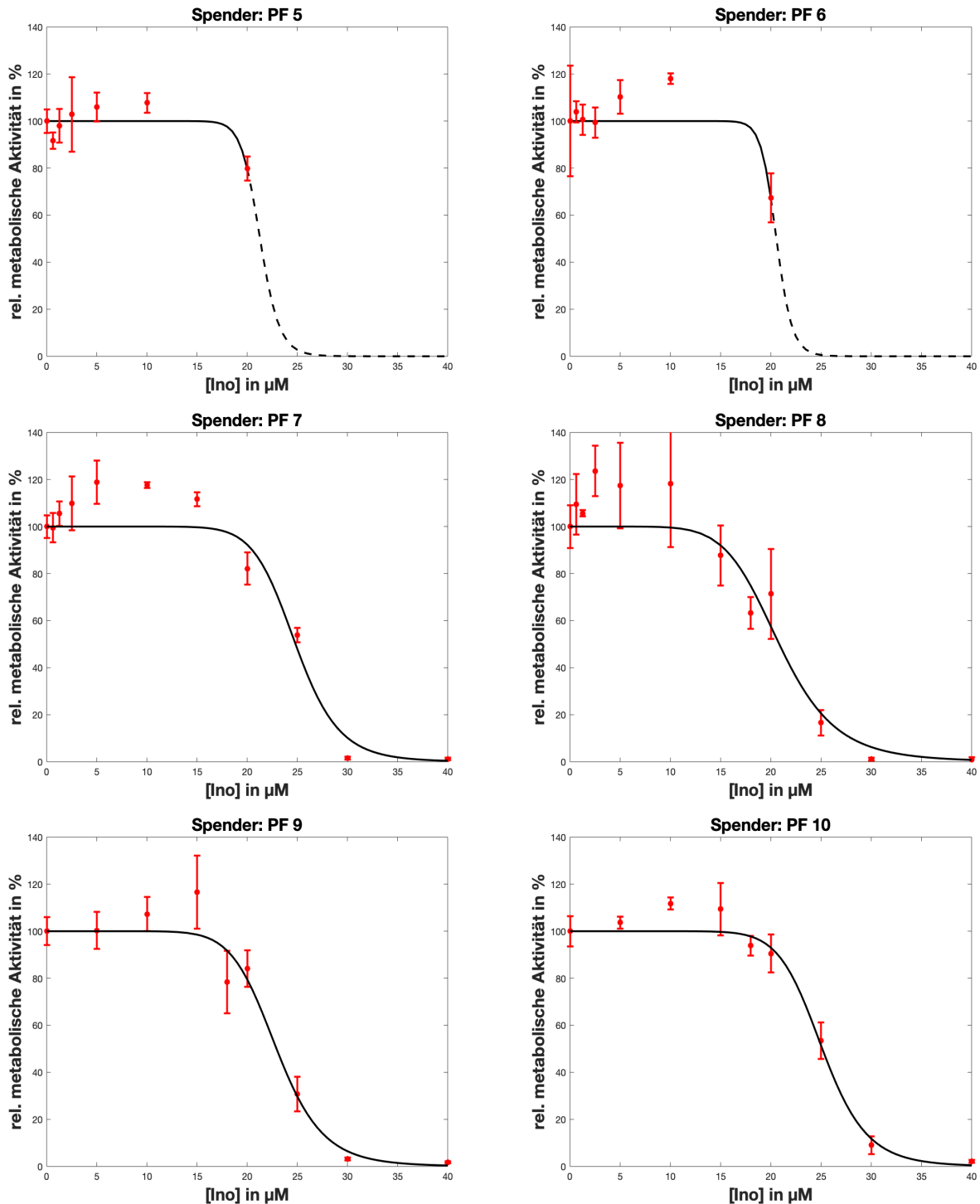


Abbildung 15:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von dermalen Fibroblasten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 4 technische Replikate angelegt ($n \geq 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC₅₀ und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

48 Stunden

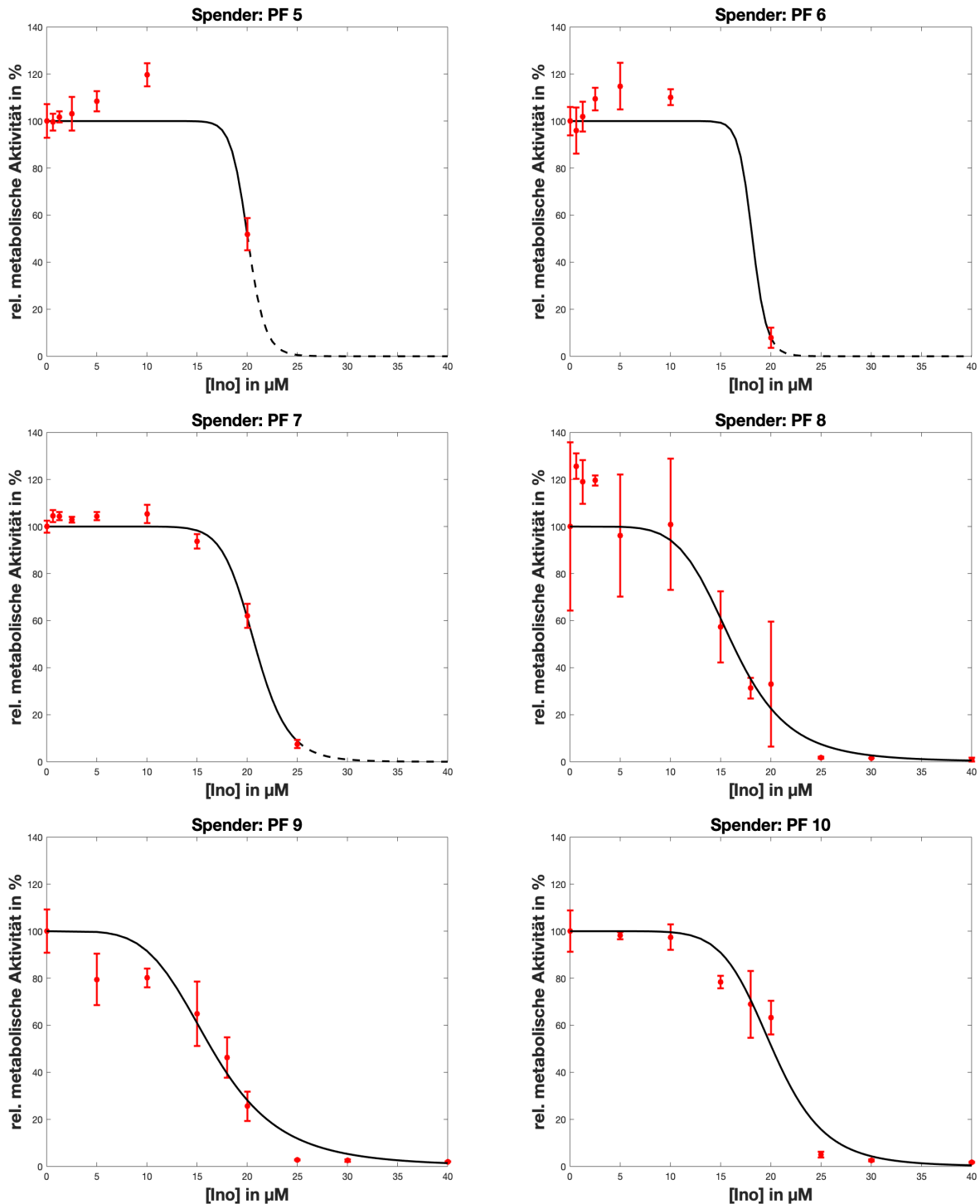


Abbildung 16:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von dermalen Fibroblasten nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 4 technische Replikate angelegt ($n \geq 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

72 Stunden

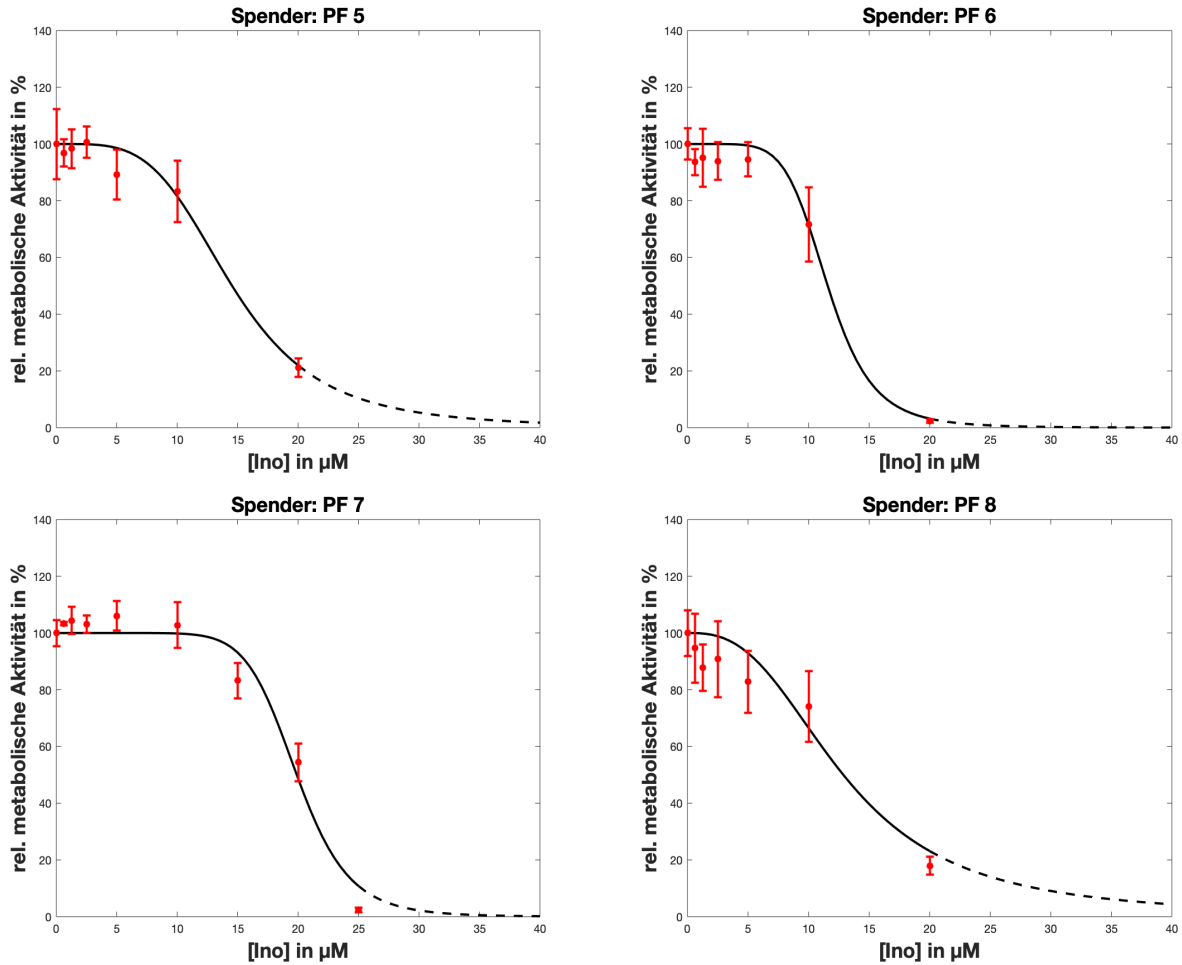


Abbildung 17:

Untersuchung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität von dermalen Fibroblasten nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 4 technische Replikate angelegt ($n \geq 4$). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

3.1.3 Einfluss auf die metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp

Um den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität der Gesamtheit der Spender zu beschreiben, wurde das arithmetische Mittel der spenderspezifischen IC_{50} -Werte gebildet (Abbildung 18). Diese wurden zuvor durch Annäherung von Hillfunktionen an die Messwerte jedes Spenders im MTT-Assay ermittelt.

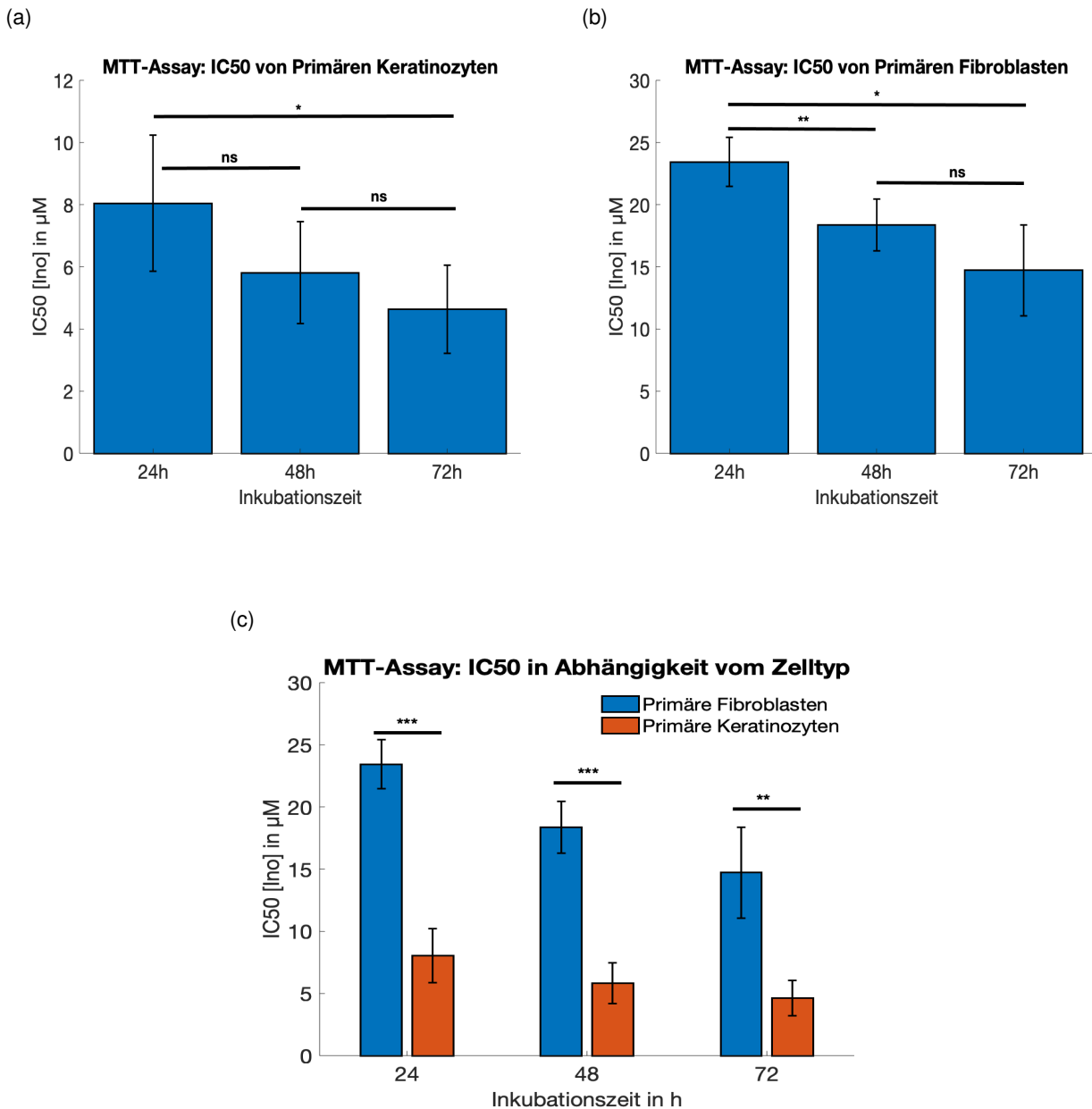


Abbildung 18: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität primärer Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ((a), (b)) bzw. vom Zelltyp (c). Primäre Keratinozyten und primäre dermale Fibroblasten wurden mit Inositol-C2-PAF behandelt und die metabolische Aktivität mit dem MTT-Assay gemessen. Durch Annäherung einer Hillfunktion an die Messwerte konnte für jeden Spender jedes Inkubationszeitraumes die IC_{50} ermittelt werden, bei der noch 50% der metabolischen Aktivität der unbehandelten Kontrolle vorlagen. Die Werte in der Abbildung entsprechen dem arithmetischen Mittel der IC_{50} -Werte aller Spender eines Inkubationszeitpunktes. Nach 48 Stunden lagen dazu bei den dermalen Fibroblasten 5 Spender vor ($n = 5$), während für alle anderen Zeitpunkte sowohl bei den Fibroblasten als auch bei den Keratinozyten 4 Spender ($n = 4$) vorlagen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Im T-Test signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen gekennzeichnet.

Die IC_{50} der primären Keratinozyten lag nach 24 Stunden bei $8,04 \mu\text{M}$ ($\pm 2,19$). Nach 48 Stunden betrug sie $5,81 \mu\text{M}$ ($\pm 1,64$) und nach 72 Stunden $4,64 \mu\text{M}$ ($\pm 1,42$). Von einem zum nächsten Inkubationszeitpunkt waren die Veränderungen nicht signifikant. Ein Vergleich von der IC_{50} nach 24 und 72 Stunden zeigte insgesamt einen signifikanten Rückgang um 42%.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Inositol-C2-PAF ergab sich bei den dermalen Fibroblasten im arithmetischen Mittel eine IC_{50} von $23,43 \mu\text{M}$ ($\pm 1,98$). Nach 48 Stunden sank die IC_{50} signifikant auf $18,35 \mu\text{M}$ ($\pm 2,08$). Die weitere Reduktion auf $14,72 \mu\text{M}$ ($\pm 3,65$) nach 72 Stunden hielt gegenüber dem vorangegangenen Wert keiner Signifikanztestung stand. Im Vergleich zur IC_{50} nach 24 Stunden handelte es sich mit einer Senkung um 37% trotzdem um eine signifikante Veränderung.

Im direkten Vergleich zwischen primären Keratinozyten und dermalen Fibroblasten konnte festgestellt werden, dass die IC_{50} der Fibroblasten ungefähr dreifach überhalb der IC_{50} der Keratinozyten lag (Abbildung 18c). Eine statistisch signifikante Differenz dieser Größenordnung in der Sensitivität der Zelltypen gegenüber dem Wirkstoff war zu jeder Inkubationszeit festzustellen.

3.2 Effekt von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt in der 2D-Monokultur

Neben dem Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität primärer Hautzellen sollte auch der Einfluss auf den Proteingehalt der Zellen ermittelt werden, welcher mit der Zellzahl korreliert. Hierzu wurde der SRB-Assay genutzt, wobei die IC_{50} die Wirkstoffkonzentration war, bei der der Proteingehalt gegenüber der unbehandelten Kontrolle halbiert wurde.

3.2.1 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf den Proteingehalt von primären Keratinozyten

Es wurden 96-Well-Platten mit $1,68 \times 10^4$ Zellen pro Well versehen und am Folgetag wurde die Behandlung mit dem Wirkstoff begonnen. Die niedrigste Konzentration betrug $0,6 \mu\text{M}$ und wurde schrittweise bis auf $10 \mu\text{M}$ verdoppelt. Mit diesem Vorgehen sollte der unbekannte Konzentrationsbereich der IC_{50} ermittelt werden. Um zeitabhängige Veränderungen der Inositol-C2-PAF-Wirkung zu identifizieren, wurden die Untersuchungen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubationszeit mit dem Wirkstoff durchgeführt. Dabei waren für jeden Spender mindestens 3 technische Replikate pro Inkubationszeitpunkt und Wirkstoffkonzentration vorhanden ($n \geq 3$). Für die Quantifizierung des SRB-Assays wurde die optische Dichte bei 492nm bestimmt und der Mittelwert aus den technischen Replikaten gebildet. Die Mittelwerte wurden auf das arithmetische Mittel der Kontrolle bezogen, um eine prozentuale Skala des Proteingehalts zu erhalten. Anschließend wurde eine Hillfunktion an die prozentualen Werte angenähert. Dafür wurde das Maximum der Funktion auf 100% und das Minimum auf 0% gesetzt. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert.

Die SRB-Assays mit primären Keratinozyten wurden nach 24 Stunden mit den Spendern PK 5 bis 7 durchgeführt (Abbildung 19). Nach 48 Stunden wurden die Spender PK 5 bis 8 und nach 72 Stunden die Spender PK 5, 7 und 8 genutzt (Abbildung 20 und 21). Nach 24 Stunden konnte mit den eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen bei allen 3 Spendern die IC_{50} erreicht werden. Bei den Zellen von Spender PK 5 kam es zur einer kontinuierlichen Reduktion des Proteingehalts ab einer Konzentration von $1,25 \mu\text{M}$. Die IC_{50} lag bei $3,10 \mu\text{M}$. Bei $0,6 \mu\text{M}$ war der zelluläre Proteingehalt um 20% gegenüber der Kontrolle gesteigert. Bei einer Standardabweichung von fast 30% in der

behandelten und 20% in der unbehandelten Zellpopulation ist dieser Unterschied jedoch mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet und sollte dementsprechend nicht bewertet werden. Der zelluläre Proteingehalt von Spender PK 6 wurde unter 5 μM auf 75% und unter 10 μM auf 45% vermindert. Die IC_{50} konnte bei 9,19 μM interpoliert werden. Die Zellen von Spender PK 7 zeigten unter 0,6 μM einen Anstieg ihres Proteingehalts um 10%, was jedoch abermals mit einer Standardabweichung von fast 30% als extrem unsicher bewertet werden muss. Ab 1,25 μM nahm der Proteingehalt kontinuierlich ab. Die IC_{50} betrug 4,18 μM .

Nach 48 Stunden zeigten die Zellen von Spender PK 5 bei 1,25 μM einen 40%ig und bei 2,5 μM einen 60%ig reduzierten Proteingehalt. Die IC_{50} betrug 1,89 μM . Bei Spender PK 6 kam es erst bei 5 μM Inositol-C2-PAF zu einer Reduktion des zellulären Proteingehalts um 40%. 10 μM führten zu einer Abnahme auf 20%. Die IC_{50} lag bei 5,81 μM . Bei Spender PK 7 konnte eine IC_{50} von 3,09 μM und bei Spender PK 8 von 2,01 μM festgestellt werden.

Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen von Spender PK 5 mit 1,25 μM Inositol-C2-PAF um 40% und mit 2,5 μM um 70% in ihrem Proteingehalt gehemmt, während bei 5 μM kaum noch Protein nachweisbar war. Die IC_{50} konnte mit 1,59 μM ermittelt werden. Bei Spender PK 7 betrug die Reduktion des Proteingehalts bei 2,5 μM lediglich 10% und bei 5 μM 85%. Es wurde eine IC_{50} von 3,67 μM interpoliert. Bei Spender PK 8 betrug die IC_{50} 2,38 μM .

24 Stunden

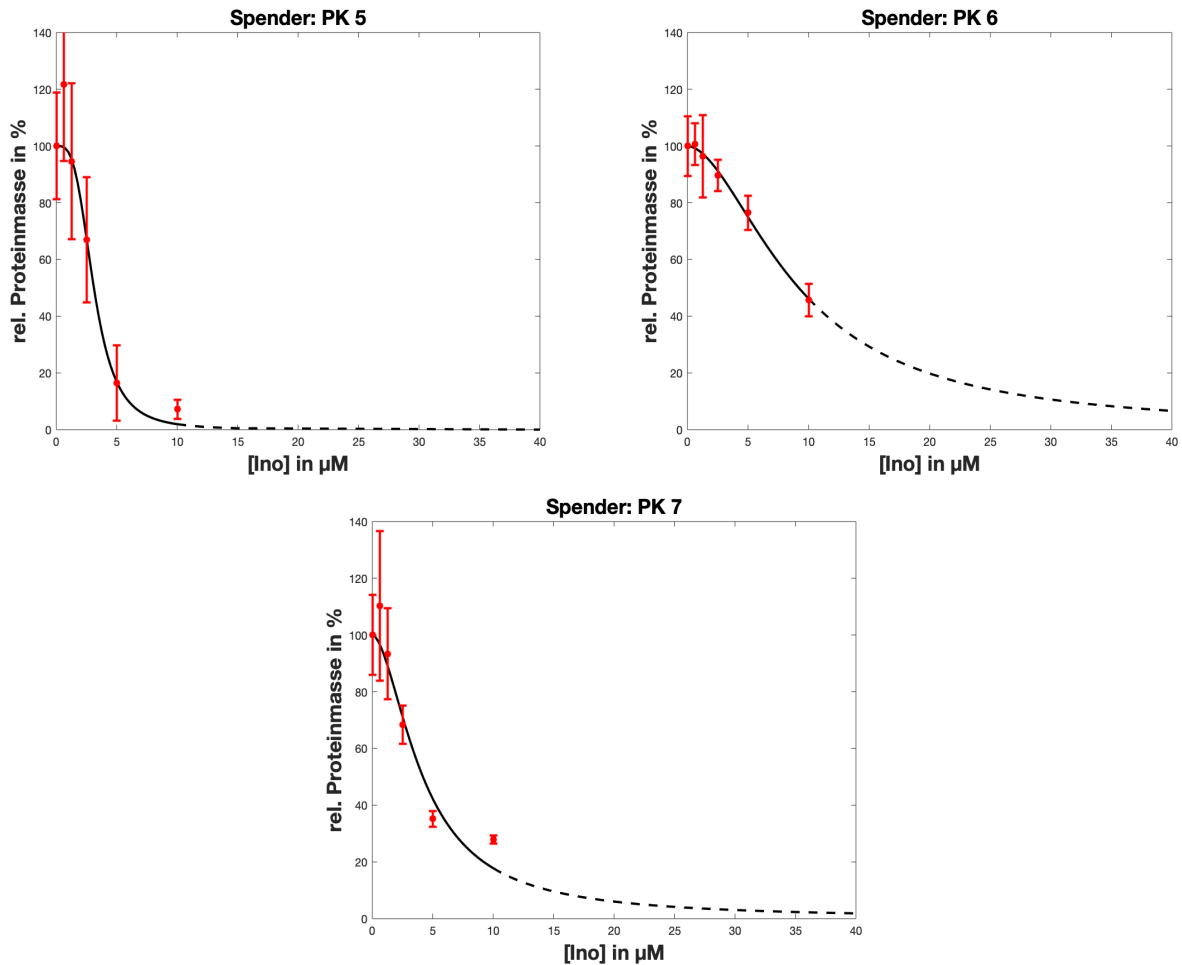


Abbildung 19:

Untersuchung des Proteingehalts von primären Keratinozyten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 3 technische Replikate angelegt ($n \geq 3$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

48 Stunden

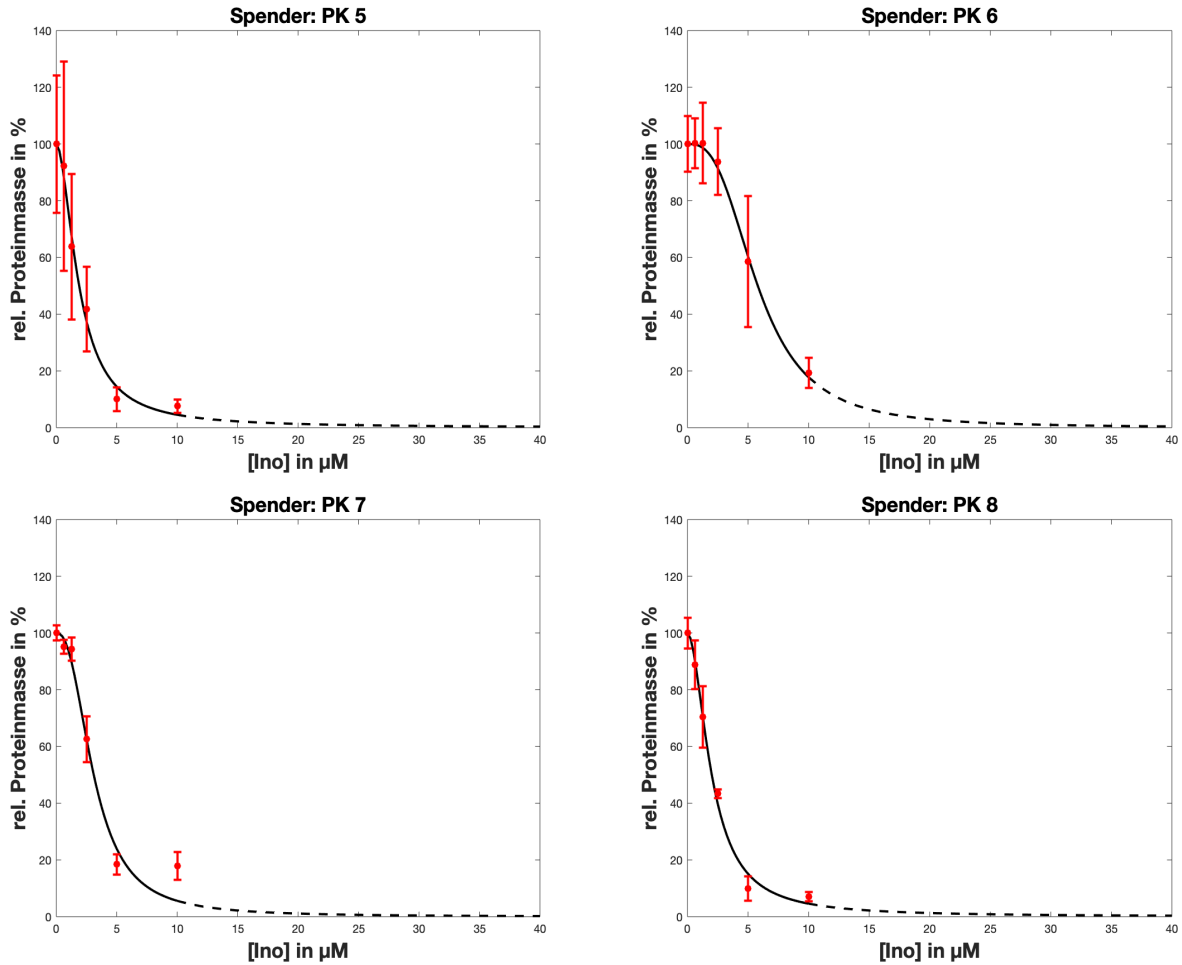


Abbildung 20:

Untersuchung des Proteingehalts von primären Keratinozyten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 3 technische Replikate angelegt ($n \geq 3$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

72 Stunden

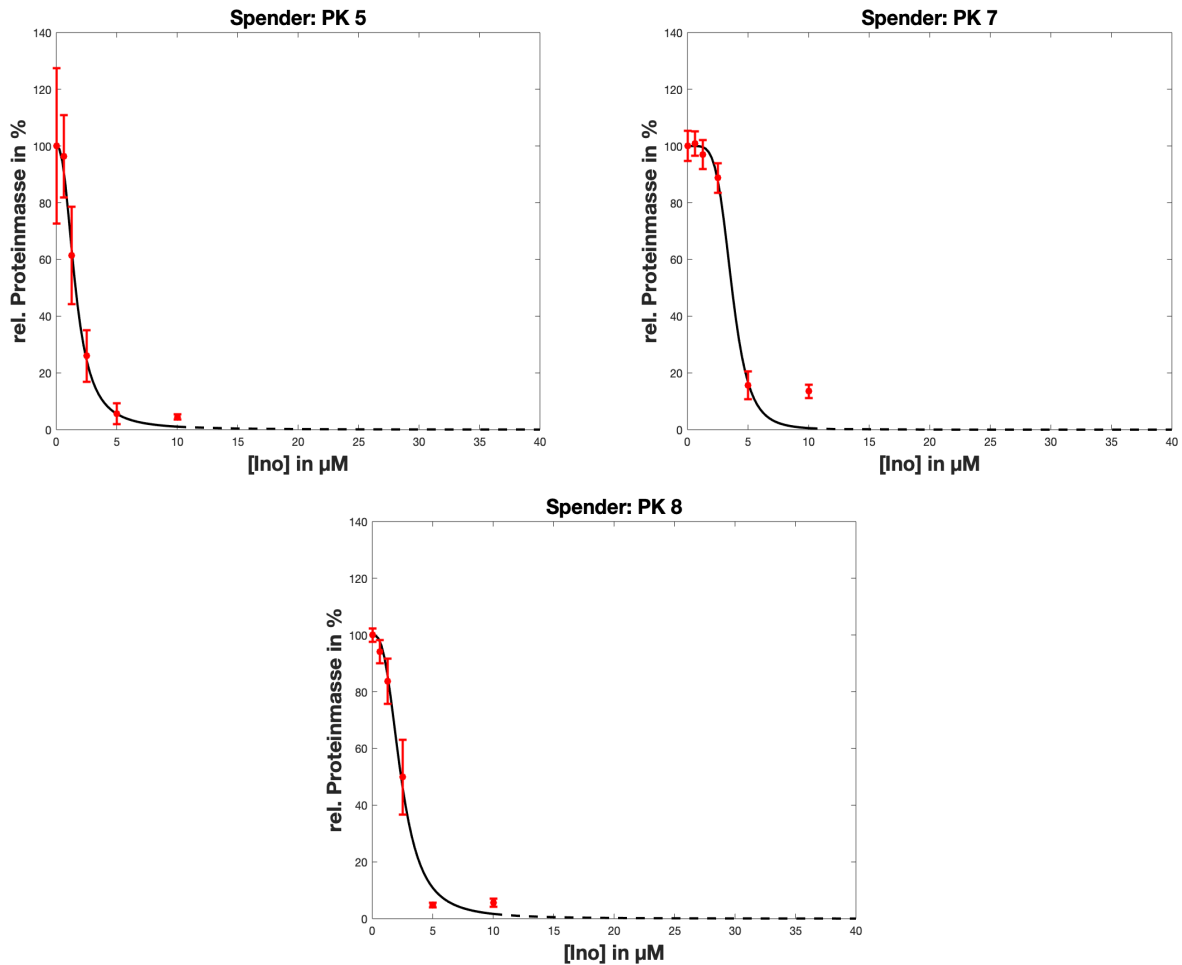


Abbildung 21:

Untersuchung des Proteingehalts von primären Keratinozyten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden: $1,68 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

3.2.2 Untersuchung des spenderabhängigen Einflusses auf den Proteingehalt von primären dermalen Fibroblasten

Die dermalen Fibroblasten wurden in einer Konzentration von $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesetzt und am Folgetag mit dem Wirkstoff behandelt. Initial wurden in einem Pilotprojekt mit den Zellen der Spender PF 5 und 6 Wirkstoffkonzentrationen bis zu einem Maximum von 20 μM eingesetzt. Diese Konzentration reichte jedoch nicht aus, um die IC_{50} zu erreichen, bei der der Proteingehalt gegenüber der unbehandelten Kontrolle halbiert wird. Dementsprechend wurden die eingesetzten Konzentrationen in den nachfolgenden Experimenten erhöht. Um zeitabhängige Veränderungen der Inositol-C2-PAF-Wirkung zu identifizieren, wurden die Untersuchungen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubationszeit mit dem Wirkstoff durchgeführt. Dabei waren für jeden Spender mindestens 3 technische Replikate pro Inkubationszeitpunkt und Wirkstoffkonzentration vorhanden ($n \geq 3$). Für die Quantifizierung des SRB-Assays wurde die optische Dichte bei 492nm bestimmt und der Mittelwert aus den technischen Replikaten gebildet. Die Mittelwerte wurden auf das arithmetische Mittel der Kontrolle bezogen, um eine prozentuale Skala des Proteingehalts zu erhalten. Anschließend wurde eine Hillfunktion an die prozentualen Werte angenähert. Dafür wurde das Maximum der Funktion auf 100% und das Minimum auf 0% gesetzt. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert.

Nach 24 Stunden wurden die SRB-Assays an den Zellen der Spender PF 5 bis PF 10 durchgeführt, während nach 48 und 72 Stunden die Spender PF 5 bis 8 genutzt wurden (Abbildung 22 bis 24). Dabei zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation der Zellen von Spender PF 5 und 6, dass mit der maximal eingesetzten Konzentration von 20 μM Inositol-C2-PAF die IC_{50} knapp nicht erreicht wurde. Stattdessen konnte eine Hemmung des Proteingehalts um 43% bzw. 49% festgestellt werden. Um die IC_{50} bei den weiteren Spendern sicher interpolieren zu können, kamen höhere Konzentrationen des Wirkstoffes zum Einsatz. Bei den Zellen von Spender PF 7 führte dies zu einer interpolierten IC_{50} von 25,63 μM . Bis einschließlich 15 μM wurde der zelluläre Proteingehalt nur geringfügig gehemmt. Eine deutlichere Abnahme setzte ab 20 μM ein, sodass bei 30 μM kaum noch Proteine vorlagen. Bei Spender PF 8 lag in den niedrigen Konzentrationen eine Steigerung des zellulären Proteingehalts um ca. 15% vor. Bei 5 und 10 μM lag das Niveau wieder auf dem der Kontrolle. Eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes stellte sich ab 15 μM ein, die genau wie die Hemmung bei 18 μM und 20 μM ca. 33% betrug. Nach diesem Plateau wurde mit 25 μM eine Reduktion um 75% erreicht. Bei 30 μM war kaum noch Protein nachweisbar. Die IC_{50} wurde bei 20,63 μM interpoliert. Die Zellen des Spenders PF 9 wiesen eine Steigerung des Proteingehalts unter Einfluss von 5 μM um 10% auf, die bei 10 μM wieder zurückging. Ab 15 μM wurde der Proteingehalt deutlich gesenkt. Bei 30 μM betrug er nur noch 15% und bei 40 μM war er kaum noch nachweisbar. Die IC_{50} lag bei 23,68 μM . Spender PF 10 zeigte ebenfalls ab 15 μM eine kontinuierliche Reduktion des zellulären Proteingehalts. Die IC_{50} wurde bei 20,02 μM ermittelt.

Nach 48 Stunden konnte mit Wirkstoffkonzentrationen bis 20 μM zuverlässig die IC_{50} interpoliert werden, weswegen auf die Untersuchung zusätzlicher Spender mit höheren Wirkstoffkonzentrationen verzichtet werden konnte. Bei den Zellen von Spender PF 5 nahm der Proteingehalt unter Einfluss von 10 μM um 25% und bei 20 μM um 85% ab. Die IC_{50} konnte bei 13,48 μM ermittelt werden. Der zelluläre Proteingehalt von Spender PF 6 wurde mit 10 μM Inositol-C2-PAF um 35% gesenkt und bei 20 μM war kaum noch Protein vorhanden. Die IC_{50} konnte bei 11,35 μM interpoliert werden.

Die Zellen der Spender PF 7 und PF 8 zeigten bis einschließlich 1,25 μM keine Veränderung des Proteingehalts gegenüber der unbehandelten Kontrolle. 5 und 10 μM reduzierten den Proteingehalt um ca. 10%. In höheren Konzentrationen nahm der Proteingehalt weiter ab. Die IC_{50} bei Spender PF 7 betrug 17,06 μM und bei Spender PF 8 14,25 μM Inositol-C2-PAF.

Nach 72-stündiger Inkubationszeit zeigten die Zellen von Spender PF 5 bis zu einer Konzentration von 5 μM keine Effekte von Inositol-C2-PAF, ab 10 μM jedoch eine Reduktion des Proteingehalts. Die IC_{50} betrug 12,62 μM . Beim Spender PF 6 war ab 10 μM eine Reduktion des Proteingehalts auf 55% zu beobachten. Bei 20 μM war keine Biomasse mehr vorhanden. Die IC_{50} konnte bei 10,27 μM interpoliert werden. Die Zellen von Spender PF 7 wurden mit jeder eingesetzten Wirkstoffkonzentration in ihrem Proteingehalt gehemmt. Die IC_{50} betrug 15,77 μM . Beim Spender PF 8 konnten bis einschließlich 5 μM keine deutlichen Effekte festgestellt werden. 10 μM hemmten den zellulären Proteingehalt um 10% und 20 μM um 90%. Die IC_{50} betrug 13,99 μM .

24 Stunden

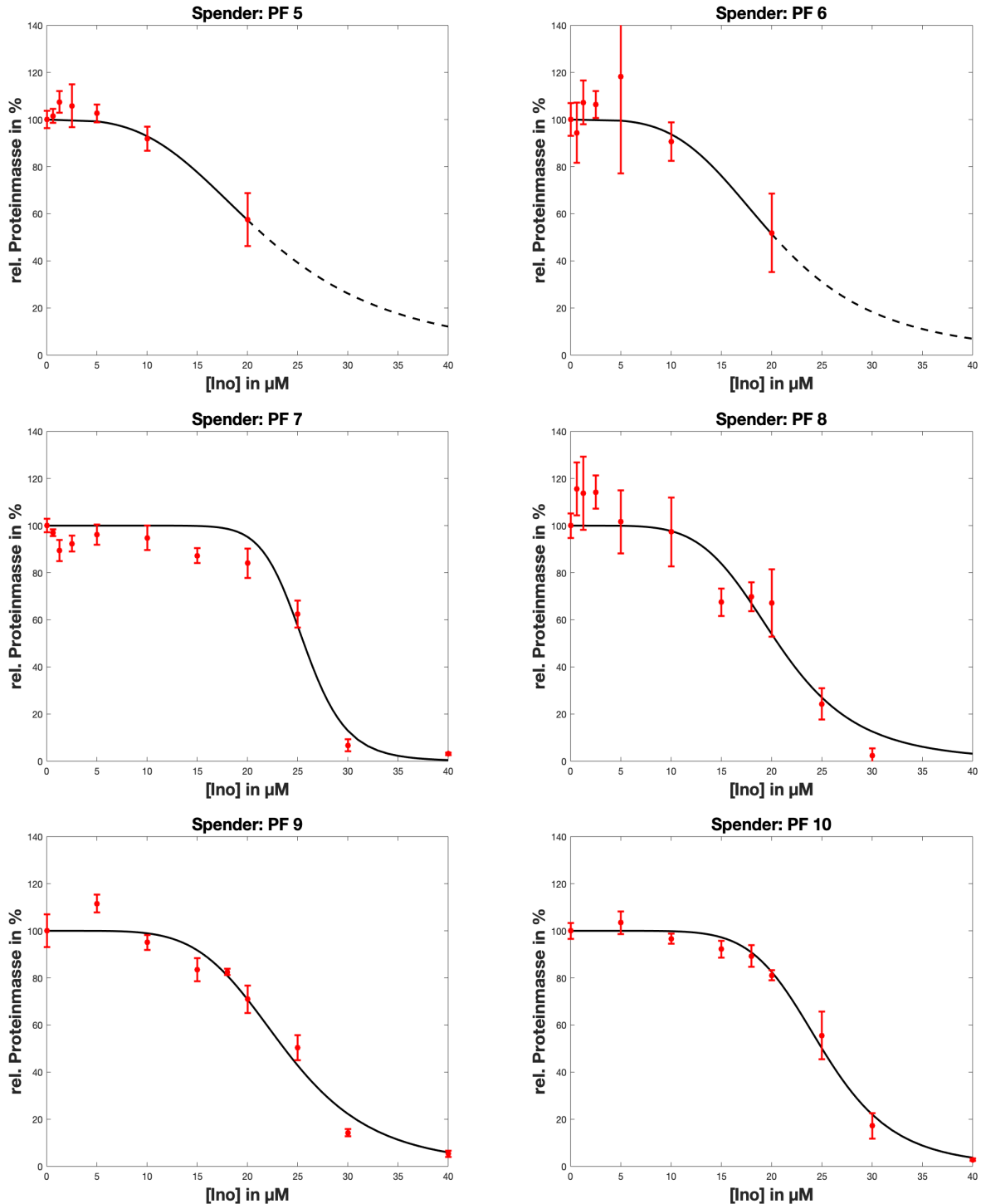


Abbildung 22:

Untersuchung des Proteingehalts von primären dermalen Fibroblasten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration mindestens 3 technische Replikate angelegt ($n \geq 3$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

48 Stunden

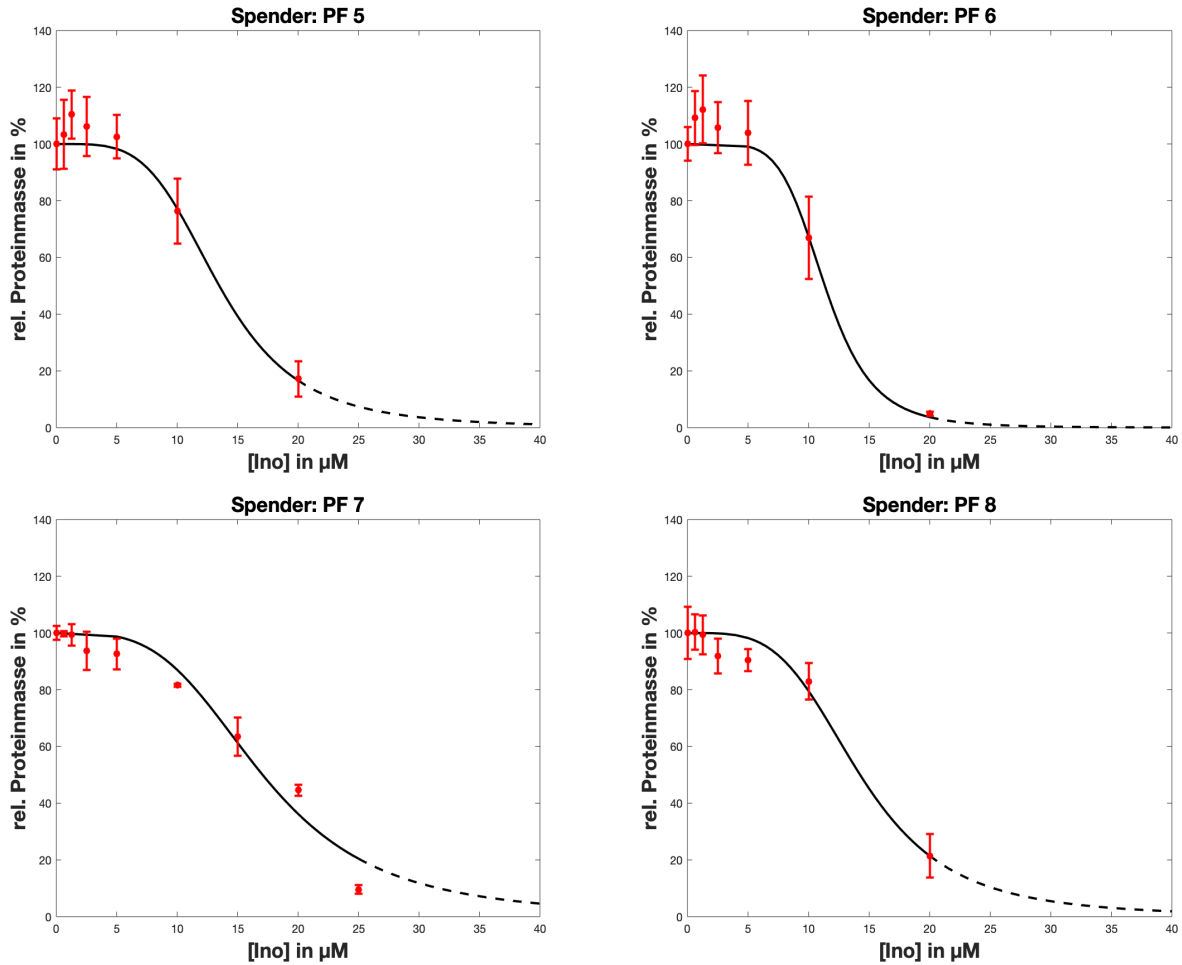


Abbildung 23:

Untersuchung des Proteingehalts von primären dermalen Fibroblasten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

72 Stunden

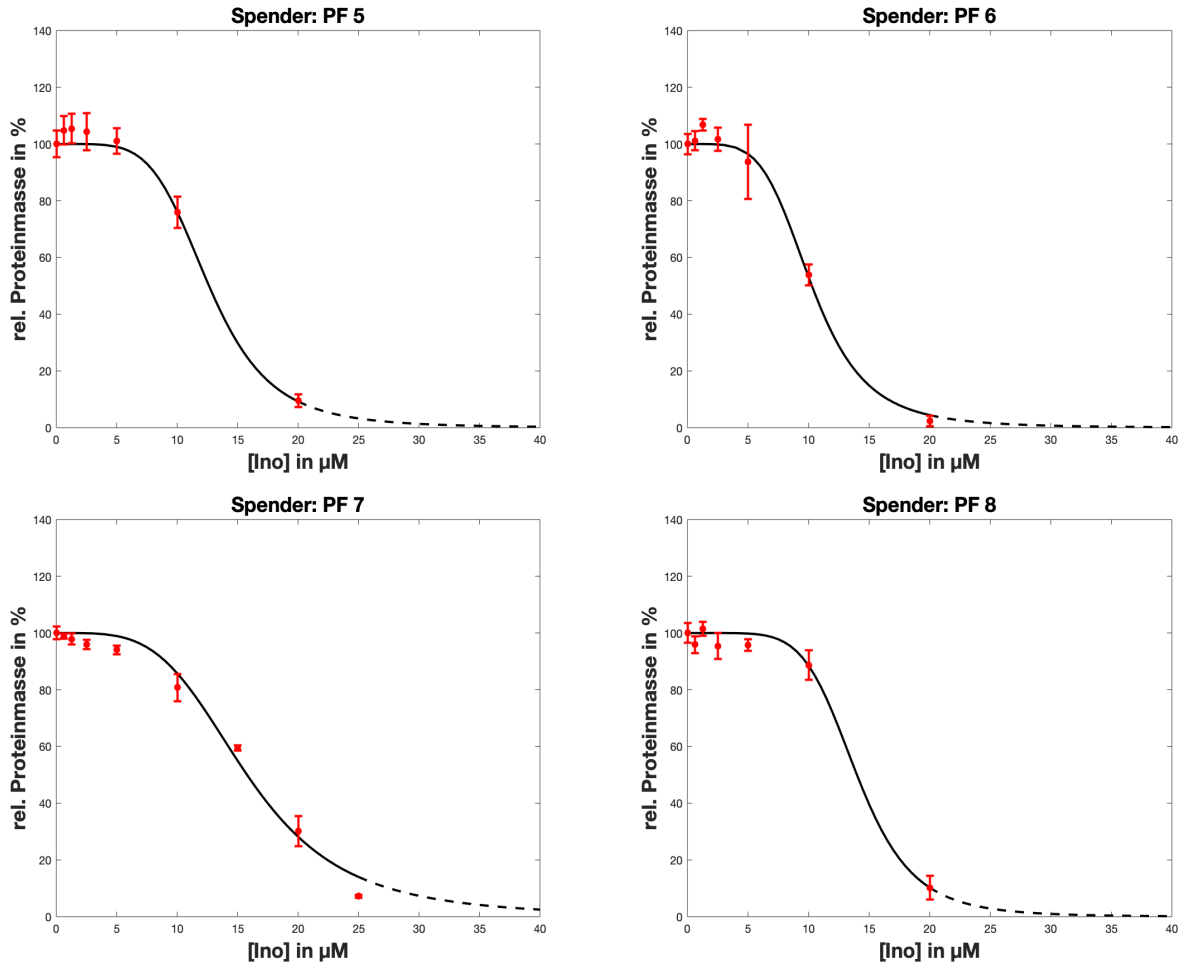


Abbildung 24:

Untersuchung des Proteingehalts von primären dermalen Fibroblasten unter Einfluss von Inositol-C2-PAF nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden: $1,9 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesetzt und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Dabei wurden für jeden Spender und jede Konzentration 4 technische Replikate angelegt ($n = 4$). Es wurde ein SRB-Assay durchgeführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Die Messergebnisse wurden auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die Punkte stellen das arithmetische Mittel der technischen Replikate und die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Als Näherungsfunktion wurde eine Hillfunktion verwendet, deren Maximum bei 100% und deren Minimum bei 0% lag. Die IC_{50} und der Hill-Exponent wurden mit dem Excel-Solver-Add-In modelliert. Die gestrichelte Linie bildet den extrapolierten Anteil der Hillfunktion ab.

3.2.3 Einfluss auf den Proteingehalt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zelltyp

Der Effekt von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt primärer Hautzellen wurden an einzelnen Spendern mit dem SRB-Assay untersucht. Aus den Ergebnissen wurde für jeden Spender die IC_{50} durch Annäherung einer Hillfunktion bestimmt. Um Aussagen über die Gesamtheit der Spender treffen zu können, wurde das arithmetische Mittel aus den individuellen IC_{50} -Werten gebildet (Abbildung 25). Dafür standen bei jedem Inkubationszeitpunkt mindestens 3 Spender zur Verfügung ($n \geq 3$).

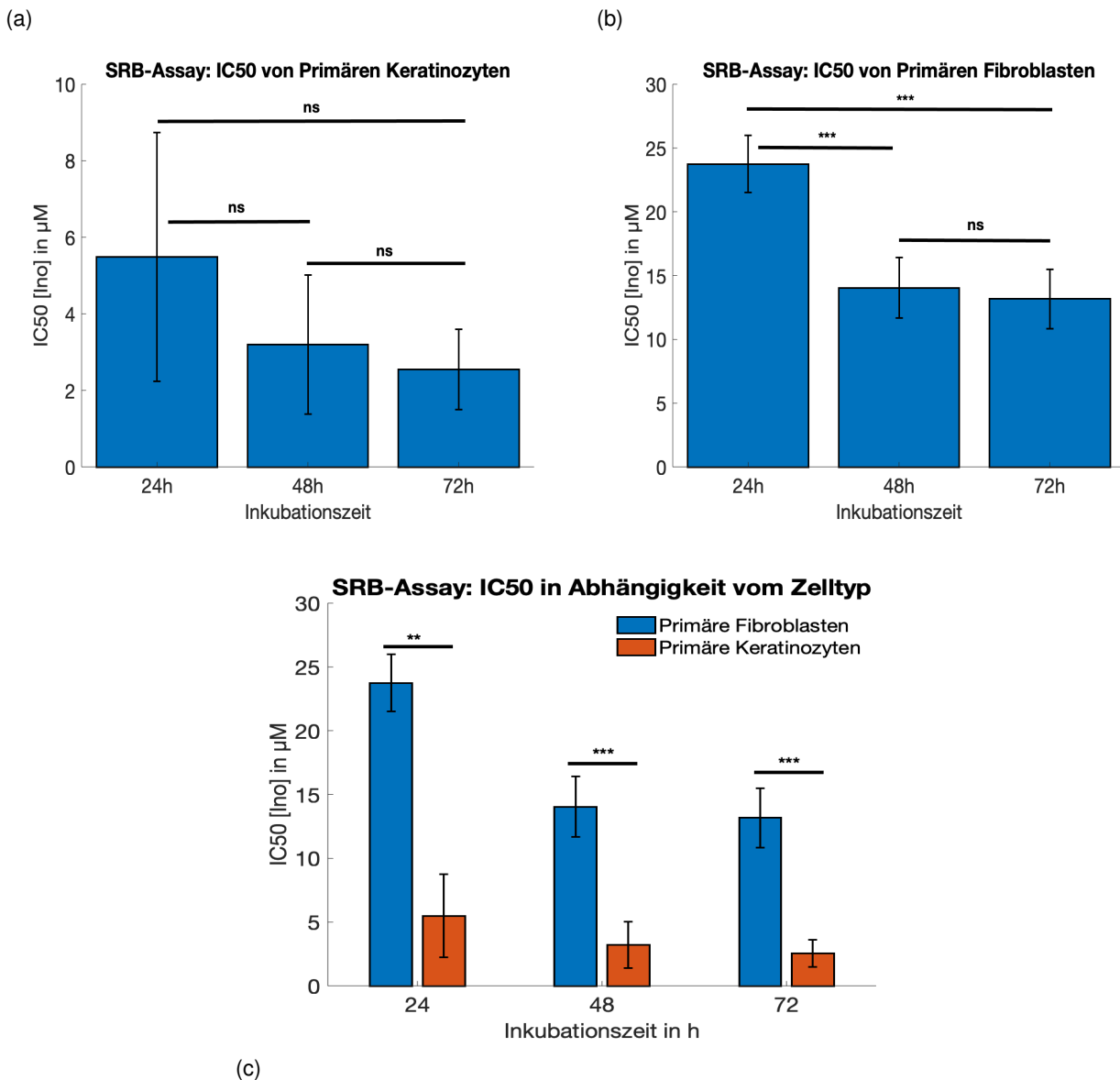


Abbildung 25: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Proteingehalt primärer Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ((a), (b)) bzw. vom Zelltyp (c). Primäre Keratinozyten und primäre dermale Fibroblasten wurden mit Inositol-C2-PAF behandelt und der Proteingehalt mit dem SRB-Assay gemessen. Durch Annäherung einer Hillfunktion an die Messwerte konnte für jeden Spender jedes Inkubationszeitraumes die IC_{50} ermittelt werden, bei der noch 50% des Proteingehalts der unbehandelten Kontrolle vorlagen. Die Werte in der Abbildung entsprechen dem arithmetischen Mittel der IC_{50} -Werte aller Spender eines Inkubationszeitpunktes. Nach 24 und 72 Stunden lagen bei den primären Keratinozyten dafür jeweils 3 Spender ($n = 3$) und nach 48 Stunden 4 Spender ($n = 4$) vor. Für die primären dermalen Fibroblasten konnten zu jedem Zeitpunkt die Werte von 4 Spendern genutzt werden ($n = 4$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Im T-Test signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen gekennzeichnet.

Dadurch konnten Veränderungen des Effektes von Inositol-C2-PAF über die drei Inkubationszeiträume (24, 48 und 72 Stunden) analysiert werden. Bei den primären Keratinozyten ergab sich eine kontinuierliche Abnahme der IC_{50} . Nach 24 Stunden betrug sie $5,49 \mu\text{M}$ ($\pm 3,25$), nach 48 Stunden $3,20 \mu\text{M}$ ($\pm 1,82$) und nach 72 Stunden $2,55 \mu\text{M}$ ($\pm 1,05$). Aufgrund der starken interindividuellen Schwankungen der IC_{50} war keine der Veränderungen signifikant.

Auch die IC_{50} der primären dermalen Fibroblasten fiel mit steigender Inkubationszeit. Nach 24 Stunden lag sie bei $23,74 \mu\text{M}$ ($\pm 2,23$) und sank nach 48 Stunden signifikant auf $14,04 \mu\text{M}$ ($\pm 2,36$). Die weitere Abnahme auf $13,17 \mu\text{M}$ ($\pm 2,32$) nach 72 Stunden hielt gegenüber dem Vorwert keiner Signifikanztestung stand. Im Vergleich zum Wert nach 24 Stunden war die Veränderung der IC_{50} trotzdem signifikant.

Im Vergleich beider Zelltypen miteinander fiel eine stärkere Beeinflussung des Proteingehalts durch Inositol-C2-PAF bei den Keratinozyten als bei den Fibroblasten auf (Abbildung 25c). Dabei lag die IC_{50} der Fibroblasten vier- bis fünffach über der IC_{50} von Keratinozyten. Die Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff waren zu jedem Zeitpunkt signifikant mit p-Werten unterhalb von 0,01.

3.3 InSphero 3D-Kokultur primärer Fibroblasten und primärer Keratinozyten

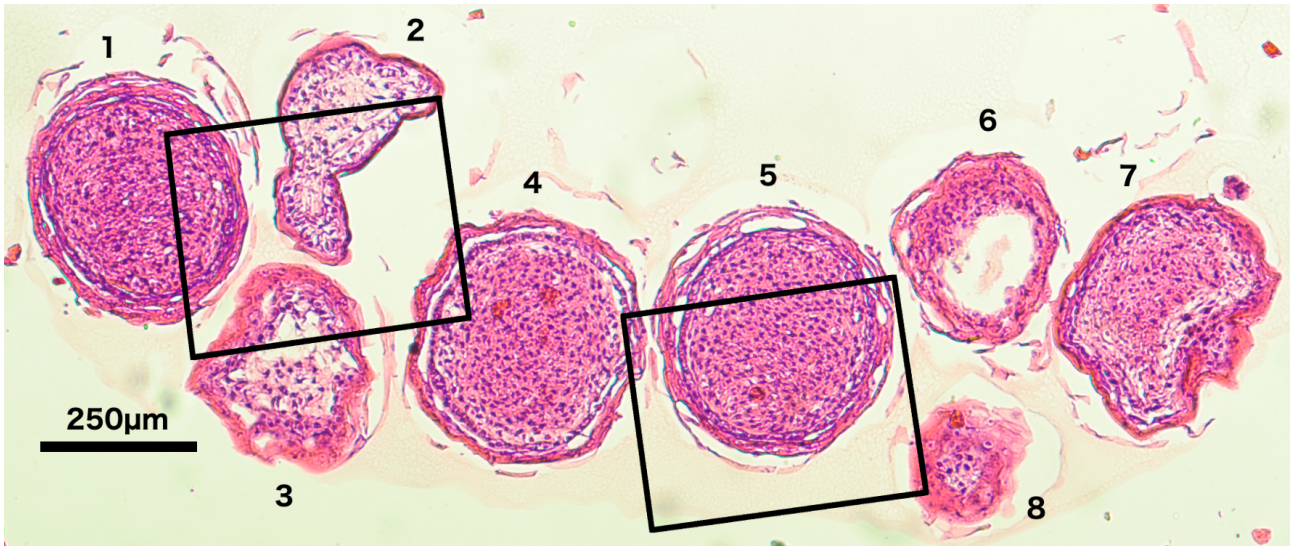
3D-Modelle weisen gegenüber der 2D-Modellen den Vorteil auf, dass sie die Bedingungen *in vivo* besser abbilden. Dies gilt für die Zell-Zell-Interaktion ebenso wie für die Proliferation und Genexpression der Zellen. In 3D-Modellen der Haut haben Keratinozyten das Potential durch terminale Differenzierung ein *Stratum corneum* auszubilden, welches auch *in vivo* eine Barriere gegenüber äußeren Einflüssen darstellt. Das *Stratum corneum* beeinflusst unter anderem die Penetration und Wirkentfaltung von Pharmaka. Deshalb sind 3D-Kulturen in der präklinischen Arzneimittelentwicklung geeignete humane Modellsysteme, die darüber hinaus dazu beitragen, Tierexperimente zu reduzieren. Dies gilt insbesondere für kombinierte 3D-Modelle, die aus Keratinozyten und Fibroblasten aufgebaut sind und damit den physiologischen Aufbau der Haut aus Dermis und Epidermis nachstellen. Das 3D-Kokultur-Modell der Firma InSphero, welches sich in der β -Testung befand, sollte aus diesen Gründen charakterisiert werden. Es sollte die Eignung für Untersuchungen von Arzneimittelwirkungen im unveränderten Zustand der Kultur sowie unter inflammatorischem Einfluss beurteilt werden.

3.3.1 Charakterisierung der 3D-Kokultur

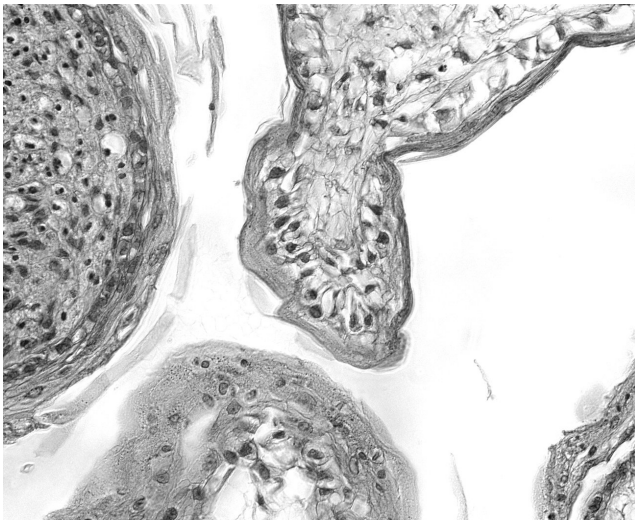
Das eingesetzte 3D-Kokultur-Modell der Haut wurde mit Hilfe der Hanging-Drop-Technik hergestellt. Hierbei wurden zunächst sphärische Mikrogewebe aus primären Fibroblasten erzeugt, auf denen im Anschluss primäre Keratinozyten kultiviert wurden. Bei ihrer Auslieferung befanden sich die Kulturen einzeln in den Wells einer GravityTRAP-96-Well-Platte. Sie wurden unbehandelt für fünf Tage inkubiert, bevor sie fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Es folgten die Anfertigung von Gewebeschnitten und deren Aufbringung auf Objektträger. Anhand verschiedener Färbungen sollte im Anschluss ihr histologischer Aufbau charakterisiert und die Differenzierung der Keratinozyten beurteilt werden.

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) konnte zunächst der sphärische Aufbau der Mikrogewebe dargestellt werden. In den Mikrosphären konnte ein zellreicher Kern identifiziert werden, auf dem verschiedene Schichten auflagern (Abbildung 26a). Das aus Fibroblasten aufgebaute eosinophile Zentrum wies diffus verteilte Kerne auf. Die Eosinophilie im Zentrum der Gewebe 2 und 3 war schwächer ausgeprägt als bei den anderen Geweben. Gewebe 3 und 6 wiesen Löcher im Zentrum auf. Konzentrisch nach außen folgte auf das Zentrum ein organisierter Ring mit zahlreichen Zellkernen, was zu einem eher basophilen Gesamteindruck führte. Hierbei handelte es sich um die erste Zellschicht aus Keratinozyten. Die Basalschicht war von einer stark eosinophilen äußeren Schicht umgeben, deren Zellen eine differenzierte Morphologie aufwiesen. Der Durchmesser der größten Sphären reichte im vorliegenden Objektträger bis ca. 375 μm , wobei auch deutlich kleinere Gewebsanschnitte auf dem Objektträger vorhanden waren. Diese stammten vermutlich aus der Kugelperipherie.

(a) gesamter Objektträger



(b) linker Kasten



(c) rechter Kasten

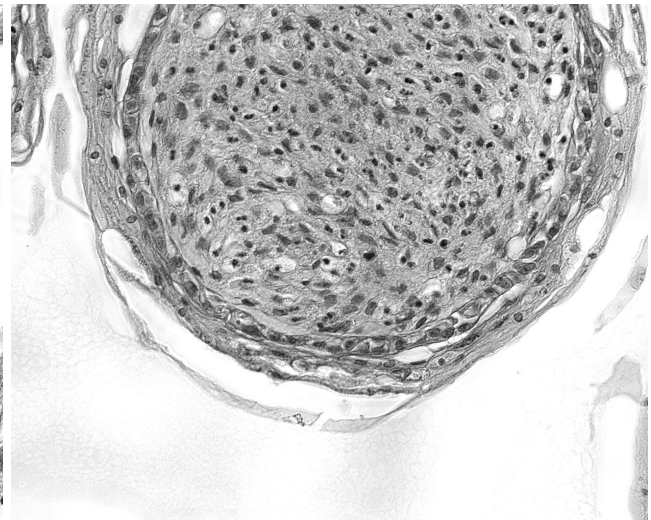


Abbildung 26:
Hämatoxylin-Eosin-Färbung der unbehandelten 3D-Kokultur nach 5-tägiger Inkubation

Für eine detailliertere Darstellung des Differenzierungszustands der Epidermis auf den Mikrosphären wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Der epidermale Anteil wurde dabei mit Antikörpern visualisiert, die verschiedene Zytokeratine der Epidermis binden (PanCK). Der bindegewebige Kern wurde mit dem Fibroblastenmarker S100A4 angefärbt. Nach 5-tägiger Inkubationszeit ließen sich durch die PanCK- und S100A4-Färbung der Gewebe die Keratinozyten und Fibroblasten voneinander abgrenzen (Abbildung 27a). Im epidermalen Teil konnten Zytokeratinsignale unterschiedlicher Qualität dargestellt werden. In der Basalschicht konnte ein feingranuläres Signal insbesondere perinukleär nachgewiesen werden. Außerdem waren netzartige Ausläufer in Richtung anderer Zellkerne vorhanden. Im Gegensatz dazu war das Signal in der Außenschicht durchgängig und flächenartig angelegt. Diese qualitativen Unterschiede zeigten sich auch in der quantitativen Auswertung der Signalintensität, welche in der Außenschicht signifikant gegenüber der Basalschicht gesteigert war. Das Zentrum der Mikrogewebe war positiv für S100A4. Die Anfärbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid-Trihydrochlorid (H33342) zeigte, dass die Zellkerne der Keratinozyten

größer waren als die der Fibroblasten. Dabei wiesen die Kerne innerhalb des epidermalen Teils noch Unterschiede auf. Die Kerne der Zellen in der basalen Schicht waren größtenteils rund, während die Kerne in den äußeren Schichten abgeflacht waren. Neben diesem qualitativen Unterschied, bestand mit einer signifikant niedrigeren Zellkerndichte in den äußeren Schichten auch ein quantitativer Unterschied. Diese Untersuchungsergebnisse deuteten auf einen Differenzierungsvorgang hin. Um die Keratinozytendifferenzierung nachzuweisen, wurden zusätzlich die terminalen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin in den Geweben mittels Immunfluoreszenzanalyse dargestellt (Abbildung 27b bis d). Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität in der äußeren gegenüber der basalen Schicht. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass durch die Differenzierung der Keratinozyten ein Äquivalent des *Stratum corneum* der Haut gebildet wurde.

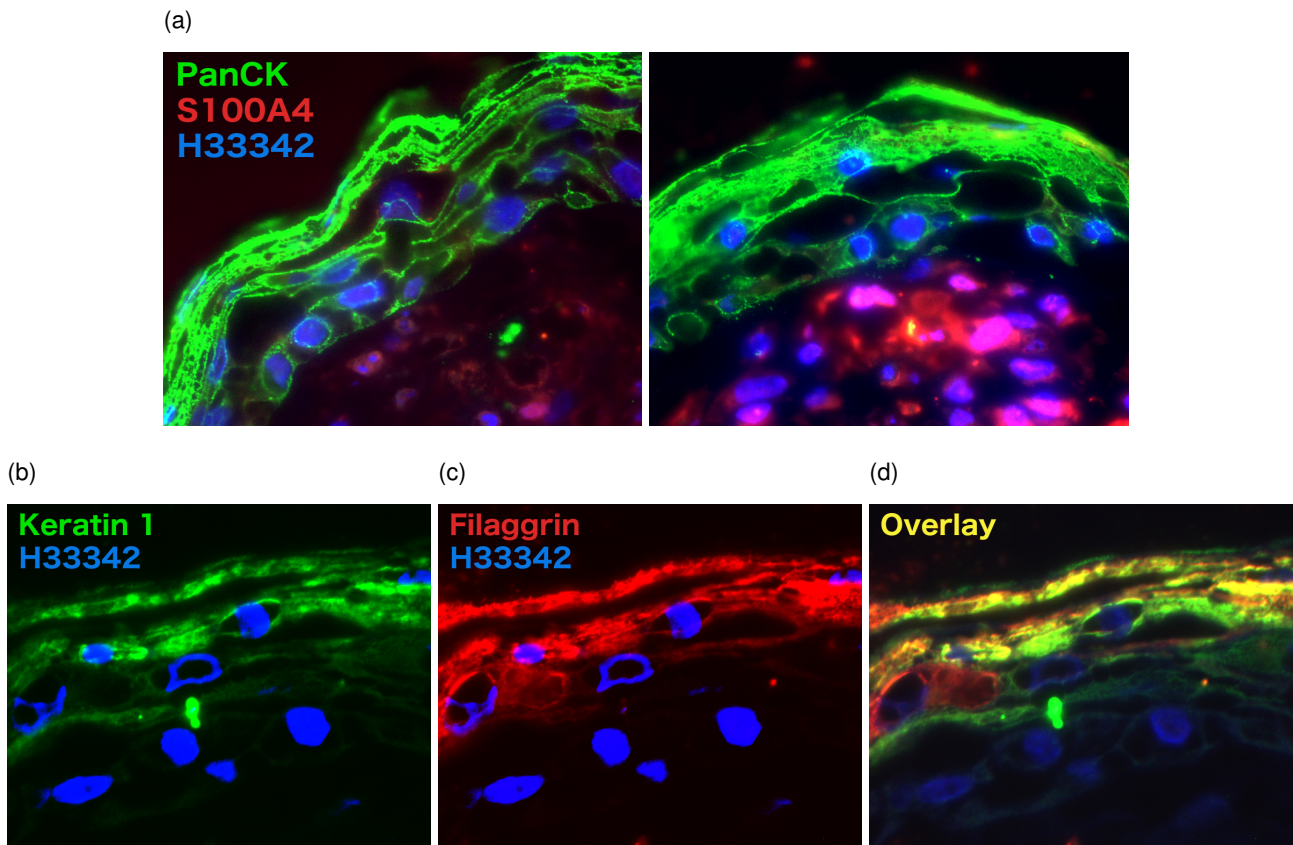


Abbildung 27:
Immunfluoreszenzanalyse der Expression in der unbehandelten 3D-Kokultur nach 5 Tagen **(a)** Doppelfärbungen von PanCK (grün) und S100A4 (rot), die Kernfärbung erfolgte mit H33342 (blau). **(b) - (d)** Doppelfärbung von Keratin 1 (b) und Filaggrin (c) einzeln und im Overlay (d), die Kernfärbung erfolgte mit H33342 (blau).

3.3.2 Einfluss von TNF α und Inositol-C2-PAF auf die Keratinozyten-Differenzierung

In dem 3D-Kokultur-Modell der Haut aus primären Keratinozyten und Fibroblasten konnte eine zunehmende Differenzierung der Keratinozyten in den höheren Schichten mit der Ausbildung eines *Stratum corneum* gezeigt werden. Daher eignete sich das Modell für Untersuchungen, in denen der mögliche therapeutische Einsatz von Inositol-C2-PAF an der Haut geprüft werden sollte. Es sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern der Wirkstoff die Differenzierung primärer Keratinozyten beeinflusst. Außerdem sollte mit TNF α , einem Schlüsselzytokin der psoriatischen Pathogenese, ein Entzündungszustand in dem Modell induziert werden. In dem inflammatorischen Milieu sollten ebenfalls die Effekte von Inositol-C2-PAF untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die 3D-Kokulturen für 5 Tage mit 1,25 μ M Inositol-C2-PAF, 1 ng/ml TNF α oder beidem in Kombination inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mikrogewebe. Ein möglicher Einfluss auf die Differenzierung der Keratinozyten wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse der Epidermismarker PanCK und der terminalen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin verfolgt. Zur Abgrenzung der Epidermis vom Bindegewebe wurde zusätzlich der Fibroblastenmarker S100A4 visualisiert. Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale wurde die mittlere Pixelintensität (kumulative Pixelintensität / Anzahl der Pixel) bestimmt. Diese wurde, sofern möglich, an zwei unterschiedlichen Stellen jedes Gewebes gemessen, woraus dann ein Durchschnittswert für jedes Gewebe gebildet wurde. Die arithmetischen Mittelwerte aus den Werten aller Gewebe einer Inkubationsbedingung sind in Abbildung 28 dargestellt. Die zwischen 4 und 9 schwankende Stichprobengröße (n) ist durch die Paraffinblöcke bedingt, bei denen je nach Anschnitt eine unterschiedliche Anzahl von Mikrogeweben getroffen wurde.

Unter der Behandlung mit TNF α , Inositol-C2-PAF und beidem in Kombination hat sich das Expressionsmuster der untersuchten Proteine qualitativ nicht verändert. Bei der Quantifizierung ließen sich jedoch Unterschiede feststellen. TNF α senkte das PanCK-Signal signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die zusätzliche Gabe von Inositol-C2-PAF hatte darauf keinen Einfluss. Das Signal der terminalen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin wurde im Gegensatz dazu durch TNF α signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Auch hier hatte die zusätzliche Gabe von Inositol-C2-PAF keinen Einfluss. Die Expression von S100A4 im Zentrum der Mikrogewebe wurde durch TNF α signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Durch die gleichzeitige Behandlung mit Inositol-C2-PAF konnte dieser Effekt signifikant vermindert werden.

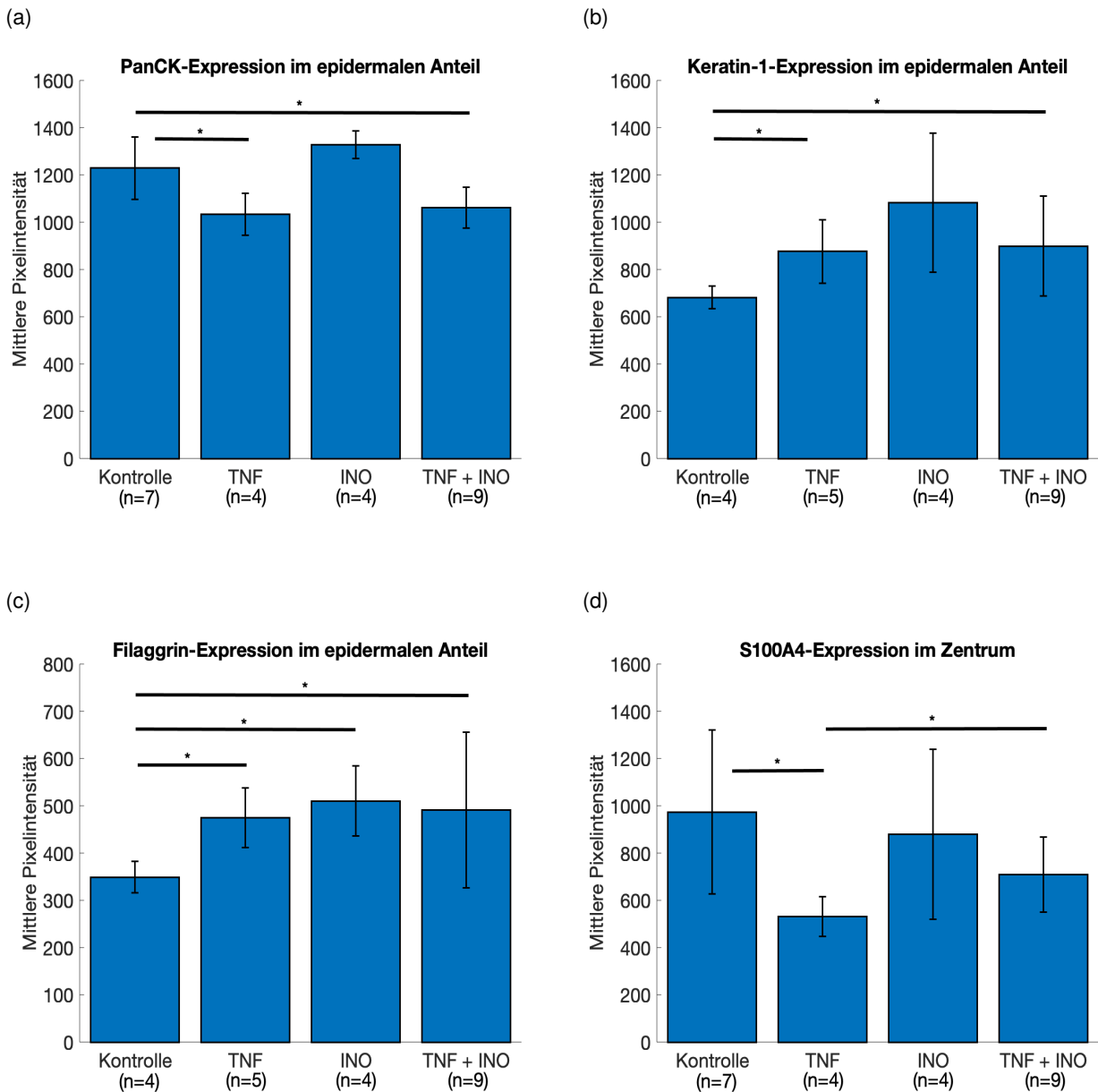


Abbildung 28: Expression verschiedener Marker in der 3D-Kokultur. Die Kulturen wurden über 5 Tage mit 1,25 μ M Inositol-C2-PAF, 1 ng/ml TNF α , beidem in Kombination oder nicht behandelt (Kontrolle). Es folgten die Paraffineinbettung, der Schnitt und die Fluoreszenzfärbung der Gewebe. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Programm ImageJ, indem die mittlere Pixelintensität (kumulative Pixelintensität / Anzahl der Pixel) bestimmt wurde. Sofern möglich, wurden bei jedem Gewebe zwei unterschiedliche Stellen gemessen, aus denen dann das arithmetische Mittel gebildet wurde. Die Werte aller Gewebe einer Bedingung wurden anschließend gemittelt und als Balken in den Diagrammen dargestellt. Die Anzahl (n) der Gewebe wurde für jeden Balken unterhalb der x-Achse aufgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Statistisch signifikante Unterschiede im T-Test wurden mit Sternchen gekennzeichnet.

4 Diskussion

Die Psoriasis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut mit erythematösen, beschuppten Plaques als häufigste Effloreszenz (11). Zu den teils schwerwiegenden Komorbiditäten gehört unter anderem ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit entsprechendem Einfluss auf die Mortalität sowie eine erhöhte Malignomgefahr (14). Therapeutisch stehen je nach Schwere der Erkrankung topische oder systemische Medikamente zur Verfügung (11). In dieser Arbeit sollte mit Inositol-C2-PAF ein Wirkstoff erforscht werden, der sich in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung befindet und potentiell für die topische Behandlung der Psoriasis in Frage kommen könnte.

4.1 Effekte von Inositol-C2-PAF in der 2D-Monokultur primärer Hautzellen

Die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf Hautzellen wurde *in vitro* vor allem an HaCaT-Keratinocyten erforscht. Wie alle immortalisierten Zelllinien unterscheiden sich die Zellen maßgeblich von den Zellen *in vivo*. Dies hat den Vorteil, dass die früh einsetzende Seneszenz primärer Zellen umgangen werden kann (57). Dementsprechend steht eine ausreichende Anzahl von Zellen mit konstanten Eigenschaften für die Forschung zur Verfügung. Nachteilig hingegen sind die genetischen Veränderungen der Zellen. Im Falle von HaCaT-Zellen handelt es sich dabei um Chromosomenaberrationen (59). Die Nutzung unveränderter primärer Zellen *in vitro* eröffnet die Möglichkeit Arzneimittelwirkungen *in vivo* besser einschätzen zu können.

Deswegen sollte die Forschung an Inositol-C2-PAF auf primäre Zellen der Haut erweitert werden. Dabei sollte der Fokus nicht ausschließlich auf den Keratinocyten, sondern auch auf den dermalen Fibroblasten liegen. Physiologisch stehen diese in engem Zusammenhang mit der Epidermis und zeigen bei Erkrankungen auch pathophysiologische Interaktionen mit den Keratinocyten. Sie tragen bei Erkrankungen wie der Psoriasis zu dem inflammatorischen Milieu bei, in dem die Keratinocyten zur Ausbildung ihres psoriatischen Phänotyps gebracht werden (76). Die primären Zellen, die in dieser Arbeit genutzt wurden, waren aus Präputien nach medizinisch indizierten Zirkumzisionen isoliert worden (positives Ethikvotum mit der Antragsnummer EA1/192/15).

4.1.1 Inositol-C2-PAF hemmt die metabolische Aktivität und reduziert die Biomasse primärer Zellen

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität und die Zellzahl von primären Keratinocyten sowie primären dermalen Fibroblasten quantifiziert. Um die metabolische Aktivität der Zellen zu bestimmen, wurde der MTT-Assay genutzt. Dieser basiert auf der Metabolisierung von MTT-Salz zu Formazan im mitochondrialen Stoffwechsel (74). Die Zellzahl in Form des Proteingehaltes wurde mit dem SRB-Assay gemessen (75). Die Zellen der einzelnen Spender wurden zuvor mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe des Wirkstoffes über 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. An die Messdaten wurde eine Hillfunktion angenähert, um die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Inositol-C2-PAF mathematisch zu beschreiben. Die Hillfunktion wurde 1910 eingeführt, um das Bindungsverhalten von Sauerstoff an Hämoglobin zu beschreiben (67). Seitdem hat sie in modifizierter Form auch in der Pharmakologie Anwendung gefunden

(68). Von besonderem Interesse bei der Quantifizierung der Wirkung von Inositol-C2-PAF war die mathematische Ermittlung der Wirkstoffkonzentration, bei der 50% des maximalen inhibitorischen Effektes eintreten (IC_{50}). Diese wurde für alle Spender und Inkubationszeiten einzeln berechnet. Um umfassendere Aussagen treffen zu können, wurde aus den spenderbezogenen Werten auch das arithmetische Mittel gebildet (Tabelle 15).

Tabelle 15:
 IC_{50} von Inositol-C2-PAF im MTT- und SRB-Assay mit primären Hautzellen
(Mittelwert \pm Standardabweichung)

	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Keratinocyten			
MTT-Assay	8,04 μ M (\pm 2,19)	5,81 μ M (\pm 1,64)	4,64 μ M (\pm 1,42)
SRB-Assay	5,49 μ M (\pm 3,25)	3,20 μ M (\pm 1,82)	2,55 μ M (\pm 1,05)
Fibroblasten			
MTT-Assay	23,43 μ M (\pm 1,98)	18,35 μ M (\pm 2,08)	14,72 μ M (\pm 3,65)
SRB-Assay	23,74 μ M (\pm 2,23)	14,04 μ M (\pm 2,36)	13,17 μ M (\pm 2,32)

Bei beiden untersuchten Zelltypen konnte sowohl im MTT- als auch im SRB-Assay eine zeitabhängige Zunahme der Potenz von Inositol-C2-PAF mit einer kontinuierlich sinkenden IC_{50} festgestellt werden. Der Rückgang der IC_{50} in beiden Assays mit steigender Inkubationszeit ließ sich mit einer einzigen Ausnahme (Spender PK 12 im MTT-Assay) auch auf individueller Ebene beobachten. Vor dem Hintergrund eines verhältnismäßig geringen zellulären Abbaus von Inositol-C2-PAF, lässt sich die vorliegende Potenzzunahme des Wirkstoffes über die Inkubationszeit erklären. Inositol-C2-PAF weist im Gegensatz zu seinem engen strukturellen Verwandten Glc-C2-PAF in HaCaT-Zellen eine deutlich längere Halbwertszeit auf (35).

In allen Untersuchungen bestätigte sich, dass die primären Keratinocyten deutlich sensitiver gegenüber den Einflüssen durch Inositol-C2-PAF sind als die Fibroblasten. Die IC_{50} in beiden Assays und zu allen Inkubationszeiten unterschied sich signifikant um das Drei- bis Fünffache. Je nach eingesetzter Substanz lassen sich in der Literatur unterschiedlich starke Einflüsse auf primäre Fibroblasten und Keratinocyten finden. Bei der Behandlung mit sechs verschiedenen Antiseptika durch Damour et al. wurde im MTT-Assay lediglich bei einem Wirkstoff eine niedrigere IC_{50} bei den Keratinocyten als bei den Fibroblasten gefunden. Bei allen anderen Substanzen war die IC_{50} bei den Fibroblasten niedriger (77). Ölschläger et al. wiesen im Gegensatz dazu bei primären Fibroblasten unter der Behandlung mit Natriumlaurylsulfat (SDS) im NRU-Assay eine im Vergleich zu Keratinocyten vervielfachte IC_{50} nach (78).

Zusammenfassend lässt sich für Inositol-C2-PAF in der kutanen Anwendung vorwiegend ein Effekt auf die Epidermis antizipieren, der im zeitlichen Verlauf zunimmt.

4.1.2 Gegenüberstellung des MTT- und des SRB-Assays in der 2D-Monokultur

Während der MTT-Assay die mitochondriale Aktivität der untersuchten Zellen misst, erfasst der SRB-Assay ihren Proteingehalt. Die Mechanismen, die einer Abnahme der Signale zu Grunde liegen können, sind in beiden Assays jedoch die selben. Eine Erniedrigung kann durch eine verminderte Proliferation und/oder eine verminderte Viabilität aufgrund von Apoptose oder Nekrose hervorgerufen werden. Daher finden beide Assays Anwendung in der *in vitro*-Evaluation toxischer Effekte von Wirkstoffen. Vajrabhaya et al. haben beispielsweise die Toxizität der pulverisierten Pflanze *Clinacanthus nutans* an murinen Fibroblasten untersucht. Dafür wurden beide Assays genutzt und anschließend miteinander verglichen, wobei keine relevanten Unterschiede zwischen den Tests festgestellt wurden (79). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Potenz von Inositol-C2-PAF in Bezug auf die Erniedrigung des Proteingehalts im SRB-Assay stärker ist als auf die metabolische Aktivität im MTT-Assay. Diese Tendenz konnte bei den primären Keratinozyten bereits nach 24 Stunden beobachtet werden, während sie bei den dermalen Fibroblasten erst ab einer 48-stündigen Inkubationszeit einsetzte (Abbildung 29). Auch wenn die Differenzen der IC_{50} -Werte aufgrund interindividueller Schwankungen lediglich bei den primären Fibroblasten nach 48 Stunden einer Signifikanztestung standhielten, so war die Tendenz einer verstärkten Hemmung der Proteinmasse gegenüber der metabolischen Aktivität auch bei den Keratinozyten deutlich vorhanden und konstant zu beobachten.

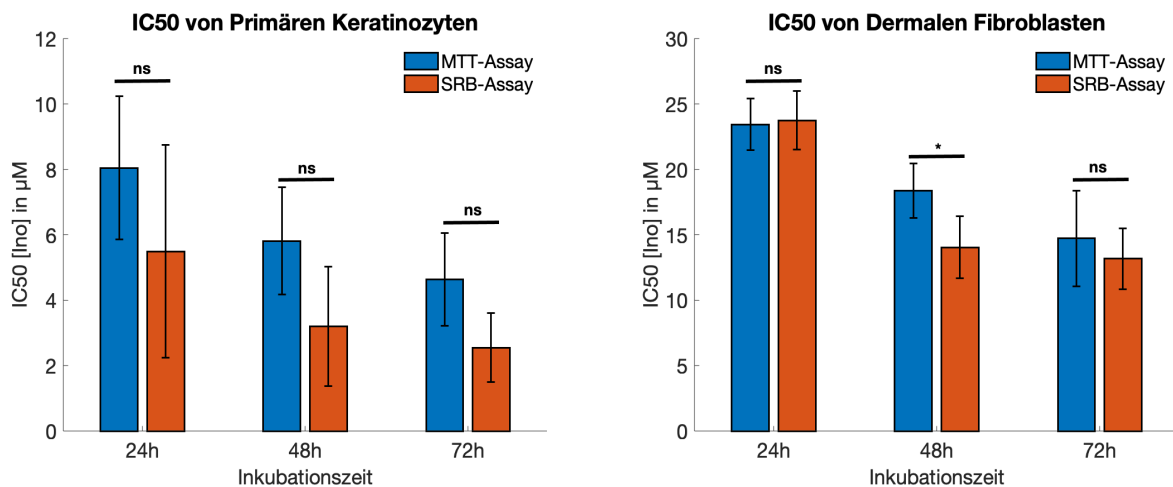


Abbildung 29:

Vergleich des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität (MTT-Assay) und die Biomasse (SRB-Assay) primärer Hautzellen. Die IC_{50} beschreibt die Wirkstoffkonzentration, bei der die metabolische Aktivität bzw. die Biomasse um 50% gegenüber der Kontrolle reduziert ist. Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel der IC_{50} der individuellen Spender, wobei bei den Fibroblasten mindestens 4 ($n \geq 4$) und bei den Keratinozyten mindestens 3 Spender ($n \geq 3$) in die Berechnung einfließen. Die Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab und signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Aufgrund der ausreichenden Zahlen an isolierten Fibroblasten konnten die im SRB-Assay verwendeten Spender auch für den MTT-Assay genutzt werden. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der Effekte von Inositol-C2-PAF auf individueller Ebene. Nach 24 Stunden konnte die jeweilige IC_{50} bei den Spendern PF 5 und PF 6 mit der maximal eingesetzten Wirkstoffkonzentration von 20 μM nicht erreicht werden. Daher wurden die Wirkstoffkonzentrationen bei den weiteren Spendern erhöht, was die Interpolation der IC_{50} ermöglichte. Es zeigte sich bei den Spendern PF 8 und PF 10 nahezu kein Unterschied in der IC_{50} , während bei Spender PF 7 und PF 9 die IC_{50} im MTT-Assay leicht unterhalb

derer im SRB-Assay lag. Ein deutlicher Unterschied in der Potenz des Wirkstoffes war also auch auf individueller Ebene bei den Fibroblasten nach 24 Stunden nicht vorhanden. Nach 48 Stunden konnte die IC_{50} von Spender PF 5 im MTT-Assay mit der maximal eingesetzten Konzentration von 20 μM erneut nicht erreicht werden. Die IC_{50} ließ sich im SRB-Assay im Gegensatz dazu erreichen. Dies ist Ausdruck der höheren Potenz des Wirkstoffes bei der Hemmung der Proteinmasse und wurde durch den Vergleich der IC_{50} -Werte der weiteren Spender (PF 6, PF 7 und PF 8) nach 48-stündiger Inkubation ebenfalls bestätigt (Abbildung 30). Gleiches zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit dem Spender PF 8 als einziger Ausnahme. Ein direkter Vergleich vom MTT- und SRB-Assay beim selben Spender war für die Keratinozyten nicht möglich, da keine ausreichende Anzahl an Zellen aus den Präputien isoliert werden konnte, um beide Assays durchzuführen. Stattdessen mussten für die Assays verschiedene Spender herangezogen werden.

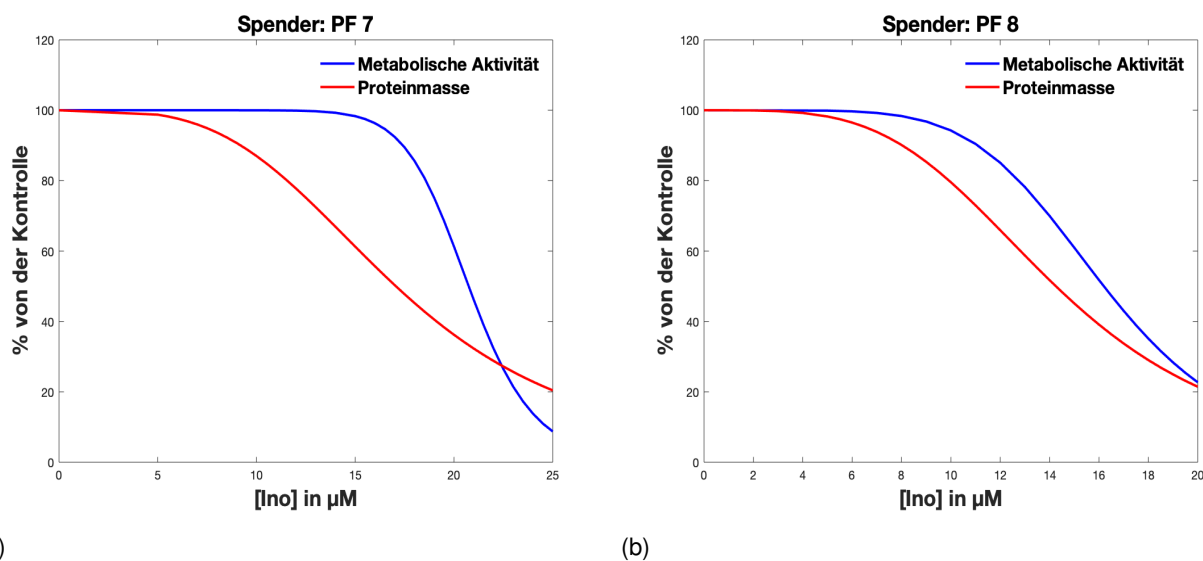


Abbildung 30: Unterschiede im Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität und Proteinmasse von primären dermalen Fibroblasten nach 48-stündiger Inkubationszeit. Die metabolische Aktivität wurde mit dem MTT-Assay und die Biomasse mit dem SRB-Assay bestimmt. An die Messwerte wurden die hier abgebildeten Hillfunktionen modelliert, um die jeweilige IC_{50} zu ermitteln.

4.1.3 Beeinflussung des mTOR-Signalings als möglicher Mechanismus der Inositol-C2-PAF-Wirkung

Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der metabolischen Aktivität und der Biomasse von primären Hautzellen unter steigenden Inositol-C2-PAF-Konzentrationen kann verschiedene Ursachen haben. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Senkung der Proliferationsrate durch den Wirkstoff. Dieser senkt bei HaCaT-Keratinozyten zumindest innerhalb der ersten 24 Stunden der Inkubation den Anteil von Zellen in proliferativen Zellzyklusphasen zugunsten von nicht proliferierenden Zellen (35). Die Induktion der Apoptose stellt eine weitere potentielle Ursache dar. Sie konnte ebenfalls an HaCaT-Keratinozyten insbesondere nach 48-stündiger Inkubation mit Inositol-C2-PAF beobachtet werden (35). Mittels Jurkat-Zellen wurde der molekulare Mechanismus der Apoptoseinduktion durch den Wirkstoff aufgeklärt. Inositol-C2-PAF führt demzufolge unabhängig vom FAS-Rezeptor zur Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges bei gleichzeitiger Aktivierung des intrinsischen Signalweges (46). Als weiterer Erklärungsansatz für die Abnahme der Biomasse und der metabolischen Aktivität kann die Lyse der Zellen durch den Wirkstoff gesehen werden. Der Mechanismus, mit dem

glykosidierte Phospholipide wie Inositol-C2-PAF zur Zelllyse führen, wurde an einem weiteren Vertreter der Stoffklasse, Glc-PAF, erforscht. Dabei zeigte sich eine Porenbildung in der Zellmembran durch die Interkalation des Wirkstoffes (45). Mit dem LDH-Assay konnten bei HaCaT-Keratinocyten die lytischen Eigenschaften von Inositol-C2-PAF unter dem Einsatz höherer Konzentrationen nachgewiesen werden. Die halbmaximal letale Konzentration (LC₅₀) lag bei 15 µM, während die Proliferation der Zellen bereits bei 1,8 µM halbiert wurde (35). Differenzen zwischen der IC₅₀ und der LC₅₀ konnten auch bei den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 festgestellt werden (Tabelle 16).

Die Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und Lyse sind also potentielle Ursachen für die Abnahme der Biomasse und metabolischen Aktivität der primären Hautzellen. Sie könnten auch kombiniert vorliegen, wobei anzunehmen wäre, dass mit zunehmender Inkubationszeit der Einfluss der Apoptose gegenüber der Proliferationshemmung steigt, während in besonders hohen Konzentrationen die Zelllyse dominiert.

Um die möglichen Ursachen klar voneinander abzugrenzen, sind der MTT- und SRB-Assay nicht geeignet. Stattdessen müsste weitere Forschung mit erweiterten Untersuchungsmethoden durchgeführt werden.

Tabelle 16:

Halbmaximal antiproliferative bzw. letale Konzentration (IC₅₀ bzw. LC₅₀) von Inositol-C2-PAF in der Behandlung verschiedener Zelltypen über 48 Stunden

Zelltyp	IC ₅₀	LC ₅₀	Quelle
HaCaT	1,8 µM	15 µM	(35)
MCF-7	3,5 µM	9,3 µM	(80)
MDA-MB-231	3,5 µM	7,4 µM	(80)

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen, die die beobachteten Phänomene hervorrufen könnten. In Untersuchungen an HaCaT-, MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen konnte übereinstimmend nachgewiesen werden, dass Inositol-C2-PAF die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB, AKT) an Position S473 reduziert (80). Das Signalezym PKB weist mit T308, T450 und S473 drei wichtige Phosphorylierungspositionen auf. Die Phosphorylierung an Position S473 ist durch die Kinase mTOR reguliert, was einen Einfluss von Inositol-C2-PAF auf mTOR nahelegt. Die Kinase kommt in zwei verschiedenen Komplexen vor (mTORC1 und mTORC2). Während mTOR als Teil vom zweiten Komplex (mTORC2) an der Initiation der Signaltransduktion durch die PKB beteiligt ist, wird mTOR als Teil vom ersten Komplex (mTORC1) indirekt von der PKB aktiviert (80, 81). Aktives mTORC1 induziert durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Zielstrukturen die Proteinbiosynthese in den Zellen. Dabei lassen sich die translatierten Proteine funktionell unterschiedlich zuordnen. Eine Gruppe bilden Moleküle der ribosomalen Proteinsynthese, wodurch die Translation und damit die anabole Stoffwechsellage weiter verstärkt werden. Durch eine andere Gruppe an Proteinen wird der mitochondriale Stoffwechsel erhöht, womit die notwendige Energie für die anabole Stoffwechsellage bereitgestellt werden kann. Gleichzeitig wird die Synthese von proliferativen Proteinen gesteigert (82). Reziprok wird durch die Expression antiapoptotischer Proteine der programmierte Zelltod gehemmt (83).

Die vielfältigen Wirkungen von mTOR und der Umstand, dass Inositol-C2-PAF dessen Aktivität modifizieren kann, bieten Erklärungsansätze für die erhobenen Ergebnisse. Auch dass die Hemmung der metabolischen Aktivität unter Einfluss des Wirkstoffes tendenziell erst nach der Senkung der Proteinmasse eintritt, ist auf physiologischer Ebene schlüssig. Schließlich stellt die Energiegewinnung die Grundlage für die Proteinbiosynthese dar. Gleichzeitig bietet das mTOR-Signaling einen molekularbiologischen Hinweis, dass auch die Abnahme der Proliferation und die Zunahme der

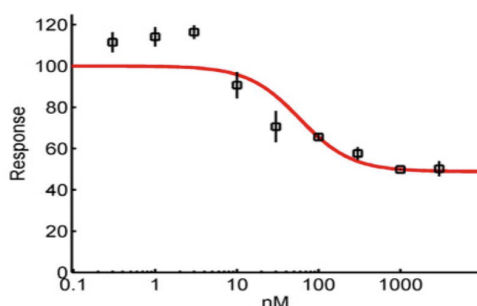
Apoptose an der Abnahme der Proteinmasse und metabolischen Aktivität beteiligt sein können.

4.1.4 Induktion der metabolischen Aktivität primärer Fibroblasten mit niedrigen Inositol-C2-PAF-Konzentrationen

Bei primären dermalen Fibroblasten hat die Behandlung mit Inositol-C2-PAF in niedrigen Konzentrationen zu einer Induktion der metabolischen Aktivität geführt, bevor in den höheren Konzentrationen der hemmende Effekt eingesetzt hat. Nach 24 Stunden trat dies bei allen und nach 48 Stunden bei der Hälfte der Spender auf. Die Höhe der induktiven Wirkstoffkonzentration variierte dabei zwischen den Spendern. Nach 72 Stunden war kein erhöhter MTT-Metabolismus unter der Gabe von Inositol-C2-PAF mehr feststellbar. Die beobachteten Effekte traten also bei individuellen Konzentrationen auf und nahmen mit der Inkubationszeit ab. Im SRB-Assay ergab sich im Gegensatz dazu kein deutlicher Anhalt für eine grundsätzliche induktive Wirkung auf die Proteinmasse. Lediglich bei den Spendern PF 8 und PF 9 war nach 24 Stunden die Proteinmasse bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen erhöht. Bei allen anderen Spendern und zu jeder anderen Inkubationszeit war dies nicht Fall. Bei den Keratinozyten traten weder im MTT- noch im SRB-Assay Signalerhöhungen unter Inositol-C2-PAF-Therapie auf.

Für den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die metabolische Aktivität war zuvor ein monophasischer, sigmoidaler Kurvenverlauf antizipiert worden. Daher wurde die Hillfunktion als Näherungsfunktion gewählt. Dieses Modell weist in der Abbildung des tatsächlichen, biphasischen Verlaufs der Daten in den oben beschriebenen Fällen Schwächen auf. Das Problem mit biphasischen Verläufen von Daten haben Di Veroli et al. in ihrer Analyse von über 11.000 Dosis-Wirkungs-Kurven erkannt. Obwohl ca. 70% der Kurvenverläufe monophasisch waren, ergaben sich für die übrigen Daten passendere Annäherungsmodelle. Am häufigsten darunter vertreten waren biphasische Verläufe mit einer stimulativen Komponente (ca. 20%). Um mathematisch eine bessere Annäherung an die Daten zu ermöglichen, haben Di Veroli et al. das klassische Hill-Modell modifiziert (Abbildung 31). Für Konzentrationsbereiche mit unterschiedlicher Wirkung werden dabei jeweils eigene Hillfunktionen erstellt, die dann ein Gesamtmodell ergeben (66).

(a) Klassische Hillfunktion



(b) biphasisch stimulierend-inhibitorischer Kurvenverlauf

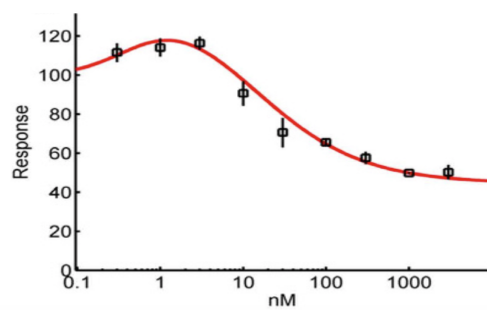


Abbildung 31:

Gegenüberstellung der klassischen (a) und der modifizierten Hillfunktion nach Di Veroli et al. (b) als Näherungsfunktionen an die im SRB-Assay ermittelten Daten von murinen pankreatischen Tumorzellen (KPC-K8484) unter der Behandlung mit Gemcitabin (66)

Auch wenn sich mit diesem Hill-Modell nach Di Veroli et al. eine bessere Annäherung an die Daten

der Spender erreichen ließe, bleibt weiterhin die Frage bestehen, worauf der Effekt beruht. An dieser Stelle wären weitere Untersuchungen notwendig. Ein möglicher Erklärungsansatz bietet der Umstand, dass Anti-Tumor-Phospholipide (ATLs) direkt auf Mitochondrien wirken können. Mollinedo et al. haben gezeigt, dass das ATL Edelfosin an isolierten, murinen Mitochondrien die Öffnung der Permeability-Transition-Pore (PTP) der inneren Mitochondrienmembran induziert. Die Folge ist das Anschwellen der Mitochondrien und gegebenenfalls die Induktion des intrinsischen Apoptoseweges (84). Die erhöhte Membranpermeabilität könnte möglicherweise auch zu einer erhöhten MTT-Aufnahme in die Mitochondrien führen. Das würde einen höheren Umsatz des Salzes zu Formazan erklären.

4.1.5 Einflussfaktoren auf primäre Hautzellen

Insgesamt ließ sich feststellen, dass zwischen den Spendern trotz gleicher Zellzahl sowohl bei der metabolischen Aktivität als auch bei der Proteinmasse Unterschiede bestanden. Besonders ausgeprägt waren diese Unterschiede beispielsweise beim MTT-Assay dermalen Fibroblasten nach 72 Stunden, wo die niedrigste individuelle IC_{50} 11,58 μ M und die höchste 19,88 μ M betrug. Ähnliches war auch im SRB-Assay der primären Keratinozyten nach 24 Stunden zu beobachten. Hier lag der niedrigste Wert bei 3,10 μ M und der höchste bei 9,19 μ M. Diese teilweise deutlichen Schwankungen sind darauf zurückzuführen, dass die Zellen von verschiedenen Individuen stammen und dementsprechend in ihrer genetischen Ausstattung ebenso divers sind wie ihre Spender. Bei immortalisierten Zelllinien bestehen keine genetische Unterschiede untereinander. Dies führt zu geringeren Schwankungen der Ergebnisse. Gleichzeitig bestehen dabei allerdings die entscheidenden Nachteile, dass die Zellen unnatürliche genetische Veränderungen aufweisen und keinerlei genetische Diversität repräsentieren.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die in dieser Arbeit verwendeten primären Hautzellen ist der Umstand, dass die Zellen von kindlichen Präputien nach medizinisch indizierter Zirkumzision isoliert worden sind. Eine Indikation für die Zirkumzision ab einem Alter von 4 Jahren ist das Vorliegen einer Phimose, die auf eine konservative Therapie nicht ausreichend anspricht. Als Phimose wird eine Vorhautverengung bezeichnet, die die vollständige Retraktion des Präputiums über die *Glans penis* verhindert. In einer ersten Stufe ist daraufhin eine konservative Therapie mit einer 0,05%igen Dexamethason-Salbe indiziert. Nur wenn die Salbentherapie erfolglos bleibt, kommt es zur operativen Versorgung der Phimose. Ein weiterer Grund für eine Zirkumzision im Rahmen einer Phimose kann die Balanoposthitis, also die Entzündung von Vorhaut und *Glans penis*, sein. Nach einer konservativen entzündungshemmenden und antiinfektiösen Therapie ist im entzündungsfreien Intervall eine Operation indiziert. Auch der makroskopische Verdacht auf eine *Balanitis xerotica obliterans* stellt eine Indikation zur Zirkumzision dar. Als Grunderkrankung liegt dabei mit dem Lichen Sclerosus eine chronisch inflammatorische Hauterkrankung vor (85). Die Präputien, die in dieser Arbeit zur Zellisolation genutzt wurden, könnten also pathologisch bzw. inflammatorisch verändert sein. Außerdem wäre eine Vorbehandlung mit Steroiden und Antiinfektiva möglich.

4.2 Die 3D-Kokultur der Firma InSphero als Hautmodell

Zur Erforschung von Arzneimitteln für den kutanen Einsatz stehen *in vitro* zweidimensionale (2D) und dreidimensionale (3D) Modelle zur Verfügung. Zu den Vorteilen letzterer gehört die bessere Abbildung der Zelleigenschaften *in vivo* aufgrund von Zell-Zell-Interaktionen und der möglichen terminalen Differenzierung der Zellen (53). Diese äußert sich bei Keratinozyten durch die Bildung eines *Stratum corneum* (2). Durch die Kokultur von Keratinozyten und Fibroblasten lassen sich 3D-Modelle weiter an die Haut annähern, da nicht nur die Epidermis sondern auch die Dermis berücksichtigt wird. Die Firma InSphero hat ein solches Modell aus primären Zellen mit der Hanging-Drop-Methode hergestellt. Dieses Modell wurde im Rahmen seiner β -Testung für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

4.2.1 Die 3D-Kokultur weist eine regelrechte Differenzierung der Keratinozyten auf

Für die Charakterisierung der 3D-Kokultur primärer Keratinozyten und Fibroblasten wurden Mikrogeewebe genutzt, die unbehandelt über 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse der epithelspezifischen Keratine (PanCK) und des Fibroblastenmarkers S100A4 konnten die beiden Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden (5, 8). Die Keratinozyten bildeten dabei eine Hülle um den fibroblastenhaltigen Kern der Gewebe. Direkt an der Grenze zum Gewebekern bildeten die Keratinozyten eine Basalschicht, in der die Zellkerne geordnet nebeneinander aufgereiht waren und in denen die Zytokeratine feingranulär, insbesondere perinukleär exprimiert wurden. Die verwendete Zytokeratinfärbung ist nicht spezifisch für ein bestimmtes Zytokeratin, sondern bildete verschiedene Keratine ab. Typische basale Keratine, die hier zu erwarten wären, sind Keratin 5 und Keratin 14 (5, 86). In den suprabasalen Schichten der 3D-Kokulturen nahm die Signalintensität der unspezifischen Zytokeratinfärbung zu. In der Haut verändern sich mit der nach apikal zunehmenden Differenzierung auch die dominierenden Keratintypen. Keratin 1 wird dabei suprabasal exprimiert und gilt als terminaler Differenzierungsmarker (5, 86). Die Expression von Keratin 1 konnte auch in dem 3D-Kokultur-Modell suprabasal nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis auf den Differenzierungsprozess, den die Keratinozyten in der Kultur durchliefen, war die überwiegend suprabasale Expression von Filaggrin. Filaggrin ist als Vernetzungsprotein der Keratinfilamente ebenfalls ein terminaler Differenzierungsmarker von Keratinozyten (6). Die beobachtete Abnahme der Zellkerndichte innerhalb der Keratinozytenschicht des Modells deutete ebenfalls auf eine Differenzierung der Zellen hin, die in der Haut mit dem Verlust von Zellkernen und -organellen einhergeht (2).

Insgesamt weisen die Gewebe also sowohl einen dermalen als auch einen epidermalen Anteil auf, von dem letzterer mehrschichtig ist und eine zunehmende Differenzierung nach außen hin zeigt. Damit ist die 3D-Kokultur der Firma InSphero aus primären Keratinozyten und Fibroblasten ein *in vitro*-Modell der Haut, das die Situation *in vivo* zufriedenstellend abbildet. Als alternative 3D-Modelle mit vorhandener Keratinozytendifferenzierung sind das EpiKutis-, das EpiDerm- und das SkinEthic-Modell zu nennen, die jedoch keinen fibroblastenhaltigen, dermalen Anteil aufweisen (60, 87, 88). Alternative, fibroblastenhaltige Hautmodelle können mittels Bioprinting oder mit einer konventionellen Kultur hergestellt werden (61).

4.2.2 Effekte von Inositol-C2-PAF auf die Keratinozytendifferenzierung in der normalen und entzündlich veränderten 3D-Kokultur

Das 3D-Kokultur-Modell der Haut von der Firma InSphero war aufgrund der terminalen Differenzierung seiner Keratinozyten gut geeignet, um weitere Untersuchungen durchzuführen. Zum einen sollte die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Keratinozytendifferenzierung analysiert werden. Außerdem sollte ein inflammatorisches Milieu induziert werden, um entzündliche Hauterkrankungen wie die Psoriasis zu simulieren. Schließlich sollte die Wirkung von Inositol-C2-PAF auch in diesem Zusammenhang erforscht werden. Die 3D-Kokulturen wurden dafür über 5 Tage mit 1,25 μM Inositol-C2-PAF, 1 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ oder beidem in Kombination behandelt.

$\text{TNF}\alpha$ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt ist. Es aktiviert durch extrazelluläre Bindung seiner Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) komplexe Signalkaskaden mit entsprechend vielfältigen Effekten. Ein zentraler Mechanismus ist dabei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$, der daraufhin die Transkription zahlreicher inflammatorischer Gene initiiert (89). Darunter befinden sich beispielsweise Adhäsionsmoleküle, Chemokine und weitere Zytokine (90). $\text{TNF}\alpha$ ist in der Pathogenese der Psoriasis ein zentrales Zytokin mit Verbindung zur IL-23/IL-17- sowie IL-12/IFN- γ -Achse (20, 21). Inositol-C2-PAF hat im Gegensatz zu $\text{TNF}\alpha$ ein antientzündliches Wirkprofil. Die Expression inflammatorischer Gene in HaCaT-Keratinozyten konnte durch den Wirkstoff gesenkt werden (42). Auch die Induktion von Adhäsionsmolekülen durch $\text{TNF}\alpha$ in humanen Endothelzellen wurde durch Inositol-C2-PAF antagonisiert (49).

Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ hat in den 3D-Kokulturen zu verschiedenen Effekten geführt. Die Intensität der unspezifischen Keratinfärbung (PanCK) ist gesunken. In der Psoriasis liegt je nach untersuchtem Keratin ein unterschiedliches Expressionsverhalten vor. Die Keratine 1 und 10 werden vermindert und die Keratine 6 und 16 vermehrt exprimiert (25, 26). Da alle diese Keratine von den verwendeten Antikörpern detektiert wurden, lassen sich die Ergebnisse ohne Zusatzinformationen schwer interpretieren. In der spezifischen Färbung von Keratin 1 kam es unter Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ zu einer Signalverstärkung. Das stellt eine Veränderung dar, die untypisch für die Psoriasis ist. Gleiches gilt für die Filaggrinexpression, die unter der $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung stieg, obwohl sie in der Psoriasis reduziert ist (27). Smiths et al. haben in ihrem inflammatorischen 3D-Monokulturmodell mit immortalisierten humanen N/TERT-Keratinozyten erfolgreich eine Reduktion von Filaggrin erreicht (91). In der hier verwendeten 3D-Kokultur ist unter der Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ die Expression von S100A4 im dermalen Anteil signifikant gesunken. Auch dies ist ein Ergebnis, das nicht mit psoriatischen Läsionen *in vivo* vereinbar ist, in denen eine Erhöhung des Proteins vorliegt (24).

Unter Einfluss von Inositol-C2-PAF haben sich prodifferentielle Effekte in der 3D-Kokultur gezeigt. Filaggrin als terminaler Differenzierungsmarker von Keratinozyten konnte signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert werden. Keratin 1 als weiterer terminaler Differenzierungsmarker war ebenfalls gesteigert, wobei diese Ergebnisse bei einer deutlichen Streuung keinem Signifikanztest standhielten. Die prodifferentiellen Effekte von Inositol-C2-PAF in der Kokultur decken sich mit den Erkenntnissen zu immortalisierten HaCaT-Keratinozyten. HaCaT-Zellen exprimieren unter der Behandlung mit dem Wirkstoff vermehrt Involucrin und ihre Transglutaminaseaktivität kann gesteigert werden (35). Diese Ergebnisse demonstrieren eine Induktion der Keratinozytendifferenzierung durch

Inositol-C2-PAF.

Im Gegensatz zu den Keratinozyten wurden die Fibroblasten durch Inositol-C2-PAF nicht beeinflusst. Die S100A4-Expression zeigte keinen Unterschied. Dieser Befund ist aus mehreren Gründen plausibel. In dieser Arbeit konnte über einen Zeitraum von 72 Stunden gezeigt werden, dass die IC_{50} primärer Fibroblasten in der 2D-Kultur bezüglich der metabolischen Aktivität bei $14,72 \mu\text{M}$ und bei $13,17 \mu\text{M}$ für die Proteinmasse liegt. Die eingesetzte Wirkstoffkonzentration im 3D-Modell von $1,25 \mu\text{M}$ entspricht nur etwa einem Zehntel davon. Zudem dringt der Wirkstoff mittels Diffusion in die sphärischen Gewebe ein und dementsprechend nimmt sein Einfluss mit der Penetrationstiefe ab (55). Außerdem ist mit den terminal differenzierten Keratinozyten eine zusätzliche Diffusionsbarriere im Sinne eines Cornified-Envelopes vorhanden (6). Die für Fibroblasten ohnehin geringe Wirkstoffkonzentration von $1,25 \mu\text{M}$ ist somit in der Gewebetiefe noch weiter reduziert.

Inositol-C2-PAF in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ führte in den 3D-Kokulturen zu ähnlichen Effekten wie die $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung. Die Expression der terminalen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Filaggrin wurde signifikant gesteigert, während die Gesamtexpression von Zytokeratinen (PanCK) signifikant reduziert war. Inositol-C2-PAF zeigte in der Kombinationsbehandlung also einen geringeren Einfluss auf die Keratinozyten als $\text{TNF}\alpha$.

Auch wenn die prodifferentiellen Eigenschaften von Inositol-C2-PAF sich in der 3D-Kokultur bestätigt haben, konnte das Modell jedoch nicht mit $\text{TNF}\alpha$ inflammatorisch im Sinne der Psoriasis verändert werden. Möglicherweise würde dies mit einem erweiterten Zytokinmix gelingen. Semini et al. nutzten zur inflammatorischen Modifikation ihrer HaCaT-2D-Kultur einen Zytokinmix aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\alpha$, IL17 , IL22 , und Onkostatin-M (44). Smiths et al. haben in ihrem 3D-Monokulturmodell mit immortalisierten humanen N/TERT-Keratinozyten eine Kombination aus $\text{TNF}\alpha$, IL6 und $\text{IL1}\alpha$ genutzt (91).

4.3 Zusammenfassung unter Berücksichtigung der Ausgangsfragestellungen

Die Frage, wie Inositol-C2-PAF die metabolische Aktivität sowie den Proteingehalt primärer humaner Hautzellen beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass der Wirkstoff sowohl die metabolische Aktivität als auch den Proteingehalt konzentrationsabhängig reduziert. Die Potenz nahm dabei mit steigender Inkubationszeit zu. Zwischen den beiden untersuchten primären humanen Zelltypen zeigte Inositol-C2-PAF einen Unterschied in seinem Einfluss, wobei die Potenz bei den primären Keratinozyten deutlich größer war als bei den dermalen Fibroblasten.

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich das 3D-Kokulturmodell der Haut von der Firma InSphero für die präklinische Anwendung in der pharmakologischen Forschung eignet, da sich ein organtypischer Aufbau mit entsprechenden zellulären Markern nachweisen lässt. Insbesondere die vorhandene terminale Differenzierung der Keratinozyten mit der Ausbildung eines *Stratum corneum* ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung.

Auch die Frage nach dem Effekt von $\text{TNF}\alpha$ und Inositol-C2-PAF in der 3D-Kultur konnte in dieser Arbeit adressiert werden. Hierbei zeigte Inositol-C2-PAF alleine einen prodifferentiellen Einfluss auf die Keratinozyten. Der psoriasiform-inflammatorische Effekt von $\text{TNF}\alpha$ in der Kultur blieb jedoch

aus. Stattdessen zeigte sich eine Zunahme der untersuchten Marker terminaler Keratinozytendifferenzierung.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurden erstmalig die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) von Inositol-C2-PAF in Bezug auf die metabolische Aktivität und die Proteinmasse primärer Hautzellen quantifiziert. Davon ausgehend wäre ein Fokus auf die Proliferation, Apoptose und Lyse der Zellen sinnvoll. Zur Quantifizierung der Proliferation würde sich ein ELISA gegen das Ki-67-Protein eignen (92). Ki-67 ist ein Antigen, das nur in den proliferativen Zellzyklusphasen G1, S, G2 und M nachweisbar ist. Ruhende Zellen in der G0 Phase werden hingegen nicht erfasst. Damit ist das Verfahren gut geeignet, um den Anteil der proliferierenden Zellen einer Population zu quantifizieren (93). Um die Apoptose und Nekrose innerhalb einer Zellpopulation zu messen und voneinander zu unterscheiden, eignet sich die Durchflusszytometrie. Dabei kann Propidiumiodid (PI) verwendet werden, um die nekrotischen Zellen zu markieren. Sie weisen eine gestörte Integrität der Zellmembran auf, was dem Agens die Möglichkeit bietet, zur DNA vorzudringen und diese zu binden. Apoptotische Zellen mit ihrer intakten Zellmembran werden nicht markiert. Stattdessen lassen sich apoptotische Zellen identifizieren, da sie Phosphatidylserin auf der Außenseite ihrer Membran enthalten, welches sich durch fluoreszenzgebundenes Annexin V markieren lässt (94). Bei diesen Untersuchungen könnten durch die Abgrenzung von Proliferationshemmung, Apoptose und Nekrose die Mechanismen hinter der Abnahme der metabolischen Aktivität und der Proteinmasse von primären Hautzellen in 2D-Kulturen identifiziert werden.

Um die Wirkung von Inositol-C2-PAF in inflammatorischen, psoriatisch veränderten 3D-Modellen weiter zu erforschen, wäre die Nutzung von Modellen, die Immunzellen enthalten, sinnvoll. Die Zellen des Immunsystems, insbesondere dendritische und T-Helfer-Zellen ($CD4^+$), sind *in vivo* entscheidend an der Krankheitsentstehung beteiligt (11). Ein entsprechendes 3D-Kokultur-Modell primärer humaner Zellen ist durch Van Den Bogaard et al. realisiert worden. Hierzu wurden auf humaner Dermis primäre Keratinozyten kultiviert und in einer ALI-Kultur zur Differenzierung angeregt. In das Medium unterhalb des ausdifferenzierten 3D-Modells wurden anschließend aktivierte $CD4^+$ -Zellen eingebracht. Die T-Zellen migrierten im Verlauf in die Keratinozytenschicht und induzierten dort einen psoriasiformen, inflammatorischen Phänotyp. Es kam zur Reduktion der Filaggrinexpression und zur Synthese proinflammatorischer Zytokine durch die Keratinozyten (95). Die Behandlung eines solchen Modells mit Inositol-C2-PAF könnte weitere Erkenntnisse bezüglich des potentiellen therapeutischen Nutzens bei der Psoriasis bringen.

Der Wirkstoff könnte perspektivisch eine sinnvolle Ergänzung zu den topischen Therapeutika der Psoriasis darstellen. Bei entsprechender Effizienz könnte er die Nutzung von systemischen Therapien verringern. Bei den konventionellen systemischen Medikamenten bietet das den Vorteil einer verringerten kumulativen Toxizität, während der verminderte Einsatz von Biologika eine außerordentliche Kostenersparnis wäre (11).

Für die klinische Anwendung von Inositol-C2-PAF müsste eine topische Applikationsart entwickelt werden. Bei der topischen Therapie der Psoriasis bestehen aufgrund der Verdickung des *Stratum*

corneum besondere Herausforderungen. Die Penetration von Pharmaka ist umgekehrt proportional zur Dicke der verhornten Epidermis und dementsprechend bei der Psoriasis vermindert. Die Nanomedizin leistet einen wichtigen Beitrag in der Adressierung dieses Problems. Nanocarrier werden dabei als Vektor genutzt, mit dem Pharmaka ihren Wirkort erreichen. Es existieren verschiedene Nanocarrier-Klassen, unter anderem Polymer-, Lipid- und Metall-Nanopartikel (96). Für Kortikosteroide konnte eine erhöhte Penetration der Haut und eine verstärkte antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden, wenn sie in Polymer- oder Lipid-Nanocarriern appliziert wurden (97). Mit Methotrexat, welches üblicherweise systemisch bei der Psoriasis eingesetzt wird, wurden für die topische Anwendung unter anderem Metall-Nanopartikel beladen. Das führte zu einer Penetration der Haut bis in die Dermis hinein. Vorteilhaft daran könnte eine effizientere Hemmung des inflammatorischen Milieus der Haut sein, wobei potentiell auch der Nachteil einer systemischen Verteilung des Wirkstoffes besteht (96).

Als Nanocarriersystem für Inositol-C2-PAF könnten sich beispielsweise Liposome eignen, die zu den Lipid-Nanocarriern gehören. Sie sind aus einer sphärischen Doppellipidschicht aufgebaut, die ein hydrophiles Kompartiment umschließt. In ihrem Kern können sie dementsprechend hydrophile Pharmaka transportieren, während lipophile Substanzen in die Doppellipidschicht eingelagert werden können (98). Da es sich bei Inositol-C2-PAF um ein amphiphiles Molekül handelt, welches in Biomembranen akkumuliert, könnte es gegebenenfalls auch in die Doppellipidschicht der Liposome interkalieren. Dies würde eine technisch einfache, passive Beladung des Nanocarriers ermöglichen. Neben der Beladung müssten auch die Penetration der Epidermis mit dem beladenen Nanocarrier und die Freisetzung des Wirkstoffes untersucht werden. Dafür würden sich *in vitro* dreidimensionale Modelle der Haut mit ausgebildetem *Stratum corneum* eignen.

Literaturverzeichnis

1. Fritsch P. *Dermatologie & Venerologie für das Studium*. Heidelberg: Springer Medizin, 2009:1–5.
2. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme, 2009:526–35.
3. Atit R, Thulabandu V, and Chen D. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2018;7:307.
4. Fritsch P. *Dermatologie & Venerologie für das Studium*. Heidelberg: Springer Medizin, 2009:8.
5. Bragulla HH and Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 2009;214:516–59.
6. McGrath JA and Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:20–7.
7. Rousselle P, Gentilhomme E, and Neveux Y. Markers of Epidermal Proliferation and Differentiation. In: *Agaches Measuring the Skin*. Ed. by Humbert P, Fanian F, Maibach HI, and Agache P. Cham: Springer, 2017:407–15.
8. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, and Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology* 1995;130:393–405.
9. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, and Geczy CL. Functions of S100 Proteins. *Current Molecular Medicine* 2013;13:24–57.
10. Nguyen AV and Soulika AM. The Dynamics of the Skins Immune System. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:1811.
11. Boehncke WH and Schön MP. Psoriasis. *The Lancet* 2015;386:983–94.
12. Kamiya K, Kishimoto M, Sugai J, Komine M, and Ohtsuki M. Risk Factors for the Development of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:4347.
13. Fritsch P. *Dermatologie & Venerologie für das Studium*. Heidelberg: Springer Medizin, 2009:219–29.
14. Oliveira MFSP, Rocha BO, and Duarte GV. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2015;90:9–20.
15. Kimmel GW and Lebwohl M. Psoriasis: Overview and Diagnosis. In: *Evidence-Based Psoriasis Diagnosis and Treatment*. Ed. by Ghutani T, Liao W, and Nakamura M. Cham: Springer, 2018:1–16.
16. Hugh JM and Weinberg JM. Update on the Pathophysiology of Psoriasis. *Cutis* 2018;102:6–12.
17. Schön MP. Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis and Other Inflammatory Disorders. *Frontiers in Immunology* 2019;10:1764.
18. Gulbins E and Lang K. Immunsystem. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer, 2010:503–14.
19. Wang A and Bai Y. Dendritic cells: The driver of psoriasis. *The Journal of Dermatology* 2020;47:104–13.

20. Ten Bergen LL, Petrovic A, Aarebrot AK, and Appel S. The TNF/IL-23/IL-17 axis - Head-to-head trials comparing different biologics in psoriasis treatment. *Scandinavian Journal of Immunology* 2020;92:12946.
21. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Khatcherian A, Bluth MJ, Lowes MA, and Krueger JG. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *The Journal of Experimental Medicine* 2007;204:3183–94.
22. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, Fortugno P, Gonzalvo-Feo S, Franssen JD, Parmentier M, and De Pita O. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:249–58.
23. Blauvelt A and Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2018;55:379–90.
24. Zibert JR, Skov L, Thyssen JP, Jacobsen GK, and Grigorian M. Significance of the S100A4 Protein in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2010;130:150–60.
25. Thewes M, Stadler R, Korge B, and Mischke D. Normal psoriatic epidermis expression of hyperproliferation-associated keratins. *Archives of Dermatological Research* 1991;283:465–71.
26. Yang L, Fan X, Cui T, Dang E, and Wang G. Nrf2 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis through Up-Regulation of Keratin 6, Keratin 16, and Keratin 17. *Journal of Investigative Dermatology* 2017;137:2168–76.
27. Fischer M, William T, Helmbold P, Wohlrab J, and Marsch W. Expression of epidermal N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR1) depends on formation of the granular layer - analysis in diseases with parakeratotic cornification. *Archives of Dermatological Research* 2004;296:157–62.
28. Giardina E, Capon F, De Rosa M, Mango R, Zambruno G, Orecchia A, Chimenti S, Giardina B, and Novelli G. Characterization of the loricrin (LOR) gene as a positional candidate for the PSORS4 psoriasis susceptibility locus. *Annals of Human Genetics* 2004;68:639–45.
29. Takahashi H, Kinouchi M, Tamura T, and Iizuka H. Decreased β 2-adrenergic receptor-mRNA and loricrin-mRNA, and increased involucrin-mRNA transcripts in psoriatic epidermis: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. *British Journal of Dermatology* 1996;134:1065–9.
30. Montacir O, Montacir H, Springer A, Hinderlich S, Mahboudi F, Saadati A, and Parr MK. Physicochemical Characterization, Glycosylation Pattern and Biosimilarity Assessment of the Fusion Protein Etanercept. *The Protein Journal* 2018;37:164–79.
31. Blome C, Gosau R, Radtke MA, Reich K, Rustenbach SJ, Spehr C, Thaci D, and Augustin M. Patient-relevant treatment goals in psoriasis. *Archives of Dermatological Research* 2016;308:69–78.
32. Florek AG, Wang CJ, and Armstrong AW. Treatment preferences and treatment satisfaction among psoriasis patients: a systematic review. *Archives of Dermatological Research* 2018;310:271–319.
33. Semini G, Hildmann A, Haefen C, and Danker K. Glycosidated Phospholipids - a Promising Group of Anti-Tumour Lipids. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2014;14:607–17.

34. Demopoulos CA, Pinckard RN, and Hanahan DJ. Platelet-Activating Factor Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *The Journal of Biological Chemistry* 1979;254:9355–8.
35. Fischer A, Müller D, Zimmermann-Kordmann M, Kleuser B, Mickleit M, Laabs S, Löwe W, Cantagrel F, Reutter W, and Danker K. The ether lipid inositol-C2-PAF is a potent inhibitor of cell proliferation in HaCaT cells. *ChemBioChem* 2006;7:441–9.
36. Van Blitterswijk WJ and Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14:2061–74.
37. Ausili A, Torrecillas A, Aranda FJ, Mollinedo F, Gajate C, Corbalan-Garcia S, De Godos A, and Gomez-Fernandez JC. Edelfosine Is Incorporated into Rafts and Alters Their Organization. *The Journal of Physical Chemistry B* 2008;112:11643–54.
38. Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, and Modolell M. Selective Induction of Apoptosis in Cancer Cells by the Ether Lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): Molecular Structure Requirements, Cellular Uptake, and Protection by Bcl-2 and Bcl-X_L. *Cancer Research* 1997;57:1320–8.
39. Tanzifi A, Khoshi A, Emami S, Sarvi S, Sharif M, Montazeri M, Moghbeli M, and Daryani A. The effect of edelfosine on GRA1 and MIC3 expressions in acute toxoplasmosis. *Parasitology Research* 2020;119:1371–80.
40. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, and De Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;67:2576–97.
41. Iacano AJ, Lewis H, Hazen JE, Andro H, Smith JD, and Gulshan K. Miltefosine increases macrophage cholesterol release and inhibits NLRP3-inflammasome assembly and IL-1 β release. *Scientific Reports* 2019;9:11128.
42. Semini G, Klein A, and Danker K. Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells: *Pharmacogenetics and Genomics* 2011;21:375–87.
43. Semini G, Hildmann A, Reissig HU, Reutter W, and Danker K. The novel synthetic ether lipid inositol-C2-PAF inhibits phosphorylation of the tyrosine kinases Src and FAK independent of integrin activation in transformed skin cells. *Biochemical Pharmacology* 2011;81:985–95.
44. Semini G, Hildmann A, Klein A, Lucka L, Schön M, Schön MP, Shmanai V, and Danker K. Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation. *Biochemical Pharmacology* 2014;87:477–88.
45. Wiese A, Wieder T, Mickleit M, Reinohl S, Geilen CC, Seydel U, and Reutter W. Structure-Dependent Effects of Glucose-Containing Analogs of Platelet Activating Factor (PAF) on Membrane Integrity. *Biological Chemistry* 2000;381:135–44.
46. Von Haefen C, Wendt J, Semini G, Sifringer M, Belka C, Radetzki S, Reutter W, Daniel PT, and Danker K. Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 2011;16:636–51.

47. Kamsteeg M, Jansen P, Van Vlijmen-Willems I, Van Erp P, Rodijk-Olthuis D, Van Der Valk P, Feuth T, Zeeuwen P, and Schalkwijk J. Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. *British Journal of Dermatology* 2010;162:568–78.
48. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, and Dale B. Epithelial Antimicrobial Peptides: Review and Significance for Oral Applications. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1998;9:399–414.
49. Forkel S, Schön M, Hildmann A, Claßen A, John SM, Danker K, and Schön MP. Inositolated Platelet-Activating Factor (Ino-C2-PAF) Modulates Dynamic Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions and Alleviates Psoriasis-Like Skin Inflammation in Two Complementary Mouse Models. *Journal of Investigative Dermatology* 2014;134:2510–20.
50. Li AG, Wang D, Feng XH, and Wang XJ. Latent TGF β 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *The EMBO Journal* 2004;23:1770–81.
51. Bonifati C and Ameglio F. Cytokines in psoriasis. *International Journal of Dermatology* 1999;38:241–51.
52. Lüllmann H, Mohr K, and Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 2010:67–72.
53. Jensen C and Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* 2020;7:33.
54. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology* 2018;9:6.
55. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, and Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2014;12:207–18.
56. Tjabringa G, Bergers M, Van Rens D, De Boer R, Lamme E, and Schalkwijk J. Development and Validation of Human Psoriatic Skin Equivalents. *The American Journal of Pathology* 2008;173:815–23.
57. Choi M, Park M, Lee S, Lee JW, Cho MC, Noh M, and Lee C. Establishment of Immortalized Primary Human Foreskin Keratinocytes and Their Application to Toxicity Assessment and Three Dimensional Skin Culture Construction. *Biomolecules & Therapeutics* 2017;25:296–307.
58. Baden HP, Kubilus J, Wolman SR, Steinberg ML, Phillips SB, and Kvedar JC. NM1 Keratinocyte Line Is Cytogenetically and Biologically Stable and Exhibits a Unique Structural Protein. *The Journal of Investigative Dermatology* 1987;89:574–9.
59. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, and Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* 1988;106:761–71.
60. Chen L, Wu M, Jiang S, Zhang Y, Li R, Lu Y, Liu L, Wu G, Liu Y, Xie L, and Xu L. Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes. *International Journal of Nanomedicine* 2019;14:9707–19.
61. Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, Yoo SS, Dai G, and Karande P. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2014;20:473–84.

62. Leist M, Lidbury BA, Yang C, Hayden PJ, Kelm JM, Ringeissen S, Detroyer A, Meunier JR, Rathman JF, and Jackson GR. Novel Technologies and an Overall Strategy to Allow Hazard Assessment and Risk Prediction of Chemicals, Cosmetics, and Drugs with Animal-Free Methods. *ALTEX* 2012;29:373–88.
63. Randall MJ, Jünger A, Rimann M, and Wuertz-Kozak K. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2018;6:154.
64. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, and Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Elsevier, 2013:83–8.
65. Herdegen T, Böhm R, Cimin-Bredée N, Culman J, Gohlke P, Ley L, Luippold G, Ufer M, and Wätzig V. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 2008:30–1.
66. Di Veroli GY, Fornari C, Goldlust I, Mills G, Koh SB, Bramhall JL, Richards FM, and Jodrell DI. An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Scientific Reports* 2015;5:14701.
67. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology* 1910;40:4–7.
68. Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, and Maire P. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2008;22:633–48.
69. Nomenclature Guidelines for Authors: With effect from January 2005. *British Journal of Pharmacology* 2005;144:155–7.
70. Herdegen T, Böhm R, Cimin-Bredée N, Culman J, Gohlke P, Ley L, Luippold G, Ufer M, and Wätzig V. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 2008:19–25.
71. Zhang M, Aguilera D, Das C, Vasquez H, Zage P, Gopalakrishnan V, and Wolff J. Measuring Cytotoxicity: A New Perspective on LC50. *Anticancer Research* 2007;27:35–8.
72. Lüllmann H, Mohr K, and Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 2010:17–9.
73. Pannecoque C, Daelemans D, and De Clercq E. Tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of HIV replication inhibitors: revisited 20 years later. *Nature Protocols* 2008;3:427–34.
74. Van Meerloo J, Kaspers GJL, and Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: ed. by Cree IA. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2011:237–45.
75. Vichai V and Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 2006;1:1112–6.
76. Gegotek A, Domingues P, Wronski A, and Skrzydlewska E. Changes in Proteome of Fibroblasts Isolated from Psoriatic Skin Lesions. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:5363.
77. Damour O, Zhi Hua S, Lasne F, Villain M, Rousselle P, and Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* 1992;18:479–85.
78. Öschläger V, Schrader A, and Hockertz S. Comparison of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes with Immortalized Cell Lines Regarding their Sensitivity to Sodium Dodecyl Sulfate in a Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay. *Arzneimittelforschung* 2009;59:146–52.

79. Vajrabhaya Lo and Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology* 2018;9:15.
80. Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, and Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cellular Oncology* 2018;41:505–16.
81. Feldman ME and Shokat KM. New Inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR Pathway: Insights into mTOR Signaling from a New Generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs). In: *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*. Ed. by Rommel C, Vanhaesebroeck B, and Vogt PK. Heidelberg: Springer, 2010:241–62.
82. Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, and Topisirovic I. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 2015;14:473–80.
83. Bhaskar PT, Nogueira V, Patra KC, Jeon SM, Park Y, Robey RB, and Hay N. mTORC1 Hyperactivity Inhibits Serum Deprivation-Induced Apoptosis via Increased Hexokinase II and GLUT1 Expression, Sustained Mcl-1 Expression, and Glycogen Synthase Kinase 3 β Inhibition. *Molecular and Cellular Biology* 2009;29:5136–47.
84. Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, Acuna AU, Nieto-Miguel T, Villa-Pulgarin JA, Gonzales-Garcia C, Cena V, and Gajate C. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death & Disease* 2011;2:158.
85. Rübber I and Rübber H. Phimose. *Der Urologe* 2012;51:1005–16.
86. Sanz-Gomez N, Freije A, and Gandarillas A. Keratinocyte Differentiation by Flow Cytometry. In: *Epidermal Cells Methods and Protocols*. Ed. by Turksen K. New York: Humana Press, 2020:83–92.
87. Kandarova H, Willoughby JA, De Jong WH, Letasiova S, Milasova T, Bachelor MA, Breyfogle B, Handa Y, De La Fonteyne L, and Coleman KP. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm. *Toxicology in Vitro* 2018;50:407–17.
88. Alepee N, Tornier C, Robert C, Amsellem C, Roux MH, Doucet O, Pachot J, Meloni M, and De Brugerolle De Fraissinette A. A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicology in Vitro* 2010;24:257–66.
89. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* 2008;214:149–60.
90. Liu T, Zhang L, Joo D, and Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017;2:17023.
91. Niehues H and Van Den Bogaard EH. Past, present and future of in vitro 3D reconstructed inflammatory skin models to study psoriasis. *Experimental Dermatology* 2018;27:512–9.
92. Klein CL, Wagner M, Kirkpatrick CJ, and Van Kooten TG. A new quantitative test method for cell proliferation based on detection of the Ki-67 protein. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2000;11:125–32.

93. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, and Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 1984;133:1710–5.
94. Cummings BS and Schnellmann RG. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols in Pharmacology* 2004;25:12.8.1–12.8.22.
95. Van Den Bogaard EH, Tjabringa GS, Joosten I, Vonk-Bergers M, Van Rijssen E, Tijssen HJ, Erkens M, Schalkwijk J, and Koenen HJ. Crosstalk between Keratinocytes and T Cells in a 3D Microenvironment: A Model to Study Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 2014;134:719–27.
96. Fereig SA, El-Zaafarany GM, Arafa MG, and Abdel-Mottaleb MMA. Tackling the various classes of nano-therapeutics employed in topical therapy of psoriasis. *Drug Delivery* 2020;27:662–80.
97. Prosperi D, Colombo M, Zanoni I, and Granucci F. Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases. *Seminars in Immunology* 2017;34:61–7.
98. Gubernator J. Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased *in vivo* activity. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2011;8:565–80.

Eidesstattliche Versicherung

„ Ich, Adrian Schulz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zum Einfluss des Etherlipids Inositol-C2-PAF auf die Viabilität und Differenzierung primärer humaner Hautzellen / Investigations of the influence of the ether lipid Inositol-C2-PAF on the viability and differentiation of primary human skin cells selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst. “

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas möchte ich Frau PD Dr. Kerstin Danker herzlich danken. Darüber hinaus bin ich ihr für das Engagement außerordentlich dankbar, mit dem sie die Erstellung dieser Monographie begleitet hat. Dabei konnte ich mich stets auf ihre zügigen Rückmeldungen, sowie ihre Erfahrung und Expertise verlassen. Für die Betreuung der Promotion richtet sich mein Dank insbesondere an Frau Dr. Annette Hildmann. Ich konnte mich immer auf ihre Unterstützung verlassen. Bei Fragen und Problemen, aber auch bei Organisatorischem stand sie mir immer zur Seite. Für die Hilfe und Anweisung bei der praktischen Laborarbeit danke ich Frau Gudrun Mrawietz herzlich. Der gesamten Arbeitsgruppe Danker und Lucka danke ich für ihre Unterstützung. Bei der Firma InSphero möchte ich mich für die Bereitstellung der 3D-Kokulturen bedanken, die eine wesentliche Grundlage für meine Forschung darstellten. Herrn PD Dr. Nikolaus Berndt bin ich ausgesprochen dankbar für seine wertvollen Hinweise bezüglich der Datenauswertung.