

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Prof. Dr. med. M.P. Schön)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Anti-inflammatorische Wirkung des inositoylierten

Plättchen-aktivierenden Faktors (Ino-C2-PAF)

in vitro und *in vivo*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Susann Forkel

aus

Gera

Göttingen 2016

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. H. K. Kroemer |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Michael Peter Schön |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Lutz Walter |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. Martin Oppermann |

Datum der mündlichen Prüfung: 13.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Psoriasis..... | 1 |
| 1.1.1 Klinische Manifestation der Psoriasis | 1 |
| 1.1.2 Histopathologische Veränderungen in psoriatischer Haut | 3 |
| 1.1.3 Epidemiologie der Psoriasis..... | 3 |
| 1.1.4 Ätiologie | 4 |
| 1.1.5 Immunpathogenese | 5 |
| 1.1.6 Komorbidität..... | 9 |
| 1.1.7 Therapie der Psoriasis | 10 |
| 1.2 Antitumorlipide..... | 13 |
| 1.2.1 Antitumorlipide als Zytostatika | 13 |
| 1.2.2 Wirkmechanismen der Antitumorlipide | 14 |
| 1.2.3 Inositoylierter Plättchen-aktivierender Faktor..... | 16 |
| 1.3 Zielsetzung | 17 |
| 2. Material und Methoden..... | 19 |
| 2.1 Material | 19 |
| 2.1.1 Chemikalien | 19 |
| 2.1.2 Geräte..... | 21 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien..... | 23 |
| 2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme | 23 |
| 2.1.5 Antikörper | 24 |
| 2.1.6 Lösungen und Puffer | 25 |
| 2.1.7 Software | 26 |
| 2.2 Methoden | 26 |
| 2.2.1 Zellkultur | 26 |
| 2.2.1.1 HUVEC | 26 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1.2 HaCaT | 27 |
| 2.2.1.3 Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)..... | 27 |
| 2.2.2 MTT-Test (Viabilitätstest)..... | 28 |
| 2.2.3 Apoptose-Messung..... | 29 |
| 2.2.4 Nukleinsäureanalysen | 29 |
| 2.2.4.1 mRNA-Isolierung und DNase-Verdau..... | 29 |
| 2.2.4.2 cDNA-Synthese | 30 |
| 2.2.4.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion | 31 |
| 2.2.4.3.1 Durchführung Polymerase-Kettenreaktion..... | 31 |
| 2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese | 34 |
| 2.2.5 Indirekte und direkte Immunfluoreszenz | 34 |
| 2.2.6 Isolierung humaner Lymphozyten und CFSE-Färbung..... | 35 |
| 2.2.7 Flusskammerexperimente | 36 |
| 2.2.7.1 Aussaat der Endothelzellen auf den Glasboden der Flusskammer | 37 |
| 2.2.7.2 Durchführung der Flusskammerexperimente..... | 38 |
| 2.2.8 Durchflusszytometrie | 38 |
| 2.2.8.1 Endothelzellen | 39 |
| 2.2.8.2 Humane Lymphozyten | 39 |
| 2.2.8.3 Murine Lymphozyten | 40 |
| 2.2.9 In-vivo-Experimente..... | 40 |
| 2.2.9.1 Histochemische und immunhistochemische Färbungen..... | 42 |
| 2.2.9.2 Blutentnahme bei Mäusen und Lymphozytenisolierung aus dem Mäuseblut..... | 43 |
| 2.2.10 Statistische Auswertung | 43 |
| 3. Ergebnisse | 44 |
| 3.1 Ino-C2-PAF reduziert die Viabilität menschlicher Endothelzellen <i>in vitro</i> moderat und es induziert Apoptose in TNF α -aktivierten, nicht aber in unstimulierten Endothelzellen..... | 44 |
| 3.2 Ino-C2-PAF reduziert die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1..... | 48 |
| 3.3 Inhibition entzündungsassoziierter Gene in HaCaT-Zellen durch Ino-C2-PAF . | 53 |

| | |
|--|----|
| 3.4 Die Expression humaner leukozytärer Adhäsionsmoleküle wird durch Ino-C2-PAF vermindert..... | 54 |
| 3.5 C57BL6/J-Mäuse reduzieren nach der Behandlung mit Ino-C2-PAF <i>in vivo</i> die leukozytäre Expression von CD62L, aber nicht von CD49d und CD11a | 57 |
| 3.6 Ino-C2-PAF reduziert die dynamische Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen im Flusskammerexperiment | 58 |
| 3.6.1 Behandlung der Endothelzellen mit Ino-C2-PAF reduziert adhäsive Interaktionen mit Leukozyten..... | 58 |
| 3.6.2 Ino-C2-PAF-Behandlung der PBMCs hemmt Rollen und feste Adhäsion an TNF α -stimulierten Endothelzellen..... | 61 |
| 3.7 Ino-C2-PAF bessert chronisch-entzündliche Hauterkrankungen <i>in vivo</i> in zwei komplementären Maus-Modellen der Psoriasis..... | 63 |
| 3.7.1 Ino-C2-PAF bessert den psoriasiformen Phänotyp in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen | 63 |
| 3.7.2 Ino-C2-PAF bessert den psoriasiformen Phänotyp in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen | 69 |
| 4. Diskussion..... | 73 |
| 5. Zusammenfassung..... | 79 |
| 6. Literaturverzeichnis | 80 |
| 7. Publikation..... | 93 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Allophycocyanin |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CFSE | Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-Phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| HaCaT | Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca ²⁺ conditions and elevated temperature |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule-1 |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| LFA-1 | Lymphocyte Function-associated Antigen-1 |
| MCP | Monocyte Chemotactic Protein |

| | |
|--------------|--|
| mRNA | Messenger Ribonucleic Acid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NSAR | nichtsteroidale Antirheumatika |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PE | Phycoerythrin |
| rhEGF | Recombinant Human Epithelial Growth Factor |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA-Puffer |
| Tc | zytotoxische T-Zelle |
| Th | T-Helfer-Zelle |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |
| VE-Cadherin | Vascular Endothelial Cadherin |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VLA-4 | Very Late Antigen- 4 |

1. Einleitung

1.1 Psoriasis

1.1.1 Klinische Manifestation der Psoriasis

Psoriasis, die Schuppenflechte, ist eine chronisch entzündliche Erkrankung. Der Begriff Psoriasis diffusa wurde erstmals von Robert Willan im Jahre 1798 für eine squamöse Hauterkrankung bei Bäckern verwendet (Beswick 1957). Ferdinand Ritter von Hebra beschrieb die Psoriasis im Jahr 1841 erstmals im heute gebräuchlichen Sinn (Schön und Boehncke 2005).

Die typischen Effloreszenzen der häufigsten Form, der Psoriasis vulgaris, sind scharf begrenzte erythematöse Plaques, die von silbrigen Schuppen bedeckt sind (Boehncke und Schön 2015). Prädilektionsstellen sind die Streckseiten der oberen und unteren Extremitäten, dabei besonders der Knie- und Ellenbogengelenke, die Periumbilikal- und die Sakralregion, die *Rima ani* sowie die behaarte Kopfhaut. Die Ausprägung kann stark variieren; sie reicht von wenigen diskreten Läsionen (Psoriasis nummularis) über eine „landkartenartige“ Verteilung (Psoriasis geographica) bis hin zur psoriatischen Erythrodermie, einem schweren und potentiell lebensbedrohenden Krankheitsbild. Auch der Verlauf zeigt erhebliche interindividuelle Unterschiede, wobei die Enden des Spektrums einerseits die chronisch-stationäre Plaque-Psoriasis mit monate- bis jahrelang stabilen Plaques und andererseits die akut exanthematische Psoriasis sind. Die letzte Form wird häufig durch systemische Provokationsfaktoren ausgelöst und präsentiert sich mit kleinherdig-disseminierten Läsionen (Psoriasis guttata oder Psoriasis punctata) (Schön und Boehncke 2005).

Wenn in erster Linie die Intertrigines befallen sind, spricht man von einer Psoriasis inversa. Wegen der Lokalisation in den Hautfalten mit feuchtem Milieu und ausgeprägter Friktion finden sich bei dieser Form kaum Schuppen.

Neben der Psoriasis vulgaris können pustulöse Verläufe der Psoriasis, die durch sterile Pusteln gekennzeichnet sind, auftreten. Man unterscheidet eine generalisierte Form (Psoriasis pustulosa generalisata, von Zumbusch-Typ) von lokalisierten Formen an Handflächen und Fußsohlen (Psoriasis pustulosa palmoplantaris, Barber-Königsbeck-Typ) oder den Finger- und Zehenspitzen (Acrodermatitis continua suppurativa, Hallopeau-Typ). Zwischen den Formen gibt es Übergänge, und man kennt auch provozierte pustulöse Psoriasis-Formen, beispielsweise als paradoxe Reaktion auf TNF α -Antagonisten (Wendling und Prati 2014; Famenini und Wu 2013). Neuere Ergebnisse genetischer Assoziationsstudien legen nahe, dass manche Formen der pustulösen Psoriasis als eigene Entität aufzufassen sind, die beispielsweise mit Mutationen im IL-36-Rezeptor-Gen assoziiert sind (Marrakchi et al. 2011).

Eine Untersuchung an italienischen Psoriasispatienten zeigte, dass 77% der untersuchten Psoriasis-Patienten eine Beteiligung der Nägel aufwiesen, vorherrschend dabei war eine Onycholyse mit 79% (Brazzelli et al. 2011).

In dieser und in anderen Untersuchungen korrelierte der Schweregrad mit dem Nagelbefall (Augustin et al. 2010b). Neben der Maximalform der Onycholyse finden sich die so genannten Ölflecken, Tüpfelnägel und Splitterblutungen. Zur Beurteilung des Schweregrades einer Psoriasis hat sich der PASI Score (Psoriasis Area and Severity Index) durchgesetzt. Der Algorithmus zur Berechnung des PASI berücksichtigt die betroffene Körperoberfläche, die Ausprägung des Erythems, die Induration sowie die Schuppung. Zur Beurteilung des Schweregrades werden auch andere Instrumente und klinische Bewertungsskalen, beispielsweise der Anteil der befallenen Körperoberfläche in Prozent („*body surface area*“, BSA) oder der Dermatology Life Quality Index (DLQI) eingesetzt (Nast et al. 2012).

Als häufigste extrakutane Manifestationsform der Psoriasis gilt die Psoriasis-Arthritis, deren Häufigkeit mit etwa 20% aller Psoriasis-Patienten angegeben wird (Catanoso et al.

2012; Finzel und Englbrecht 2011). Eine deutsche Querschnittsstudie an 2000 Patienten zeigte eine Gelenkbeteiligung bei 19% der Fälle (Radtko et al. 2009). Radiologisch findet sich ein Nebeneinander von Knochenanbau- und -abbauprozessen. Die 1973 beschriebene Klassifikation von Moll und Wright hat nach wie vor ihre Gültigkeit, wurde jedoch in neuerer Zeit durch einfacher anzuwendende Algorithmen ergänzt (Schoels 2014; Villani et al. 2014). Fünf Untergruppen wurden beschrieben: Befall der distalen Interphalangealgelenke, asymmetrische Oligoarthritis, Polyarthritis, Spondylitis und die Arthritis mutilans (Moll und Wright 1973).

1.1.2 Histopathologische Veränderungen in psoriatischer Haut

Die gesteigerte Proliferation und fehlerhafte Differenzierung der Keratinozyten führen zu Akanthose (Vermehrung der lebenden epidermalen Zellschichten) mit Verbreiterung des Stratum spinosum und elongierten epidermalen Reteleisten, Hyperkeratose (Verbreiterung des Stratum corneum) und Parakeratose (Zellkerne im Stratum corneum als Ausdruck gestörter terminaler Differenzierung). In der Dermis treten dilatierte und korkenzieherartig gewundene Gefäße auf, darüber hinaus ist wegen der gesteigerten Angiogenese auch die Zahl der Blutgefäße deutlich erhöht. Als nahezu pathognomonisch können die epidermal akkumulierten neutrophilen Granulozyten, welche die Munro-Mikroabzesse bilden, gelten. Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die damit einhergehende Diapedese ist ursächlich für das gemischtzellige Infiltrat (Boehncke und Schön 2015).

1.1.3 Epidemiologie der Psoriasis

In den westlichen industrialisierten Staaten beträgt die Prävalenz der Psoriasis zwischen 1,5% und 3% der gesamten Bevölkerung (Nevitt und Hutchinson 1996; Schön und Boehncke 2005). Damit ist die Psoriasis sehr häufig. Da sie darüber hinaus lebenslange Verläufe zeigt, sind die Belastungen für betroffene Patienten sowie die gesellschaftlichen und sozioökonomischen Folgen erheblich. Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Lebensalter erstmals auftreten, wobei allerdings zwei Inzidenzgifel auffallen. Die Mehrheit

der Patienten gehört zum *early onset*-Typ, bei diesen Patienten tritt die Psoriasis erstmals zwischen dem 16. und 22. Lebensjahr während der Adoleszenz auf. Ein zweiter Inzidenzgipfel (*late onset*) findet sich in der sechsten Lebensdekade (Henseler und Christophers 1985).

Auch bei Kindern ist die Psoriasis nicht selten; die Erkrankung tritt bei 0,5% bis 2% der unter 18-Jährigen auf (Fotiadou et al. 2014). In einer großen deutschen Studie wurde festgestellt, dass 0,71% der deutschen Kinder an Psoriasis leiden, wobei die Prävalenz linear mit dem Alter ansteigt (Augustin et al. 2010a).

1.1.4 Ätiologie

In den USA wurde bei eineiigen Zwillingen eine Konkordanz von ungefähr 70% beobachtet, bei zweieiigen immerhin noch von etwa 22% (Farber et al. 1974). In den letzten Jahren wurden mehrere Genloci identifiziert, welche mit der Psoriasis assoziiert sind. Vor allem der *early onset*-Typ, zu welchem etwa zwei Drittel der Fälle gehören, ist in der Regel durch einen schwereren Verlauf gekennzeichnet und korreliert in einem hohen Maße mit HLA-Cw6 (Henseler und Christophers 1985). Ebenso wurden Assoziationen mit den HLA-Typen HLA-B13, HLA-B17, HLA-w57 und HLA-DR4 beschrieben (Sabat et al. 2007). Inzwischen wurden zahlreiche so genannte PSORS (*psoriasis susceptibility loci*) entdeckt (Tsoi et al. 2012), welche allerdings in unterschiedlicher Häufigkeit gefunden wurden und nicht in allen untersuchten Populationen reproduziert werden konnten. HLA-Cw6 ist mit Abstand das am häufigsten mit Psoriasis assoziierte Gen; es befindet sich im PSORS 1-Lokus, welcher in der MHC-Region (*major histocompatibility complex*) auf dem Chromosom 6p21 liegt und vor allem beim *early onset*-Typ zu finden ist (Asumalahti et al. 2003).

Neben genetischen Faktoren spielen verschiedene exogene Einflüsse eine entscheidende Rolle für den Ausbruch und den Verlauf der Psoriasis, so dass die Genese dieser Krankheit heute als multifaktoriell angesehen wird. Zahlreiche Medikamente, beispielsweise Betablocker, Calciumantagonisten, Anti-Malaria-Mittel oder Lithium, können Psoriasis-Schübe provozieren oder aggravierern, wobei manche dieser Assoziationen nicht unumstritten sind (Dika et al. 2006; Basavaraj et al. 2010). Eine klinische Manifestation der

Psoriasis, vor allem der Guttata-Form, zeigt häufig eine Korrelation mit einer kurz zuvor stattgehabten Streptokokkeninfektion. In einer englischen Studie konnten bei 58% der Patienten mit einer akuten Psoriasis guttata im Serum Antikörper gegen Streptokokken nachgewiesen werden (Telfer et al. 1992). Das erstmalige Auftreten der Psoriasis im Kindes- oder Jugendalter folgt oft einer Streptokokken-Infektion des oberen Respirationstraktes (Martin et al. 1996). Neuere Untersuchungen legen antigene Ähnlichkeiten zwischen Streptokokken-Proteinen und menschlichen Keratinozyten nahe (Besgen et al. 2010).

Schließlich können nutritiv-toxische sowie exogene physikalische und chemische Faktoren den Verlauf der Psoriasis beeinflussen. Verschlechterungen sind insbesondere durch Rauchen (Emre et al. 2013) und Alkoholkonsum (Smith and Fenske 2000) induzierbar. Starke ultraviolette (UV) Strahlung, mechanische Irritation oder Störungen der epidermalen Barrierefunktion können ebenfalls zur Exazerbation führen (Dika et al. 2007).

1.1.5 Immunpathogenese

Ursprünglich wurde die Psoriasis als reine Differenzierungsstörung der Keratinozyten betrachtet. Nachweislich besteht eine verkürzte Differenzierungszeit und eine beschleunigte Durchwanderung (Transitzeit) der Keratinozyten von der Basalschicht (*stratum basale*) in suprabasale Schichten der Epidermis, resultierend in der charakteristischen und histologisch sichtbaren Hyper- und -parakeratose. Immunhistochemische Untersuchungen psoriatischer Läsionen zeigen neben den veränderten Keratinozyten ein dermales Infiltrat aus CD4+- und CD8+-T-Zellen, wobei die CD4+- Lymphozyten dominieren. Intraepidermal hingegen findet sich eine Häufung der CD8+-Zellen (Krueger 2002). Darüber hinaus sind psoriatische Plaques durch Infiltration und Aktivierung verschiedener Makrophagen-Populationen, dermaler Mastzellen sowie neutrophiler Granulozyten, die in den so genannten Munro'schen Mikroabszessen in der Epidermis akkumulieren, gekennzeichnet.

Aus heutiger Sicht wird die Psoriasis als autoinflammatorische Erkrankung verstanden. Dominierend sind dabei Zellen des Th-1- und Th-17-Subtyps. Eine These ist, dass bisher unbekannte Antigene von antigenpräsentierenden Zellen erkannt werden. Diese internalisieren und präsentieren sie nach Einwanderung in drainierende Lymphknoten

naiven T-Zellen. T-Zellen exprimieren L-Selektin (CD62L) an ihrer Oberfläche, dieses vermittelt das „Rolling“ an Kohlenhydrat-Strukturen (Sialyl-Lewis^X) der *high endothelial venules* (HEV) im Lymphknoten. Die Expression von LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1, CD11a/CD18) ermöglicht es, anschließend feste Bindungen mit Immunglobulinartigen Liganden (beispielsweise Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), CD54) auf Endothelzellen einzugehen, diese Bindung wiederum ist Voraussetzung für die Extravasation in den Lymphknoten (Warnock et al. 1998). In diesem wird die Differenzierung zu Zellen des Helfer- (Th1, CD4+) und zytotoxischen Typs 1 (Tc1, CD8+) initiiert. Th1- und Tc1-Zellen sind Bestandteil der zellulären Immunantwort. Aktivierte T-Zellen wandern während des Rolling and Homing-Prozesses in die entzündete Haut. Eine wesentliche Rolle auf dem Weg in die Haut spielt dabei die CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen)-Expression, ein Ligand des endothelialen E-Selektins (CD62E), auf der Lymphozytenoberfläche als sogenanntes skin addressin (Fuhlbrigge et al. 1997).

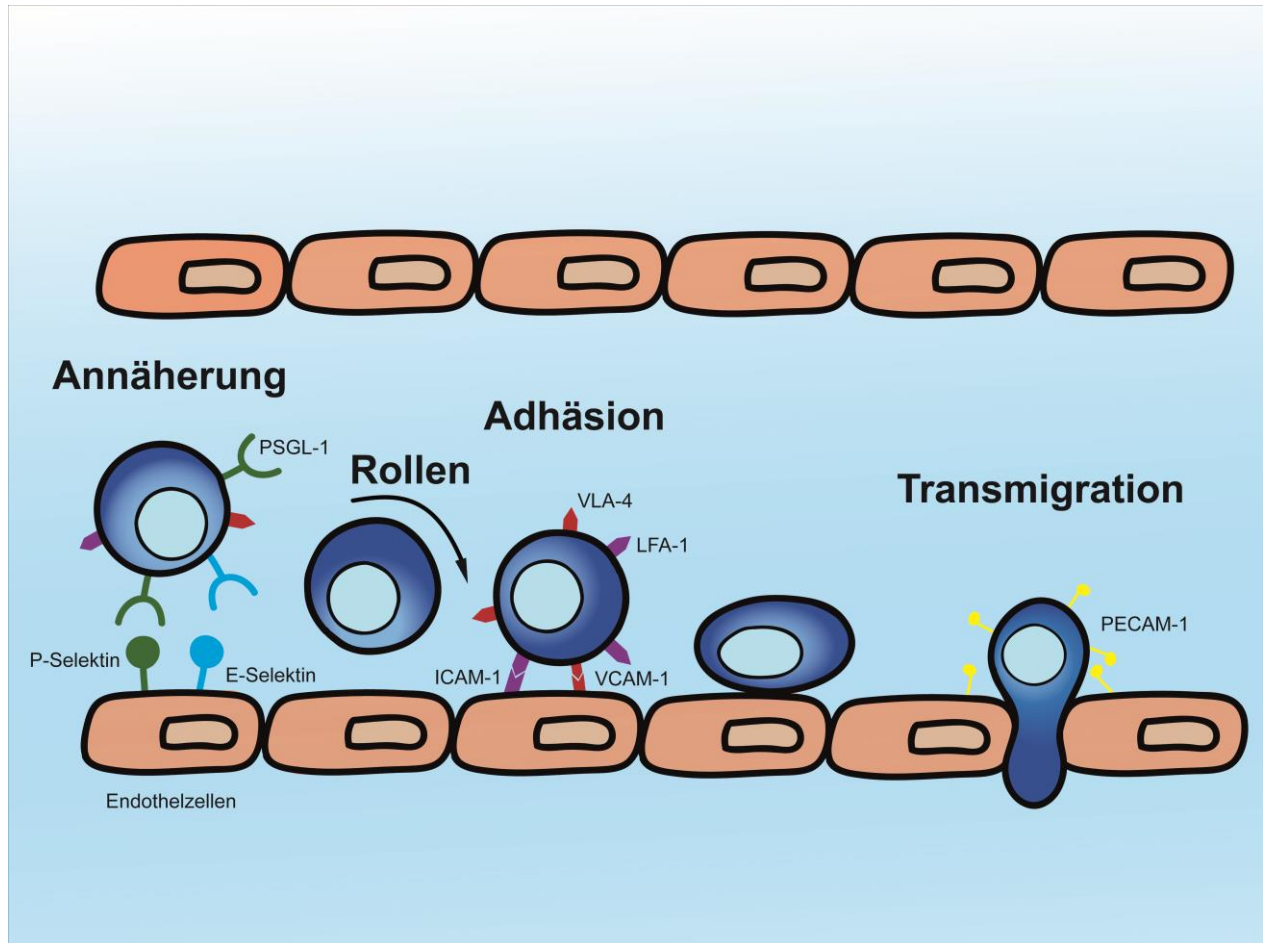


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Lymphozytenadhäsion und -extravasation im Rahmen der Inflammation.

Aktivierte Endothelzellen präsentieren verstärkt E- und P- Selektin auf ihrer Zelloberfläche. Diese Selektine führen zu einem ersten lockeren Kontakt (Annäherung) mit den zirkulierenden T-Lymphozyten (Schön und Boehncke 2005). Chemokine und Zytokine aktivieren Lymphozyten und Endothelzellen und induzieren so die Bindung zwischen lymphozytären und endothelialen Rezeptoren aus den Familien der Integrine und der immunglobulinartigen Adhäsionsmoleküle. An der Transmigration sind ebenfalls Integrine, aber auch andere Adhäsionsmoleküle beteiligt (Krüger 2002; Schön et al. 2003).

In der Haut kommt es zu gesteigerter Zytokinproduktion und -sekretion, beispielsweise von Interferon- γ , TNF α und IL-2 (Lowes et al. 2007). Die Dominanz des Th1-Signalweges unterdrückt wiederum durch Sekretion von Interferon- γ die Th2-Reaktion, so dass eine dauerhafte Dysbalance resultiert. In Folge der gesteigerten Präsenz inflammatorischer Zytokine kommt es zur Aktivierung der Keratinozyten, welche wiederum die Produktion

epidermaler Chemokine und Wachstumsfaktoren steigert und letztlich in der psoriatischen Plaque resultiert. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfolgt vor allem durch die chemotaktische Wirkung von TNF α , IL-8 (CXCL8) und CXCL-1 (Coimbra et al. 2012; Krüger 2002)

In gesunder Haut finden sich vornehmlich unreife dendritische Zellen (iDC), dies sind Langerhans-Zellen in der Epidermis und myeloide iDCs in der Dermis, welche überwiegend CD11+ positiv sind. In psoriatischen Läsionen finden sich sowohl dermal als auch epidermal neben vielen T-Zellen auch zahlreiche reife dendritische Zellen (mDC), welche an ihrer Oberfläche DC-LAMP und CD83 exprimieren. Diese mDC schütten IL-12 und IL-23 aus, welches wiederum die T-Zell-Antwort verstärkt. Zusätzlich sind plasmazytoide DC (pDC) in psoriatischen Plaques, aber auch in unbefallener Haut vieler Psoriasis-Patienten deutlich vermehrt (Nestle et al. 2005). pDC produzieren Interferon- α als potenten Stimulus für NK-Zellen. Die gesteigerte Sekretion von IL-23 durch aktivierte dendritische Zellen führt zur Proliferation und Differenzierung von Th-17 Zellen (Lynde et al. 2014). Th-17 Zellen produzieren wiederum IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und TNF α (Kagami et al. 2010). Entsprechend wurden erhöhte IL-17A mRNA-Mengen in Psoriasisplaques detektiert (Coimbra et al. 2010). Kürzlich wurde beschrieben, dass nicht nur Th17-Zellen, sondern in sogar noch stärkerem Maße Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise neutrophile Granulozyten und Mastzellen, IL-17 produzieren (Keijsers et al. 2014; Schön 2014). Auch der PASI scheint sowohl mit der Zahl der Th17-Zellen als auch mit der Höhe der IL-17A-Expression zu korrelieren. Neben der bereits bekannten Schlüsselrolle in der zellulären Abwehr gegen Bakterien und Pilze werden den Th17-Zellen sowie dem von ihnen produzierten IL-17 eine maßgebliche Rolle bei der Autoinflammation der Psoriasis zugeschrieben (Lynde et al. 2014). Bestätigend zeigte sich, dass die intradermale Injektion von IL-23 zu epidermaler Hyperplasie und Parakeratose führt (Chan et al. 2006).

Die Immunpathogenese der Psoriasis ist komplex und wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Zusammenspiel dendritischer Zellen mit naiven T-Zellen, welche zu Th1-, Tc1- und Th17-Zellen differenzieren und ihrerseits durch Chemokine und Zytokine residente und infiltrierende Zellen stimulieren, scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen.

Neben Keratinozyten und Leukozyten ist auch das mikrovaskuläre Endothel maßgeblich in den psoriatischen Entzündungsprozess involviert. Klinisch imponierend als Erythem, erkennt man histologisch eine vermehrte Anzahl und morphologische Änderung dermalen Blutgefäße, was auf eine fehlregulierte Angiogenese zurückzuführen ist. Die papillären Gefäße sind dilatiert, elongiert und hyperpermeabel (Schön 2005). Der potenteste Stimulus der Angiogenese ist Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), aber auch TNF α und IL-8 wirken angiogen (Ferrara et al. 2000). In Psoriasisplaques ist die VEGF-Expression gesteigert (Bhushan et al. 1999; Detmar et al. 1994; Man et al. 2008). Die Höhe des VEGF-Gewebespiegels korreliert dabei eng mit dem klinischen Erscheinungsbild (Bhushan et al. 1999). In einer 2009 erschienenen Publikation kam es unter anti-angiogener Therapie eines kolorektalen Karzinoms mit Bevacizumab, einem Antikörper gegen VEGF, auch zur Abheilung einer vorbestehenden Psoriasis (Akman et al. 2009). Der therapeutische Effekt anti-angiogener Therapien konnte auch in verschiedenen Mausmodellen psoriasiformer Entzündungen belegt werden (Diaconu et al. 2013; Yan et al. 2013; Zibert et al. 2011; Schönthaler et al. 2009).

1.1.6 Komorbidität

Obwohl bereits vor mehr als 20 Jahren über das bei Psoriasis-Patienten vermehrte Auftreten verschiedener Erkrankungen berichtet wurde (Henseler und Christophers 1995), sind diese assoziierten Krankheiten (Komorbidität) in jüngerer Zeit wieder stärker in den Fokus des klinischen und wissenschaftlichen Interesses gerückt (Boehncke et al. 2010). So treten Adipositas, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus (metabolisches Syndrom), arterielle Hypertonie und andere kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Angst und Depression bei Psoriatikern gehäuft auf (Baeta et al. 2014; Boehncke et al. 2012). Die Komorbidität hat vermutlich eine multifaktorielle Genese, geht aber zumindest teilweise auch auf gemeinsame Entzündungswege und Mediatoren zurück. Daneben können natürlich auch unabhängige Risikofaktoren wie zum Beispiel Rauchen oder therapieinduzierte Nebenwirkungen, beispielsweise durch Ciclosporin A, ursächlich an der Entstehung der Begleiterkrankungen beteiligt sein (Ni et al. 2014). Eine Abschätzung des individuellen

Risikos ist daher im Einzelfall schwierig, kann jedoch durch neu entwickelte klinische Algorithmen erleichtert werden (Wohlrab et al. 2013).

In großen Kohorten-Studien konnte gezeigt werden, dass das Risiko für das Auftreten eines Herzinfarktes unter systemischer Psoriasis-Therapie, wie Methotrexat oder TNF-Inhibition, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abnimmt. Das geringste Risiko bestand für die Patienten, die mit Kombinationstherapien behandelt wurden (Wu et al. 2012; Ahlehoff et al. 2013). Da selbst milde Ausprägungen der Psoriasis mit einem signifikant erhöhten Risiko für Begleiterkrankungen assoziiert sind (Shlyankevich et al. 2014), sind frühzeitige, effiziente und gut verträgliche (System)-Therapien wichtig.

1.1.7 Therapie der Psoriasis

Etwa zwei Drittel der Psoriasis-Patienten leiden an einer leichten Form der Erkrankung. Definitionsgemäß spricht man von einer leichten Psoriasis, wenn PASI, BSA und DLQI jeweils einen Wert von 10 nicht übersteigen. Patienten mit leichter Psoriasis werden nach den gegenwärtig gültigen Leitlinien meist ausschließlich topisch therapiert (Nast et al. 2012).

Bei starker Schuppenbildung kann eine abschuppende Therapie die Wirksamkeit der differenten Behandlung verbessern. Klassische keratolytische Substanzen sind hierfür Salicylsäure und Harnstoff (Urea) in geeigneten Grundlagen. Die gegenwärtig am häufigsten eingesetzte differente topische Therapie besteht aus einer Kombination eines Vitamin-D₃-Präparates (Calcipotriol, Tacalcitol oder Calcitriol) und eines Glukokortikosteroids (beispielsweise Betamethason-Dipropionat) (Devaux et al. 2012). Dithranol (Synonyme: Anthralin, Cignolin), ein trizyklisches Hydroxanthron-Derivat, wird wegen seiner guten Wirksamkeit bereits seit etwa 100 Jahren zur topischen Therapie der Psoriasis eingesetzt. In der Häuslichkeit wird es im Rahmen einer Minutentherapie angewendet, unter klinischen Bedingungen wird die Therapie intensiviert. Der therapeutische Effekt geht mit einer lokalen Reizung einher. Produkte aus Steinkohleteer sind, obwohl eine niederländische Untersuchung kein erhöhtes Risiko für kutane und andere Karzinome aufzeigen konnte (Roelofzen et al. 2010), heute weitgehend obsolet. Das topisch

applizierte Retinoid Tazaroten hat zwar eine signifikante Verbesserung der Psoriasis bewirkt, fand jedoch wegen seines irritativen Potentials wenig Akzeptanz und wurde inzwischen vom Markt genommen.

Bei Therapieresistenz oder ungenügendem Ansprechen sowie bei schweren Ausprägungsformen der Psoriasis (PASI>10) sollte die topische Therapie um eine Licht- und/oder Systemtherapie ergänzt oder durch diese ersetzt werden (Nast et al. 2012). Ein bewährtes Konzept ist die Behandlung mit UV-Licht. Zum Einsatz kommen hierbei die UVA-Therapie mit gleichzeitiger Verwendung des Photosensibilisators Psoralen oder die Schmalspektrum UVB-Therapie bei 311 nm (Archier et al. 2012; Grundmann-Kollmann et al. 2004).

Aus der ursprünglichen Hypothese des Chemikers Schweckendiek, dass es sich bei der Schuppenflechte um eine metabolische Störung des Zitratsäurezykluses handele, resultierte der therapeutische Einsatz von Fumarsäureestern (Schweckendiek 1959). Aus heutiger Sicht beruht der wesentliche Effekt mutmaßlich auf einer Erhöhung des Gluthationspiegels in verschiedenen Zellen und folglich auf einer Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Mrowietz und Asadullah 2005; Loewe et al. 2002), welchem eine zentrale Rolle in inflammatorischen Prozessen zugeschrieben wird. Unter dem Handelsnamen Fumaderm® hat diese Therapie heute insbesondere in Deutschland einen festen Stellenwert unter den systemischen Therapieoptionen. Gastrointestinale Reizungen sowie Lymphopenien sind die häufigsten Nebenwirkungen.

Das Retinoid Acitretin ist ebenfalls für die systemische Therapie der Psoriasis vulgaris zugelassen. Insbesondere in Kombination mit UV-Therapie können gute klinische Erfolge erzielt werden. Dosisabhängige Nebenwirkungen sind hauptsächlich Cheilitis, Haut- und Schleimhauttrockenheit sowie Hyperlipidämie und Leberbelastung (Gollnick 1996; Nast et al. 2012).

Ebenso ist die Therapie mit Methotrexat eine feste Säule der Therapie der schweren Psoriasis sowie der Psoriasis-Arthritis. Methotrexat ist ein kompetitiver Hemmer der Dihydrofolatreduktase und beeinflusst damit maßgeblich den Folsäuremetabolismus.

Eine Langzeittherapie ist möglich, am häufigsten muss die Therapie aufgrund hepatotoxischer Nebenwirkungen beendet werden (Montaudié et al. 2011).

Ähnlich gute Ergebnisse können schließlich auch mit Cyclosporin erreicht werden, dessen hauptsächlichste Nebenwirkungen Nephrotoxizität und Blutdrucksteigerungen sind (Heydendael et al. 2003).

In den letzten Jahren ist die Psoriasis-Therapie durch verschiedene Biologika deutlich vielfältiger und auch effizienter geworden. Die ersten der zur Therapie der Psoriasis und/oder Psoriasis-Arthritis zugelassenen Präparate waren TNF α -Inhibitoren (Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Etanercept) (Kivelevitch et al. 2014; Saurat et al. 2008; Reich et al. 2005; Kavanaugh et al. 2014).

Die Entwicklung und Zulassung dieser Präparate geht auf Erkenntnisse zur zentralen pathogenetischen Rolle von TNF α zurück. Wegen möglicher Nebenwirkungen (beispielsweise Infektionen) und des sehr hohen Preises (sämtlicher Biologika) muss die Verordnung unter strenger Abwägung individueller Gegebenheiten erfolgen (Schmitt et al. 2014; Fenix-Caballero et al. 2013).

Im Jahr 2009 wurde Ustekinumab, ein Inhibitor der p40-Untereinheit in IL-12 und IL-23, in Deutschland zur Therapie der mittelschweren und schweren Psoriasis zugelassen. Durch die IL-23-Inhibition reguliert Ustekinumab die Th17-Produktion und damit einen entscheidenden Schenkel der Psoriasis-Pathogenese (Chi et al. 2014). Ustekinumab wurde auch zur Behandlung der Psoriasisarthritis zugelassen (Weitz et al. 2014). Die gezielte Hemmung der p19-Untereinheit durch Guselkumab führt zur selektiven IL-23-Inhibition. Eine große Phase-2-Studie zeigte kürzlich eine sehr gute klinische Wirksamkeit dieser Therapie (Gordon et al. 2015).

Neben den bereits zugelassenen Biologika finden sich aktuell weitere Präparate in späten Stadien der klinischen Entwicklung oder wurden kürzlich zugelassen. Unter diesen sind insbesondere Secukinumab, das im Jahr 2015 zugelassen wurde, und Ixekizumab, zwei IL-17A-Inhibitoren, sowie Brodalumab, ein Inhibitor der IL-17-Rezeptors, zu nennen. Secukinumab hat aufgrund seiner guten klinischen Wirksamkeit von der EMA (European

Medicines Agency) sogar eine Empfehlung als „Erstlinien“-Therapeutikum erhalten (Gisondi et al. 2014; Frieta et al. 2014).

Schließlich können pathogenetisch relevante Signalwege auch durch kleinmolekulare Inhibitoren gehemmt werden. Apremilast, ein Phosphodiesterase-4-Inhibitor, zeigte gute Ergebnisse sowohl in der Therapie der Psoriasis als auch der Psoriasisarthritis (Moustafa et al. 2014; Kavanaugh et al. 2014). Die Zulassung dieses Präparates erfolgte im Januar 2015. Eine weitere, ebenfalls viel versprechende Substanz ist Tofacitinib. Der Wirkmechanismus beruht hierbei auf der Inhibition der Januskinasen-1 und -3, was zu verminderter Th-17 Differenzierung führt (Hsu et al. 2014).

1.2 Antitumorlipide

1.2.1 Antitumorlipide als Zytostatika

Der Begriff Zytostatika vereint eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Substanzen, die vorrangig in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Der Effekt wird durch verschiedene Wirkmechanismen erzielt, beispielsweise durch Beeinflussung des Zellzyklus oder auch durch Interkalation in die DNA. In den 1960-er Jahren wurde die gesteigerte Phagozytosefähigkeit von Makrophagen nach der Stimulation mit 2-Lysophosphatidylcholin (2-LPC) beschrieben (Munder et al. 1965; Munder et al. 1969). Allerdings waren die Substanzen sehr anfällig gegenüber Lysophospholipasen oder wurden zügig durch LPC-Acyltransferasen abgebaut, so dass sie nur eine geringe metabolische Stabilität aufwiesen. Nach der Entdeckung des antineoplastischen Potentials wurden zahlreiche Derivate erprobt, die sich sowohl durch höhere Stabilität als auch durch geringere Zytotoxizität auszeichnen.

In der Gruppe der Antitumorlipide kann man zwischen Alkyl-Phospholipiden und Alkyl-Phosphocholinen unterscheiden, wobei letztere kein Glycerol an der *sn*-2-Position

aufweisen. Der prominenteste Vertreter der Alkylphospholipide ist Edelfosine® (Et-18-OCH₃). Zur palliativen Behandlung kutaner Metastasen des Mammakarzinoms wurde das Alkylphosphocholin Hexadecyl-Phosphocholin (HePC, Miltefosine, Miltex®) zugelassen (Clive et al. 1999). Zusätzlich erfolgte eine Zulassung zur oralen Therapie der Leishmaniose (Garcia Bustos et al. 2014). In klinischen Studien wurde Miltefosine auch zur Behandlung der Urtikaria eingesetzt (Magerl et al. 2013). Darüber hinaus laufen aktuell mehrere Phase II-Studien mit Perifosine in der Tumorthherapie (Multiples Myelom, metastasiertes Melanom, Nierenzellkarzinom). Die bisherigen Anwendungsgebiete und -erprobungen sind sehr vielfältig, so dass der ursprüngliche Begriff Antitumorlipide zunehmend irreführend ist. Es ist zu erwarten, dass mit der Weiterentwicklung dieser Substanzen weitere Therapieoptionen zur Behandlung von Infektionen, Neoplasien, autoimmuner und autoentzündlicher Erkrankungen zur Verfügung stehen werden.

1.2.2 Wirkmechanismen der Antitumorlipide

Ein wesentlicher und grundlegender Bestandteil des Wirkmechanismus ist der Einbau der Antitumorlipide in die Plasmamembran. Diesbezüglich werden mehrere Mechanismen diskutiert. Neben der Endozytose (Fleer et al. 1993; Bazill und Dexter 1990) zeigen jüngere Untersuchungen eine Interaktion mit *lipid rafts* (Mollinedo et al. 2011), welche als Mikrodomänen in der Zellmembran „schwimmen“. In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration und der Zusammensetzung des Mediums wurden Blasen- und Lochbildung in der Zellmembran behandelter Zellen beschrieben (Noseda et al. 1988; Noseda et al. 1989). Die Behandlung führt zur Akkumulation des synthetischen Phospholipids in der Membran mit Einfluss auf die Membranfluidität (van Blitterswijk et al. 1987; Noseda et al. 1988; Petersen et al. 1992; Wiese et al. 2000). Nach Insertion in die Zellmembran kommt es zur Beeinflussung der Membranzusammensetzung, des Lipidmetabolismus sowie der Signaltransduktion membranständiger Rezeptoren (Marco et al. 2014).

Die Perforation der Zellmembran führt zur Zellyse und somit zum provozierten Zelltod. Des Weiteren zeigte sich, dass Antitumorlipide Apoptose in malignen Zellen induzieren können. Beispielsweise sind leukämische Zellen - im Gegensatz zu normalen Leukozyten - sensibel

gegenüber der Behandlung mit Et-18-OCH₃. Diese Apoptose ließ sich dabei in HEL-Zellen (*human erythroleukemia cells*) durch Kooexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl₂ und Bcl-X_L unterdrücken (Mollinedo et al. 1997). Die apoptotische Wirkung der Antitumorlipide scheint zumindest teilweise auf einer Translokation des „Todesrezeptors“ Fas in *membrane rafts* und deren Reorganisation zu beruhen (Gajate und Mollinedo 2001).

Neben ihrem pro-apoptotischen Potential sind Antitumorlipide (Et-18-OCH₃ und HePC) auch antiproliferativ wirksam (Wieder et al. 1999). Die Grundlagen der antiproliferativen Wirkung sind bisher nicht gänzlich geklärt. Ein vermutlich relevanter Mechanismus ist der Einfluss auf die Biosynthese von Phosphatidylcholin. Dieses ist in eukaryotischen Zellen maßgeblich am Aufbau der Zellmembran und als Baustein von *second messengers* beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass HePC und andere synthetische Phospholipide die Synthese von Phosphatidylcholin in HepG2 Zellen (*human hepatoblastoma cell line*) reduzieren (Jimenez-Lopez et al. 2002; Boggs et al. 1995; van der Luit et al. 2002). Möglicherweise führt der Einfluss auf die Phosphatidylcholinsynthese auch zu einer gesteigerten Apoptoserate.

Darüber hinaus wurden verschiedene enzymatische Regulationssysteme als Angriffspunkte identifiziert, beispielsweise Proteinkinase C (PKC), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die MAP-Kinase JNK. Diese sind sowohl für die Differenzierungs- als auch die Zellzyklusregulation der Zelle relevant (Danker et al. 2010).

Schließlich wurde die Herunterregulation der Adhäsionsmoleküle CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1) und CD54 (ICAM-1) auf HMEC-1 (*human microvascular endothelial cell line*) *in vitro* durch Et-18-OCH₃ beschrieben (Bosse et al. 1995). Zusätzlich fand sich eine Reduktion von CD62L auf humanen neutrophilen Granulozyten (Mollinedo et al. 2009).

1.2.3 Inositoylierter Plättchen-aktivierender Faktor

Der natürlich vorkommende Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) ist strukturell mit Antitumorlipiden verwandt (Danker et al. 2010). Das synthetische PAF-Derivat Ino-C2-PAF zeichnet sich durch seinen amphiphilen Charakter aus: An die *sn*-2-Position des Glycerols ist der polare 6-wertige zyklische Alkohol Inositol gebunden und am anderen Ende des Moleküls befindet sich das lipophile Phospholipid. Mit der Entwicklung von Ino-C2-PAF gelang es, die Effektivität dieser Substanzen bereits in niedrigeren Konzentrationen zu erhöhen bei gleichzeitig geringerer Zytotoxizität. Ino-C2-PAF hemmt signifikant die Proliferation von HaCaT-Zellen (Fischer et al. 2006). Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit den Strukturanaloga GLc-PAF und GLc-PC führt ebenfalls zu verringerter Proliferation bei vergleichsweise höherer Zytotoxizität (Fischer et al. 2006; Danker et al. 2010).

Ino-C2-PAF kann in Jurkat-Zellen den intrinsischen programmierten Zelltod in Abhängigkeit von FADD (Fas-associated protein with death domain) und Caspase- 8 einleiten. Parallel zu den Ergebnissen mit Et-18-OCH₃ lässt sich dieser Effekt ebenfalls durch die Expression von Bcl₂ inhibieren (von Haefen et al. 2011). Neben der antiproliferativen Wirkung, welche unter anderem auf einer gesteigerten Apoptoserate basiert, wurden bereits weitere maßgebliche Effekte beschrieben. So beeinflusst Ino-C2- PAF die Differenzierungsmarker Involucrin und die Transglutaminase in HaCaT-Zellen (Fischer et al. 2006). Die Herabregulation der Phosphorylierung der FAK (Focal Adhesion Kinase) und der Tyrosinkinase Src nach Inkubation mit Ino-C2-PAF führt sowohl in HaCaT-Zellen als auch in der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SCC-25 zu verminderter Beweglichkeit der Zellen (Semini et al. 2011a). Die Zellmotilität ist ein entscheidender Faktor im Rahmen der Metastasierung von Tumorzellen.

Die vielfältigen Effekte beruhen zum einen auf der direkten Wirkung auf Proteinebene als auch auf dem Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene. Ino-C2-PAF führt in HaCaT-Zellen zu reduzierter Expression für die humorale und zelluläre Immunantwort relevanter Gene (Semini et al. 2011b; Semini et al. 2014). Der Effekt auf Transkriptionsebene ließ sich in einem In-vitro- Entzündungsmodell bestätigen (Semini et al. 2014). Diese Ergebnisse untermauern die breite anti-inflammatorische Wirkung von Ino-C2- PAF. Aktuell konnte der gesamte Wirkmechanismus von Ino-C2-PAF noch nicht

endgültig geklärt werden. Allerdings ist klar, dass die Plasmamembran - wie bei anderen Antitumorlipiden - der wichtigste Angriffsort ist (Danker et al. 2010).

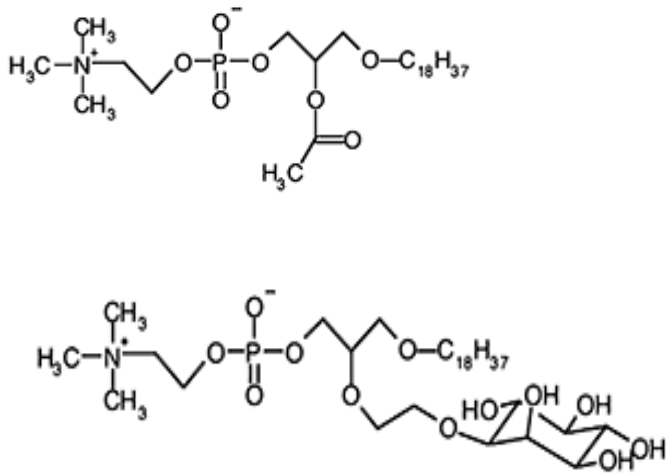


Abb. 2: Strukturformeln des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF, obere Strukturformel) und Ino-C2-PAF (untere Strukturformel).

1.3 Zielsetzung

Die bisher vorliegenden Untersuchungen belegen, dass Ino-C2-PAF grundlegende zelluläre Prozesse, die für die Karzinogenese und Tumorprogression relevant sind, inhibieren kann. Allerdings spielen viele der durch Ino-C2-PAF beeinflussten Prozesse auch bei entzündlichen Erkrankungen wichtige Rollen. Beispielsweise finden sich bei der Psoriasis gesteigerte Proliferation der Keratinozyten, fehlregulierte Angiogenese sowie Rekrutierung und Aktivierung pathogener Immunzellen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, erstmals zu überprüfen, ob und inwieweit Ino-C2-PAF auch Mechanismen chronischer Entzündungen hemmen kann. Besonderer Wert wurde dabei auf pathophysiologische Prozesse, die auch bei der Psoriasis relevant sind, gelegt. Es wurden umfangreiche funktionelle In-vitro- als auch präklinische In-vivo-Untersuchungen (in zwei komplementären Tiermodellen) durchgeführt.

Letztlich war das Ziel, mit dem Einsatz der Substanz bei entzündlichen Erkrankungen therapeutisches „Neuland“ zu betreten. Dazu wurden die folgenden Fragen adressiert:

1. Werden die Proliferation und die Apoptose menschlicher Endothelzellen, also zwei Funktionen, die wesentlich an gestörter Angiogenese beteiligt sind, durch Ino-C2-PAF beeinflusst?
2. Geht die Wirkung von Ino-C2-PAF auf Endothelzellen mit veränderter Expression und Regulation entzündungs-relevanter Rezeptoren, insbesondere Selektinen und Immunglobulin-artigen Adhäsionsmolekülen, einher?
3. Bewirkt Ino-C2-PAF phänotypische und funktionelle Änderungen von Leukozyten?
4. Sind die durch Ino-C2-PAF in Endothelzellen und Leukozyten hervorgerufenen Veränderungen relevant für deren dynamische funktionelle Interaktion, einem wichtigen Vorgang bei der Pathogenese von Entzündungen?
5. Sind die *in vitro* nachgewiesenen Wirkungen von Ino-C2-PAF auch *in vivo* relevant? Können in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen, einem präklinischen murinen Modell der Psoriasis, therapeutische Wirkungen erzielt werden?
6. Können die im K5.hTGF β 1-transgenen murinen Psoriasis-Modell nachgewiesenen Wirkungen in einem unabhängigen zweiten Modell, c-Jun/JunB-defizienten Mäusen, reproduziert werden und kann so die Evidenz für eine allgemein gültige Aussage zur anti-entzündlichen Wirkung von Ino-C2-PAF gestärkt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|---|
| 2-Propanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| 3-Amino-9-Ethyl Carbazol, AEC | Dako, Glostrup, Dänemark |
| AB-Serum | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Accutase | PAA, Pasching, Österreich |
| Agarose LE | Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland |
| Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Beta-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Borsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Carboxyfluoreszein Diazetat | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Succinimidyl Ester, CFDA-SE | |
| Dimethylsulfoxid, DMSO | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| DMEM high Glucose (4,5 g/l) | PAA, Pasching, Österreich |
| dNTP mix, 10 mM | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| EDTA | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Endothelial Growth Medium, EGM | Lonza, Walkersville, USA |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Fetal Calf Serum Gold, FCS | PAA, Pasching, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Ficoll-Paque Plus | GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK |
| GelRed™ | Biotium, Hayward, CA, USA |
| GeneRuler™ 100bp Plus, DNA Ladder | Fermentas, St. Leon- Roth, Deutschland |
| Hank's Buffered Salt Solution, HBSS | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Hämatoxylin | DAKO, Glostrup, Dänemark |
| HCl | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Heparin | Rotexmedica, Trittau, Deutschland |
| Ino-C2-PAF | Inositoylierter Plättchen-aktivierender Faktor mit C ₂ -Brücke |
| Isofluran (Forene®) | AbbVie, North Chicago, Illinois, USA |
| L-Glutamin (200 mM) | PAA, Pasching, Österreich |
| Kaliumchlorid, KCl | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Mayers Hämalaunlösung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Mounting Medium | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Natriumchlorid, NaCl 0,9% | Procter and Gamble, Genf, Schweiz |
| Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃ | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| O.C.T. Tissue Tek | Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Paraformaldehyd | Roth, Karlsruhe Deutschland |
| PBS ohne Ca und Mg | PAA, Pasching, Österreich |
| Penicillin/ Streptomycin | PAA, Pasching, Österreich |
| Propidiumiodid | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| RPMI-1640 | PAA, Pasching, Österreich |
| Taq DNA Polymerase | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| TNF alpha | ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland |

| | |
|--|-------------------------------|
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin-EDTA (1x) 0,05/0,02% in PBS | PAA, Pasching, Österreich |
| Trypanblau | PAA, Pasching, Österreich |
| Türks-Lösung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ (30 %) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Xylol (Isomere) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |

2.1.2 Geräte

| | |
|-------------------------------------|--|
| Absaugsystem Vacusafe comfort | IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland |
| Appliskan | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Autoklav | Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan |
| Brutschrank HERAccl 150 (i) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Elektrophoresekammer Sub-Cell GT | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| FACSCanto II | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Feinwaage Acculab | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Flusskammer | Einzelanfertigung |
| Gel Imager U, Genius | Syngene, Cambridge, UK |
| Heizblock Thermo Stat plus | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Inverses Mikroskop, Axiovert 200 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Isopropanol-Kryo-Container | Nalgene, Rochester, NY, USA |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Kamera, CoolSNAP ES | Photometrics, Tucson, AZ, USA |
| Kryomikrotom (CM 3050 S) | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Kühltisch Leica (EG 1150 C) | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Laborwaage CP 323 S | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Mastercycler PCR | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop Axio Imager M1 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikroskop Axioskop 2 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikroskop Axiovert 40 C | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikroskop Axiovert 200 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikrotom LEICA RM 2235 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Photometer Genesys 10 Bio | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Schüttler | Grant-bio, Cambridge, UK |
| Spritzenpumpe SP100IZ (Perfusor) | WPI, Sarasota, FL, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Tischzentrifuge Heraeus Pico17 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| TrayCell | Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland |
| Vevo Compact Dual | Sonics Inc., Toronto, Kanada |
| Anesthesia System | |
| Vortex Mixer L- 46 | Labinco, Breda, Niederlande |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach, Deutschland |
| Zellkulturbank BDK | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland |
| Zellkulturbank HERAsafe | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Zellkulturbank Safe 2020 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge, Megafuge 1.0 (R) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge, Multifuge 1S- R Heraeus | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

Zentrifuge Rotina 35 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Chamber Slides | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Coverslips | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Deckgläser (Menzel Gläser) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Eppendorf Gefäße | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| FACS-Röhrchen | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Falcon-Röhrchen | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Filterpapier | BioRad, München, Deutschland |
| Glaspipetten 150 mm | WU, Mainz, Deutschland |
| Kanüle Microlance 3 | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Objektträger Superfrost Plus | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Petrischalen | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Safety-Multifly-Set | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipetten | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Spritzen 1 ml | B. Braun, Melsungen, Deutschland |
| Spritzen 20 ml | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Zellkulturflaschen 25 cm ³ , 75 cm ³ | Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich |

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

| | |
|---|--------------------------------|
| Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} | Roche, Mannheim, Deutschland |
| CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay | Promega, Mannheim, Deutschland |

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| E.Z.N.A.™ Total RNA Kit I | Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA |
| Taq DNA Polymerase all inclusive | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| RNase-Free DNase I Set | Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA |

2.1.5 Antikörper

| Primäre Antikörper | Ursprung | Isotyp | Ziel | Hersteller |
|--------------------|----------|--------------------|--------|--|
| Anti-CD54-FITC | Maus | IgG1 | Mensch | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Anti-CD106 | Maus | IgG1 | Mensch | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Anti-CD62E-PE | Maus | IgG1 | Mensch | Antibodies-online, Aachen, Deutschland |
| Anti-CD3-FITC | Maus | IgG1 _k | Mensch | Dako, Glostrup, Denmark |
| Anti-CD3-PE | Maus | IgG1 _k | Mensch | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Anti-CD62L-PE | Maus | IgG1 _k | Mensch | BD, Franklin Lakes, USA |
| Anti-CD11a-FITC | Maus | IgG _{2ak} | Mensch | BD, Franklin Lakes, USA |
| Anti-CD49d-FITC | Maus | IgG1 | Mensch | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Anti-CLA-FITC | Ratte | IgM _k | Mensch | Biolegend, San Diego, USA |
| Anti-CD3e-FITC | Hamster | IgG | Maus | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Anti-CD11a-PE | Ratte | IgG _{2ak} | Maus | Biolegend, San Diego, USA |
| Anti-CD49d-PE | Ratte | IgG _{2bk} | Maus | Biolegend, San Diego, USA |
| Anti-CD62L-APC | Ratte | IgG _{2a} | Maus | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Isotyp-Kontrollen | Ursprung | Isotyp | Ziel | Hersteller |
| Isotyp-FITC | Ratte | IgG _{2b} | | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Isotyp-APC | Hamster | IgG | | eBioscience, San Diego, USA |
| Isotyp-PE | Ratte | IgG _{2b} | | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Isotyp-PE | Maus | IgG1 | | Immunotools, Friesoythe, Deutschland |
| Isotyp-FITC | Hamster | IgG1 _k | | BD, Franklin Lakes, USA |

| Sekundäre Antikörper | Ursprung | Isotyp | Ziel | Hersteller |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------|------|---------------------------|
| Sekundärantikörper anti-Maus PE | Kaninchen | Ig(F(ab) ²) | Maus | Dako, Glostrup, Denmark |
| Sekundärantikörper anti-Maus FITC | Ziege | IgG | Maus | Invitrogen, Carlsbad, USA |

2.1.6 Lösungen und Puffer

10x TBE

108 g Tris
 55 g Borsäure
 40 ml 0,5 M EDTA
 1000 ml Aqua Bidest

10x PBS

400 g NaCl
 10 g KCl
 72 g Na₂HPO₄ mit H₂O₂
 10 g KH₂PO₄
 5000 ml Aqua Bidest

1x PBS

100 ml 10x PBS
 900 ml Aqua Bidest
 100 µl 32 % H₂O₂

10x Erythrozytenlysispuffer

80,2 g 1,5 M NH₄Cl
 8,4 g 100mM NaHCO₃
 20 ml mM disodium EDTA
 980 ml Aqua Bidest

2.1.7 Software

| | |
|-----------------------|--|
| Axio Vision Rel 4.7 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| FACS Diva Software | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| ImageJ | National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA |
| MetaMorph 6.3r2 | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA |
| Microsoft Office 2010 | Microsoft, Redmond, WA, USA |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte bei konstanten Umgebungsbedingungen von 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

2.2.1.1 HUVEC

In den Versuchen wurden humane Endothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) von Lonza (Basel, Schweiz) verwendet. Die Endothelzellen wurden in EGM, angereichert mit 2% FCS, 0,1 % Hydrocortison, 0,1 % rhEGF, 0,4 % BBE (Bovine Brain Extract) und 0,1% GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B) kultiviert. Da sich Charakteristika der HUVEC im Laufe längerer Kultur ändern könnten, wurden diese Zellen nur bis zur sechsten Passage verwendet.

Nach dem Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung wurden sie in Zellkulturflaschen ausgesät und es erfolgte alle 2-3 Tage ein Wechsel des Mediums. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% erfolgte die nächste Passage oder die Aussaat für ein Experiment. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Accutase bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden wieder in PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 250 rpm

zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellsediment wurde in Medium re-suspendiert, die Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend entsprechend verdünnt in Kulturflaschen ausgebracht. 24 Stunden vor dem Beginn eines Versuchs wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf das Verarmungsmedium (EGM versetzt mit 1% FCS, 0,1 % Hydrocortison, 0,1 % rhEGF, 0,4 % BBE und 0,1 % GA-1000) umgesetzt.

2.2.1.2 HaCaT

Spontan immortalisierte HaCaT-Keratinocyten (Boukamp et al. 1988) wurden in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kultiviert. Dieses war angereichert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen für die Passage zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Durch die Zugabe von 5,5 ml Wachstumsmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1200 rpm für 4 Minuten zentrifugiert, und erneut ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurden die Keratinocyten auf serumfreies Medium, Keratinocyten-SFM (+ 0,1 ng/µl rEGF + 20 µg/ml BPE) umgesetzt.

2.2.1.3 Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

PBMC wurden gemäß Standardprotokoll isoliert (siehe 2.2.6) und in jeweils 2 ml mit einer Zellzahl von 1 Million/ml in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit RPMI-Medium (angereichert mit 1% L- Glutamin, 1% FCS und 0,1% β-Mercaptoethanol) inkubiert. Nach der Behandlung mit Ino-C2-PAF über 2 Stunden wurden die Zellen jeweils mit RPMI-Medium aus den Röhrchen pipettiert. Nach einer Zentrifugation mit 250 x g für 5 Minuten wurde das verbliebene Zellsediment mit HBSS gewaschen, erneut zentrifugiert und die Zellen wurden anschließend ausgezählt.

2.2.2 MTT-Test (Viabilitätstest)

Bei dem MTT-/ Proliferationstest „CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ handelt es sich um eine Methode, welche mittels kolorimetrischer Messung Aussagen über das Proliferationsverhalten der zu untersuchenden Zellen liefert und somit Rückschlüsse auf die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen zulässt. Genau genommen wird indirekt über die metabolische Aktivität die Viabilität der Zellen gemessen; da diese jedoch unter vielen Versuchsbedingungen, insbesondere dann, wenn entsprechende Standards mit gemessen werden, mit der Proliferation korreliert, wird der MTT-Test oft vereinfacht als Proliferations-Test bezeichnet. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Reduktion eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) in wasserunlösliches Formazan. Diese Umwandlung geschieht durch die Reduktion des Salzes durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen, wobei diese Reaktion ausschließlich in stoffwechselaktiven Zellen stattfindet. Durch abschließende Lyse der Zellen wird das blaue Reaktionsprodukt freigesetzt und kann photometrisch gemessen werden.

Die Endothelzellen wurden in einer 96-Well-Platte à 10.000 in 100 µl Wachstumsmedium ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 90% erfolgten ein Waschschrift mit PBS und eine weitere Inkubation für 24 h mit dem Verarmungsmedium. Ino-C2-PAF wurde im Verarmungsmedium entsprechend der erwünschten Konzentration verdünnt und die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Vier Stunden vor Versuchsende erfolgte die Zugabe von TNF α (25 ng/ml) in die dafür vorgesehenen Proben. In jede Vertiefung (Well) der Zellkulturplatten wurden anschließend 15 µl der Färbelösung pipettiert und die Kulturen wurden für 4 h im Brutschrank bebrütet. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von je 100 µl Stopplösung beendet, welche über Nacht unter Standardbedingungen im Brutschrank einwirkte. Die Auswertung erfolgte durch die photometrische Messung der Absorption bei 570 nm und 650 nm.

2.2.3 Apoptose-Messung

Bei der Apoptose entstehen durch Caspasen spezifische DNA-Fragmente und Histon-assoziierte Nukleosomen, welche mit dem verwendeten Enzym-Immuntest „Cell Death Detection ELISA^{plus}“ detektiert werden können.

Aussaat und Behandlung der Zellen erfolgten wie beim MTT-Test. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Kulturplatten bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde mittels einer Pipette entfernt, das verbliebene Zellsediment wurde in 200 µl Lysispuffer re-suspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt führt zum Aufbrechen der Zellen und zur Freisetzung der Nukleosomen. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen. Daraufhin wurden je 20 µl des Lysat-Überstandes in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiter-Platte übertragen.

Pro Well erfolgte die Zugabe von je 80 µl Immunreagenz. Im Immunreagenz enthaltene Anti-DNA-Antikörper und der Anti-Histon-Antikörper bewirken eine beidseitige Markierung der Nukleosomen im so genannten Sandwich-Komplex. Dieses Reagenz wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit je 200 µl Inkubationspuffer wurde die Farbreaktion unter optischer Kontrolle durch Zugabe von 100 µl ABTS-Lösung (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) gestartet und durch das Hinzufügen von je 100 µl Stopplösung beendet. Die Antikörper-gekoppelte Peroxidase bewirkt einen Farbumschlag von farblos zu grün. Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 405 nm und der Referenzwellenlänge von 490 nm.

2.2.4 Nukleinsäureanalysen

2.2.4.1 mRNA-Isolierung und DNase-Verdau

Die Isolierung der RNA aus Endothelzellen und Keratinozyten wurde mit dem RNA Kit I von E.Z.N.A.TM durchgeführt.

Die Zellen wurden in T75-Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 90% bebrütet. Anschließend wurden je 100.000 Zellen in T25-Flaschen gesät. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in Wachstumsmedium, danach schlossen sich ein Waschschrift mit PBS und die weitere Inkubation für 24 Stunden im Verarmungsmedium an. Nach dieser Zeit wurde Ino-C2-PAF in verschiedenen und im Text spezifizierten Konzentrationen zum Medium gegeben und die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert. Vier Stunden vor Beginn der Lyse erfolgte die Zugabe von TNF α (25 ng/ml). Vor der Isolierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, in PBS aufgenommen und bei 250 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Die im Sediment verbliebenen Zellen wurden daraufhin mit 350 μ l 2-Mercaptoethanol-haltigem TRK-Lysepuffer gelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze durch eine 20G-Kanüle wurden die Zellen aufgebrochen, damit die RNA freigesetzt wurde. Das Homogenisat wurde mit 350 μ l 70% Ethanol gemischt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll; der DNA-Verdau wurde dabei mittels RNase-freier DNase durchgeführt. Die RNA wurde abschließend in mit DEPC (Diethylidcarbonat)-behandeltem Wasser eluiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Das Verhältnis der dabei ermittelten optischen Dichten (OD_{260}/OD_{280}) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde durch reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Dafür wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas®“ verwendet. Für die Synthese wurde je 1 μ g mRNA eingesetzt und mit nucleasefreiem Wasser auf 10 μ l aufgefüllt. Die Zugabe von jeweils 1 μ l Oligo dT18-Primer und die sich anschließende Inkubation von 5 Minuten bei 65°C bewirkt das Anlagern der Primer an die Enden der RNA. Die Proben wurden auf Eis gekühlt. Entsprechend den Vorgaben des Herstellers wurden je 9 μ l des „Mastermix“ zu den Proben pipettiert, welcher jeweils folgende Substanzen enthielt:

| | |
|---|-------------|
| 5 x Reaktionspuffer | 4 µl |
| 10 mM dNTP Mix | 2 µl |
| Ribonuclease-Inhibitor (20 U/µl) | 1 µl |
| <u>Reverse Transkriptase (200 U/µl)</u> | <u>2 µl</u> |
| Gesamtvolumen | 9 µl |

Im Anschluss wurden die Proben erneut gemischt, kurz zentrifugiert und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) können definierte Abschnitte einer DNA-Sequenz amplifiziert werden. Im ersten Schritt werden durch Erhitzen die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von 94°C aufgespalten (Denaturierung). In der darauf folgenden Anlagerungsphase können sich die Primer an die entsprechenden homologen DNA-Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern. Das dabei vorherrschende Temperaturoptimum ist spezifisch für jeden Primer. Es wird jeweils ein Vorwärts- (engl. forward) und ein Rückwärts (engl. reverse)-Primer benötigt. Anschließend erfolgt die Elongation bei 72°C. Die Dauer der Elongation hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ab. Die verwendete Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, lagert die freien Nukleotide an die Primer an und fügt sie zu einem DNA-Strang zusammen. Die Taq-Polymerase kann bis zu 1000 Basenpaare pro Minute amplifizieren. Die Zyklen werden insgesamt ca. 25 bis 35 Mal wiederholt.

2.2.4.3.1 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte erfolgte mit Hilfe eines Mastercyclers. Zu 1 µl cDNA wurde jeweils ein Mastermix pipettiert, wobei die Taq-Polymerase zuletzt hinzugefügt wurde.

| | | |
|----------------|-----------------------|---------------|
| Mastermix PCR: | Aqua bidest | 19,9 µl |
| | 10 x Puffer S | 2,5 µl |
| | 10 µM dNTPs | 0,5 µl |
| | 10 µM Primer forward | 0,5 µl |
| | 10 µM Primer reverse | 0,5 µl |
| | cDNA | 1 µl |
| | <u>Taq-Polymerase</u> | <u>0,1 µl</u> |
| | Gesamtvolumen | 25 µl |

Es wurde für jede Durchführung jeweils eine Negativkontrolle erstellt. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte im Mastercycler unter folgenden Reaktionsbedingungen:

| | | |
|-------------------------------|-----------|--------|
| Initiale Denaturierung: | 94°C | 3 min |
| Denaturierung: | 94°C | 30 sec |
| Anlagerungsphase (Annealing): | 55 – 62°C | 30 sec |
| Elongation: | 72°C | 30 sec |
| Finale Elongation: | 72°C | 5 min |

Für die Amplifikation wurden folgende Primer und Versuchsbedingungen verwendet:

GAPDH (58°C/ 26 Zyklen, 451 bp)

For 5' – CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C – 3'

Rev 5' – TTC GTT GTC ATA CCA GGA AAT G – 3'

VCAM-1 (58°C/ 30 Zyklen, 355 bp)

For 5' – CCA GAA TCT AGA TAT CTT GCT C – 3'

Rev 5' – CAG CCT GTC AAA TGG GTA TAC – 3'

ICAM-1 (55°C/ 26 Zyklen, 379 bp)

For 5' – TGA CCA GCC CAA GTT GTT GG – 3'

Rev 5' – ATC TCT CCT CAC CAG CAC CG – 3'

E-Selektin (56°C/ 26 Zyklen, 308 bp)

For 5' – AAG CCT GGC AGT TCC GGG – 3'

Rev 5' – GGC TTT GGC AGC TGC TGG – 3'

VEGF (55°C/ 30 Zyklen, 469 bp)

For 5' – CGA AGT GGT GAA GTT CAT GGA – 3'

Rev 5' – TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG T – 3'

IL-8 (62°C/ 26 Zyklen, 253 bp)

For 5' – ACA AGC TTC TAG GAC AAG AGC CAG GAA G – 3'

Rev 5' – GTG AAT TCA GTG TGG TCC ACT CTC AAT C – 3'

MCP-1 (58°C/ 26 Zyklen, 297 bp)

For 5' – GCT CAT AGC AGC CAC CTT CAT TC – 3'

Rev 5' – TGC AGA TTC TTG GGT TGT GGA G – 3'

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer unter Hitze (90°C) gelöst. Zusätzlich wurden dem Gemisch 3 µl GelRed® hinzugefügt und die Proben wurden gründlich durchmischt. Anschließend konnte das Gel in die Gelkammer gegossen werden. Nach Aushärtung wurden die einzelnen Taschen mit jeweils 5 µl DNA und 5 µl Ladepuffer gefüllt. In eine der Taschen wurde als Größenstandard eine 100 bp DNA-„Leiter“ pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 60 Minuten. Die Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.5 Indirekte und direkte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Adhäsionsmolekül-Expression wurden jeweils 30.000 humane Endothelzellen (HUVEC), die in 500 µl Wachstumsmedium suspendiert waren, in gekammerte Zellkultur-Objektträger (Chamber Slides) gesät und im Zellkultur-Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden im Verarmungsmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ino-C2-PAF für weitere 24 h, und vier Stunden vor Beginn der Färbung wurden einzelne Wells noch mit jeweils 25 ng/ml TNFα versetzt.

Zur Analyse wurden die Chamber Slides zunächst zweimal mit je 500 µl PBS (4°C) gewaschen. Die Fixation der adhären Zellen erfolgte durch kaltes Methanol (-20°C) für 5 Minuten. Zur Inhibition endogener Enzyme wurden die Wells mit einer blockierenden Lösung (PBS + 5% FCS) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Bei der direkten Immunfluoreszenz wurden im nächsten Schritt spezifische fluoreszenzmarkierte Primärantikörper hinzugefügt, welche direkt an das Antigen der Zielstruktur binden. Im Gegensatz dazu ist bei der indirekten Fluoreszenzfärbung der primäre Antikörper nicht mit einem Fluorophor konjugiert und daher die Zugabe eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers notwendig.

Primär- und Sekundärantikörper wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit Antikörpergrundlösung (PBS + 2,5% FCS) verdünnt. Davon wurden jeweils 300 µl

in ein Well pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumler oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Kammern mehrmals mit PBS gewaschen und dann bei Raumluft getrocknet. Vor der Fertigstellung wurden die Flüssigkeitssperren zwischen den Kammern mit der mitgelieferten Vorrichtung entfernt. Die Einbettung der Präparate erfolgte dann mit je 10 µl Mounting Medium, welchem DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt wurde. Die Objektträger wurden blasenfrei mit Deckgläschen abgedeckt und mit Klarlack fixiert und vor Austrocknung geschützt. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1 und der Software Axio Vision. Fotografien wurden bei standardisierten Filter-, Belichtungs-, Blenden- und Expositionseinstellungen aufgenommen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.2.6 Isolierung humaner Lymphozyten und CFSE-Färbung

Die Versuche mit isolierten Lymphozyten freiwilliger Probanden wurden von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt. Die Lymphozytenisolierung erfolgte aus frisch entnommenem heparinisiertem Vollblut. Das Blut wurde in gleichen Anteilen mit HBSS vermischt. Die Auftrennung in die verschiedenen Dichtegradienten erfolgte mittels Ficoll-Paque-Plus. Dazu wurde jeweils in ein 50 ml Reaktionsröhrchen 10 ml Ficoll gefüllt, welches dann vorsichtig mit dem HBSS-Blutgemisch überschichtet wurde. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 410 x g bei Raumtemperatur ohne Bremsvorgang entstehen klar abgegrenzte Phasen. Am Boden des Reaktionsgefäßes sedimentieren die Erythrozyten sowie die Granulozyten. Zwischen der sich darüber befindlichen Ficoll-Phase und dem Plasma, welches aufgrund seiner geringen Dichte die oberste Schicht bildet, befindet sich als so genannte Interphase eine Schicht aus Lymphozyten und Monozyten. Diese mononukleären Zellen wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und im Verhältnis 1:4 mit HBSS vermischt. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten an. Die Lymphozyten wurden daraufhin mit CFDA-SE (Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester) markiert. Dabei handelt es sich um einen membrangängigen Farbstoff, welcher intrazellulär in das fluoreszierende CFSE (Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester) gespalten wird.

Dazu wurden 2 µl des in DMSO gelösten CFDA-SE in einer Konzentration von 10 mM in 10 ml HBSS (37°C) gelöst, das nach der Zentrifugation verbliebene Zellsediment darin re-suspendiert und für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen. Der dadurch entstandene Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 10 ml HBSS (37°C) re-suspendiert und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde abermals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals mit HBSS gewaschen. Das entstandene Zellsediment wurde in HBSS re-suspendiert und mittels Türks-Lösung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.7 Flusskammerexperimente

Die Anwendung der individuell angefertigten Flusskammer (Abb. 3) ermöglicht es, *in vitro* die Bedingungen des Blutflusses zu simulieren und somit dynamische Interaktionen zwischen adhären Endothelzellen und im Flüssigkeitsstrom bewegten Leukozyten zu untersuchen. Dafür werden Endothelzellen auf einem Objektträger bis zur Konfluenz kultiviert. Kurz vor dem Experiment wird dieser Objektträger auf einen Acrylquader platziert. Dieser Acrylquader besitzt in der Mitte eine Aussparung mit einer Breite von 5 mm, einer Länge von 35 mm und einer Tiefe von 50 µm. An einer Seite befindet sich ein Zulauf- und an der gegenüber liegenden Seite ein Ablaufschlauch. Der Acrylquader mit dem Endothelzellen tragenden Objektträger wird in einem passenden Aluminiumgestell mit Exzenter-Schrauben fixiert. An den Zulaufschlauch wird eine 1 ml-Spritze angebracht, deren gleichmäßige und stufenlos regelbare Entleerung über eine nicht-peristaltische Infusionsspritzenpumpe gewährleistet wird. Die Flussrate betrug 1,12 ml/h. Aufgrund der Höhe und Breite der Kammer ergibt sich eine Flusskraft von 0,0000149 N/cm² (1,49 dyn/cm²), was in etwa dem physiologischen Fluss in kleinen Blutgefäßen (Kapillaren und Venolen) entspricht.

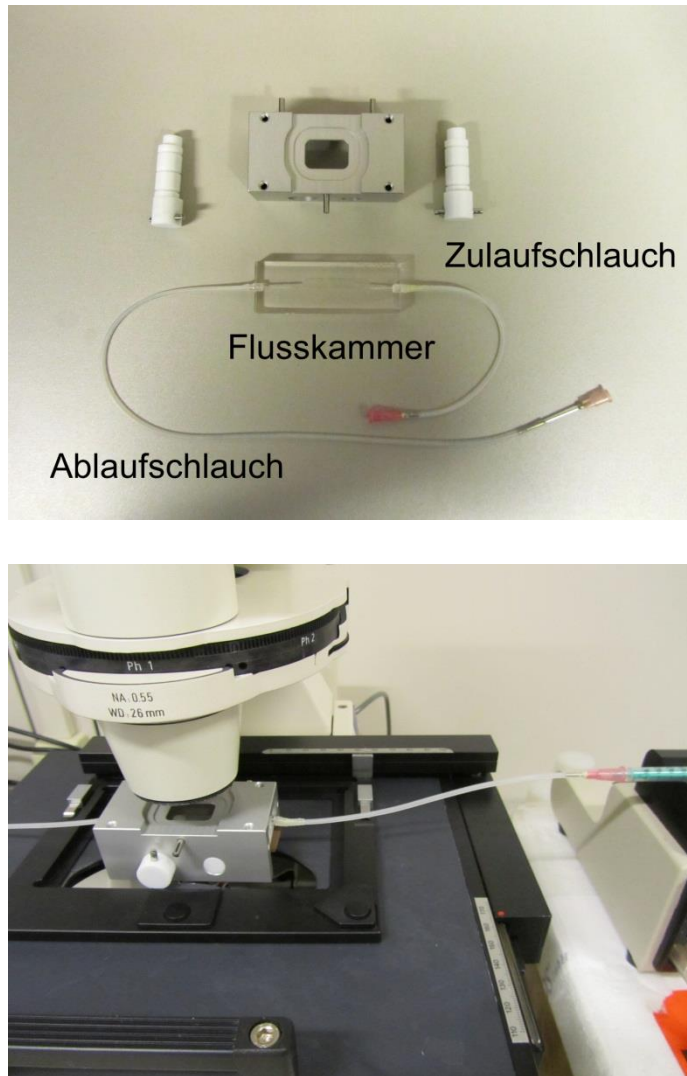


Abb. 3: Flusskammer mit Versuchsaufbau.

2.2.7.1 Aussaat der Endothelzellen auf den Glasboden der Flusskammer

Zur Durchführung der Flusskammerexperimente wurden die Endothelzellen bei einer Konfluenz von 90% auf Objektträger (Thermanox™) ausgesät. Dazu wurden die Zellen in üblicher Weise aus den Kulturflaschen geerntet und in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Milliliter in Wachstumsmedium suspendiert. Die Objektträger wurden in

Petrischalen gelegt und mit einer Glaspipette wurde vorsichtig jeweils ein Milliliter der Zellsuspension auf der Oberfläche der Objektträger verteilt. Nach 4 Stunden Kultur bei 37°C wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen angewachsen waren und einen dichten Rasen bildeten. Anschließend wurden die Objektträger in den Petrischalen mit 7 ml Wachstumsmedium überschichtet. Nach 24 Stunden wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und die Zellen wurden für nochmals 24 Stunden in Verarmungsmedium kultiviert. Sofern der Versuchsplan die Behandlung der Endothelzellen vorsah, wurden sie für 24 Stunden mit Ino-C2-PAF in verschiedenen im Text angegebenen Konzentrationen inkubiert. War keine Behandlung notwendig, wurde nur das Verarmungsmedium erneuert.

2.2.7.2 Durchführung der Flusskammerexperimente

Die fluoreszierenden (mit CFSE intravital markierten) Leukozyten (PBMC) wurden, je nach Experiment, mit Ino-C2-PAF behandelt oder unbehandelt in einer Dichte von 10^6 Zellen pro Milliliter in HBSS mit 2 mM CaCl_2 suspendiert. Die Leukozyten-Suspension wurde in einer 1 ml-Spritze aufgenommen und mit der Infusionsspritzenpumpe in die Flusskammer perfundiert. Zu Beginn des Experimentes wurde die Infusionsspritzenpumpe auf eine Flussgeschwindigkeit von 1,12 ml/h eingestellt. Im abgedunkelten Raum konnte der Fluss der markierten Lymphozyten im FITC-Kanal des Fluoreszenzmikroskopes (Axiovert 200) beobachtet und digital archiviert werden. Mit der Software Metamorph (Molecular Devices) erfolgte die Auswertung am Computer. Zur standardisierten quantitativen Bestimmung des Rollens wurden im Flüssigkeitsstrom abgebremste Zellen für 10 Minuten in einer 16-fachen Vergrößerung ausgezählt (Lockmann und Schön 2013; Lockmann und Schön 2014; Giegold et al. 2009). Direkt im Anschluss wurden die fest adhärenen Zellen auf den Objektträgern standardisiert bei einer 8-fachen Vergrößerung fotodokumentiert und ausgezählt.

2.2.8 Durchflusszytometrie

2.2.8.1 Endothelzellen

Jeweils 80.000 Endothelzellen pro Well wurden in 1 ml Wachstumsmedium in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Umsetzung auf das Verarmungsmedium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für einen weiteren Tag mit Ino-C2-PAF in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Vier Stunden vor Versuchsende wurden die Zellen mit TNF α (25 ng/ml) stimuliert. Für das Experiment wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, die adhären Endothelzellen wurden mittels Accutase gelöst und anschließend in PBS mit 5% AB-Serum in ein FACS-Röhrchen aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde bis auf einen Rest von etwa 50 μ l abgesaugt. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schütteln re-suspendiert, der Primärantikörper wurde hinzugefügt und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und bei Bedarf mit einem mit fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper erneut für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Vor Versuchsbeginn erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS mit anschließender Zentrifugation, bevor die Zellen in 500 μ l PBS re-suspendiert wurden. Die Oberflächenexpression der Moleküle VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54) und E-Selektin (CD62E) wurde durchflusszytometrisch am FACSCanto II bestimmt und mit der FACS Diva-Software ausgewertet.

2.2.8.2 Humane Lymphozyten

Nach ihrer Isolierung aus dem peripheren Blut wurden humane Lymphozyten in angereichertem RPMI-Medium kultiviert. Die Behandlung mit Ino-C2-PAF erfolgte über 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂. Nach Abschluss der Behandlung wurde die Zellsuspension bei 1100 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml PBS mit 5% AB-Serum re-suspendiert. Jeweils 100.000 Zellen/ml wurden auf FACS-Röhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden anschließend nochmals für 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand

wurde bis auf einen Rest von etwa 50 μ l abgenommen. Die Antigen-Detektion erfolgte mit direkt konjugierten Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden CD3-positive T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Expression von CD11a (LFA-1, Leukocyte Function-associated Antigen-1, Integrin α_L), CD49d (VLA-4, Very Late Antigen-4, α_4 -Integrin), CD62L (L-Selektin) und CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) untersucht.

2.2.8.3 Murine Lymphozyten

Nach Entnahme des Mausblutes erfolgte die zweimalige Erythrozytenlyse. Es wurden jeweils 100.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte für Suspensionszellen ausgesät. In jedes Well wurde 0,5 μ l Fc-Blocklösung (enthält blockierende Antikörper gegen CD16/CD32 (Fc- γ III- und Fc- γ II-Rezeptoren)) pipettiert und die Kulturplatten wurden für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die primären fluoreszierenden Antikörper hinzugegeben und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4 °C erneut inkubiert. Nach Abschluss der Färbung wurden jeweils 100 μ l PBS hinzugefügt und die Proben wurden für 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, die sedimentierten Zellen wurden in PBS 100 μ l re-suspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und danach durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.9 In-vivo-Experimente

Die Tierversuche wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter der amtlichen Tierversuchsnummer 33.14-42502-04-12 genehmigt. Alle verwendeten Tiere wurden in der Tierversuchseinrichtung der Universitätsmedizin Göttingen unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Mäuse waren in einem Scantainer (Scanbur, Dänemark) untergebracht und es wurde ein 12-Stunden-Tag/12-Stunden-Nacht Rhythmus simuliert. Die Versorgung mit Futter und Wasser erfolgte *ad libitum*.

Verwendet wurden zwei verschiedene Mauslinien. Die Zucht der K5.hTGF β 1 erfolgte im ICR (CD-1)-Hintergrund. Die Insertion des humanen TGF β 1 in den Keratin 5 Promoter führt zu einer dauerhaft erhöhten TGF β 1-Expression, die mit einem psoriasiformen Phänotyp einhergeht (Li et al. 2004).

Entsprechend den Originalpublikationen erfolgte die Zucht des JunB/c-Jun defizienten Mausstammes ebenfalls in einem ICR (CD-1)-Hintergrund mit einer induzierbaren Deletion von JunB/c-Jun durch die intraperitoneale Applikation von Tamoxifen (Zenz et al. 2005). Anders als in der Publikation entwickelten die Mäuse im Tierstall der UMG spontan einen chronisch-entzündlichen Phänotyp ohne vorherige Tamoxifeninduktion. Insgesamt war der Phänotyp auch deutlich milder ausgeprägt und spiegelte sich vorrangig an den Ohren wieder.

Die Tiere wurden in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen in Experimenten verwendet. Die Behandlung erfolgte in allen Versuchen intraperitoneal. Ino-C2-PAF wurde in NaCl 0,9% gelöst und in einer Dosis von 30 mg/KG appliziert. Alle Tiere wurden zweimal wöchentlich gewogen und klinisch untersucht. Die Ausprägung des jeweiligen Phänotyps wurde anhand einer klinischen Schweregrad-Skala (Score) dokumentiert. Für die klinische Untersuchung und Gewichtsmessung erfolgte jeweils eine Kurznarkose mit Isofluran (Forene[®]) mit Hilfe des Vevo-Compact-Dual-Anaesthesia-Systems. Zum Versuchsende wurden die Tiere mittels Kohlenstoffdioxid narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Gewebeproben entnommen. Die entnommenen Gewebe wurden entweder direkt in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet oder in O.C.T. eingefroren und bei -80°C gelagert. Im Anschluss erfolgten die immunhistochemischen Färbungen für die mikroskopischen Auswertungen.

Die Dicke der Epidermis wurde anhand der Gewebsschnitte nach der Hämatoxylin und Eosin Färbung bestimmt. Die Dicke wurde dabei pro Versuchstier an 10 verschiedenen Punkten gemessen (AxioVision Software, Zeiss) . Anschließend erfolgte die Berechnung des Mittelwertes aller Versuchstiere einer Gruppe mit der Standardabweichung. Die Bestimmung der Anzahl der Mastzellen erfolgte nach der Giemsa-Färbung. Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Versuchstier ausgezählt und pro Kohorte gemittelt. Die mikroskopischen

Bilder wurden mit dem Mikroskop Axioskop 2 und der Kamera Axio CAM MRc aufgenommen.

2.2.9.1 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Für die mikroskopische Auswertung wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben mit dem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträgern platziert. Um in wässrigen Lösungen färbbar zu sein, wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und re-hydriert. Die Objektträger wurden dafür dreimal für 10 Minuten mit Xylol gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in Isopropanol für 10 Minuten. Die Re-Hydration erfolgte schrittweise in 100%, 90%, 70% und 50% Ethanol jeweils für 10 Minuten. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gewaschen. Gemäß den Angaben des Herstellers erfolgten die Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin, nach Giemsa oder mit einem gegen CD31 gerichteten Antikörper.

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die in O.C.T. eingebetteten Gewebeproben verwendet. Mittels eines Gefriermikrotoms wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost® Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden für 10 Minuten mit Methanol bei 20°C fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, erfolgte im Anschluss die Inkubation mit 0,3%-iger Wasserstoffperoxidlösung für 10 Minuten. Danach wurden die Proben dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Anheftungen zu minimieren, wurden die Proben mit einer Blocklösung, PBS + 5% FCS + 5% Serum (entsprechend dem 2. Antikörper), behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Biotin-gekoppelten Antikörpern gemäß den Herstellerangaben. Danach wurden die Schnitte mit konjugierter Streptavidin-Peroxidase für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Farbreaktion mit einer AEC-Lösung durchgeführt. Für die Gegenfärbung wurde Hämalaunlösung verwendet. Die Präparate wurden schließlich mit wässriger Einbettlösung (Faramount von DAKO) eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.9.2 Blutentnahme bei Mäusen und Lymphozytenisolierung aus dem Mäuseblut

Die Blutentnahme erfolgte an mit Isofluran narkotisierten Mäusen. Mittels einer heparinisierten Kanüle (Durchmesser 10 µm) wurde Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen, in ein mit EDTA beschichtetes Röhrchen überführt und geschwenkt. 400 µl Vollblut wurden anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert, mit 8 ml Erythrozyten-Lysispuffer versetzt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 22 ml PBS (4°C) wurde die Reaktion unter vorsichtigem Schwenken gestoppt. Die Suspension wurde danach für 7 Minuten bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Lyse wiederholt. Das verbliebene Zellsediment wurde in 1 ml PBS re-suspendiert und erneut für 7 Minuten bei 4 °C mit 1300 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt, in PBS aufgenommen und mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte verteilt. Anschließend wurden die Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern für die Durchflusszytometrie gefärbt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit dem ungepaarten t-Test (two tailed students t-Test) durchgeführt (Software Excel, Microsoft). Werte von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die statistischen Tests waren stets zweiseitig.

3. Ergebnisse

3.1 Ino-C2-PAF reduziert die Viabilität menschlicher Endothelzellen *in vitro* moderat und es induziert Apoptose in TNF α -aktivierten, nicht aber in unstimulierten Endothelzellen

In der ersten Versuchsreihe wurde die Zusammensetzung des Verarmungsmediums optimiert. Da insbesondere der Serumanteil im Medium die biologischen Wirkungen der Antitumorlipide *in vitro* beeinflussen kann, wurde zunächst die Wirkung von Ino-C2-PAF auf die Zellviabilität humaner Endothelzellen (HUVEC) bei unterschiedlichen Serum-Konzentrationen im Medium untersucht. Dazu wurde die Umwandlung des Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid)) in Formazan kolorimetrisch bestimmt. Während die Zellviabilität ohne Serum bereits ohne Ino-C2-PAF stark beeinträchtigt wurde, schwächten hohe Serum-Konzentrationen von 2% die Ino-C2-PAF-Wirkung ab. Die deutlichsten und am besten reproduzierbaren Ergebnisse bei gleichzeitig erhaltener prinzipieller Viabilität der Zellen wurden bei einer Serum-Konzentration von 1% erzielt (Abb. 4). Deshalb wurde in den folgenden In-vitro-Versuchsreihen standardisiert ein 1%-iger FCS-Anteil im Medium verwendet.

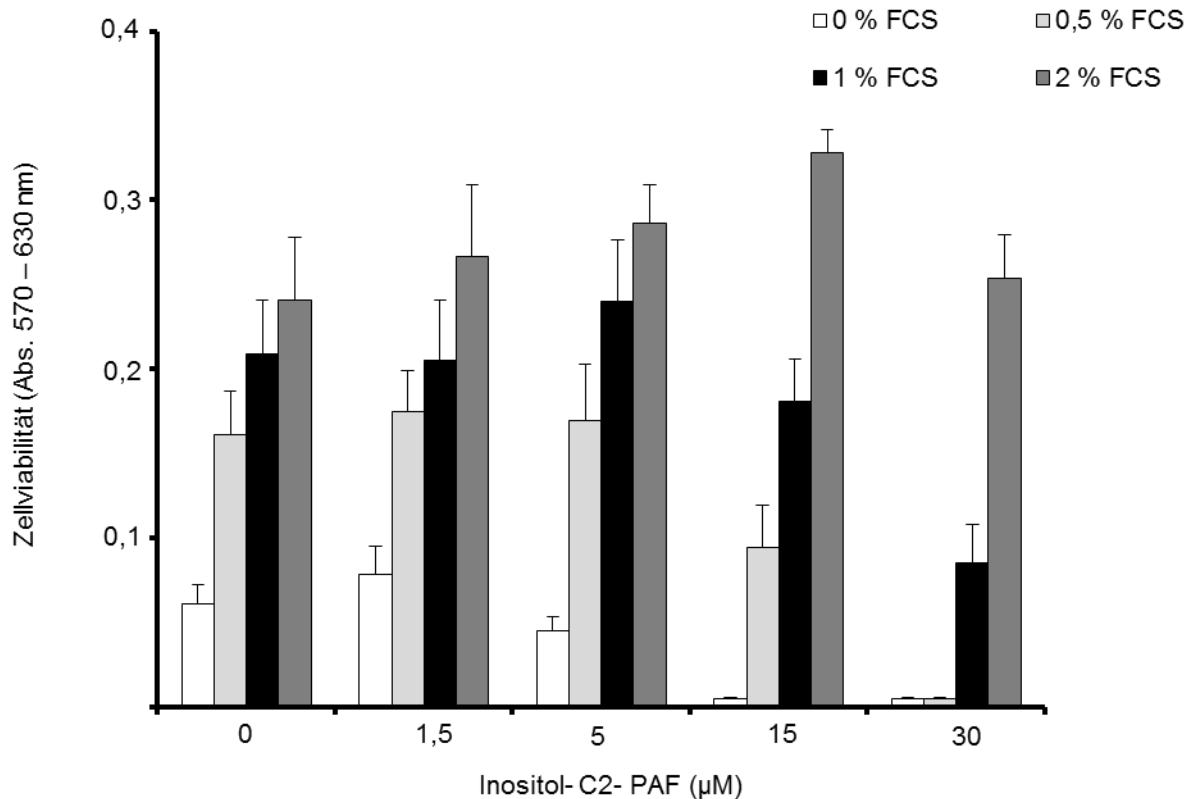


Abb. 4: Der Serumanteil des Mediums beeinflusst die Ino-C2-PAF-Wirkung auf die Zellviabilität.

HUVEC-Zellen wurden für 24 h mit Ino-C2-PAF in den angegebenen Konzentrationen im Verarmungsmedium kultiviert. Dieses Medium enthielt entweder 0 %, 0,5 %, 1 % oder 2 % fetales Kälberserum. Die Zellviabilität wurde mittels CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay bestimmt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils 6 Einzelmessungen eines repräsentativen Experimentes (\pm SD). Das Experiment wurde insgesamt drei Mal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

TNF α ist ein zentrales Zytokin bei vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen einschließlich der Psoriasis. Manche seiner pathophysiologischen Wirkungen können *in vitro* modelliert werden. Zu den letzteren Effekten gehört die Aktivierung vaskulärer Endothelzellen, die in den folgenden Experimenten im Zusammenhang mit der Ino-C2-PAF-Wirkung genauer untersucht wurde.

Die Stimulation kultivierter Endothelzellen (HUVEC) mit 25 ng/ml TNF α für 4 h führte im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle zu einer leichten, statistisch nicht signifikanten

Steigerung der Zellviabilität. Die Behandlung mit Ino-C2-PAF für 24 h resultierte in einer dosisabhängigen Reduktion dieses Parameters, welche bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ statistische Signifikanz beim Vergleich mit den Kulturen ohne Ino-C2-PAF-Behandlung erreichte (Abb. 5). Die Zellviabilität der mit $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten und diejenige der nicht stimulierten Endothelzellen wurde durch Ino-C2-PAF in ähnlicher Weise konzentrationsabhängig verringert; zwischen beiden Zellpopulationen bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 5).

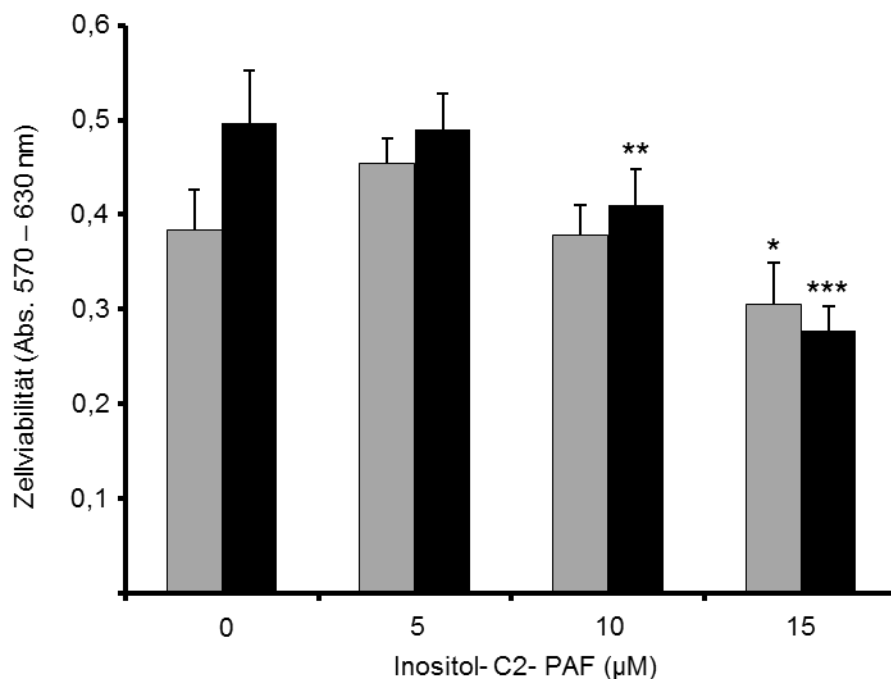


Abb. 5: Ino-C2-PAF inhibiert die Zellviabilität gleichermaßen in nicht stimulierten und mit $\text{TNF}\alpha$ -aktivierten humanen Endothelzellen.

HUVEC-Zellen wurden für 24 h mit Ino-C2-PAF in den an der X-Achse angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Kulturen wurden für die letzten 4 h der Inkubationszeit für jeweils 4 h in normalem Kulturmedium (graue Balken) oder in Gegenwart von 25 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (schwarze Balken) kultiviert. Die Zellviabilität wurde mit dem „CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ bestimmt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils 6 Einzelmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Vergleichbare Ergebnisse wurden in 2 weiteren Versuchen ermittelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ganz im Gegensatz zur Zellviabilität fanden sich in nicht stimulierten und in TNF α -aktivierten Endothelzellen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Ino-C2-PAF-induzierten Apoptose, die im ELISA durch den Nachweis Histon-gebundener DNA-Fragmente gemessen wurde. Die Behandlung mit Ino-C2-PAF bis zu einer hohen Konzentration von 20 μ M bewirkte in nicht stimulierten Endothelzellen keinerlei Apoptose-Induktion (Abb. 6). In Endothelzellen, die durch TNF α stimuliert wurden, induzierte Ino-C2-PAF hingegen in konzentrationsabhängiger Weise eine ausgeprägte apoptotische Reaktion (Abb. 6). Ino-C2-PAF führte bei Konzentrationen von 15 μ M und 20 μ M zu einer signifikanten Zunahme der Endothelzell-Apoptose im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit TNF α stimuliert, aber nicht mit Ino-C2-PAF behandelt wurden (auf das 2,3-fache bei 15 μ M und auf das 2,8-fache bei 20 μ M; $p < 0,01$ in beiden Fällen).

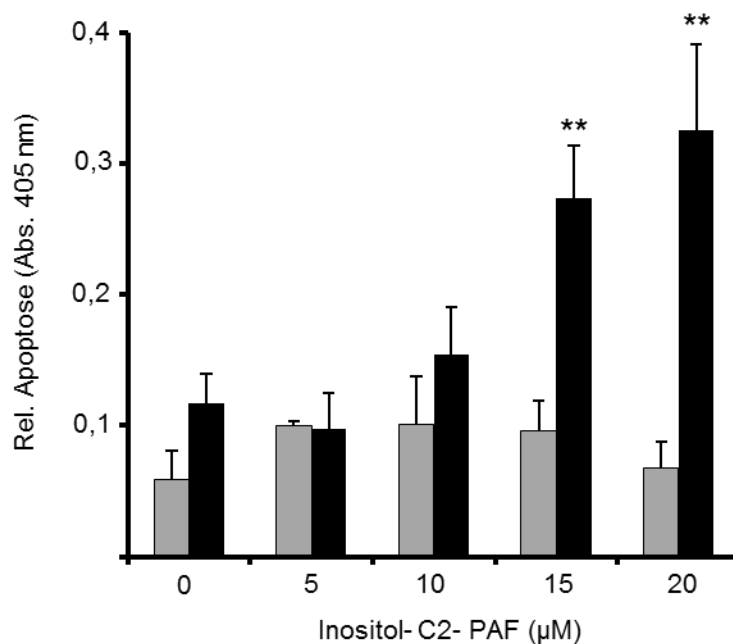


Abb. 6: Ino-C2-PAF induziert Apoptose in TNF α -stimulierten, nicht aber in unstimulierten humanen Endothelzellen.

Endothelzellen (HUVEC) wurden für 24 h mit 5, 10, 15 oder 20 μ M Ino-C2-PAF behandelt und während der letzten 4 h mit 25 ng/ml TNF α stimuliert (schwarze Balken) oder nicht stimuliert (graue Balken). Der „Cell death detection ELISA“ wurde zur Detektion Histon-gebundener DNA-Fragmente verwendet. Die gezeigten Werte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelmessungen (\pm SD). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment, das zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurde. ** $p < 0,01$.

3.2 Ino-C2-PAF reduziert die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1

Um zu überprüfen, ob Ino-C2-PAF auch weitere mit Entzündungsprozessen assoziierte endotheliale Funktionen beeinflusst, wurde in den folgenden Experimenten die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und Mediatoren, die maßgeblich an chronisch-entzündlichen Krankheiten wie der Psoriasis beteiligt sind, untersucht. Der Fokus war dabei auf Moleküle gerichtet, die die Rekrutierung verschiedener Leukozyten-Populationen in entzündlich veränderten Endothelien vermitteln. Bei entzündlichen Prozessen kommt es zum Austritt von Leukozyten aus dem Blutstrom in das umgebende Gewebe. Vor dem eigentlichen Vorgang des Leukozytenaustritts, der Diapedese, welche überwiegend parazellulär, aber in geringerem Maße auch transzellulär stattfindet, kommt es zuerst zu lockerer Anheftung und Rollen (tethering und rolling) der Leukozyten entlang der vaskulären Endothelzellen. Die endothelialen Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin (CD62E und CD62L) sind zentrale Rezeptoren in diesem Prozess. Daran schließen sich die Aktivierung und die feste Adhäsion an, diese wiederum werden durch andere Adhäsionsmoleküle, insbesondere ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) vermittelt (Schön et al. 2003; Reglero-Real et al. 2012). Die Expressionsstärke endothelialer Zelladhäsionsmoleküle kann *in vitro* durch Stimulation mit TNF α verstärkt werden (Oostingh et al. 2007; Wallbrecht et al. 2011; Lockmann und Schön 2014).

Zu Beginn wurde die Ino-C2-PAF-Wirkung auf transkriptioneller (mRNA)-Ebene mittels semiquantitativer PCR untersucht. Die Auswertungen der Signale in den Gelen erfolgten densitometrisch. TNF α (25 ng/ml für 4 h) induzierte deutlich die Transkription von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin. Zusätzlich wurden die Chemokine MCP-1 und IL-8 hochreguliert. Die Expression von VEGF und VE-Cadherin wurde hingegen durch TNF α nicht beeinflusst. Die Behandlung mit Ino-C2-PAF in einer Konzentration von 20 μ M reduzierte die Expression von VCAM-1 um 60%. E-Selektin und ICAM-1 konnten um 40-50% herabreguliert werden. Die Suppression war konzentrationsabhängig (Abb. 7). Dass die Transkription von VEGF, VE-Cadherin (CD144), MCP-1 (CCL2) und IL-8 (CXCL8) nicht inhibiert wurde, zeigte, dass die Wirkung von Ino-C2-PAF auf die Transkription entzündungsrelevanter Gene in humanen Endothelzellen nicht global war, sondern eine gewisse Selektivität aufwies.

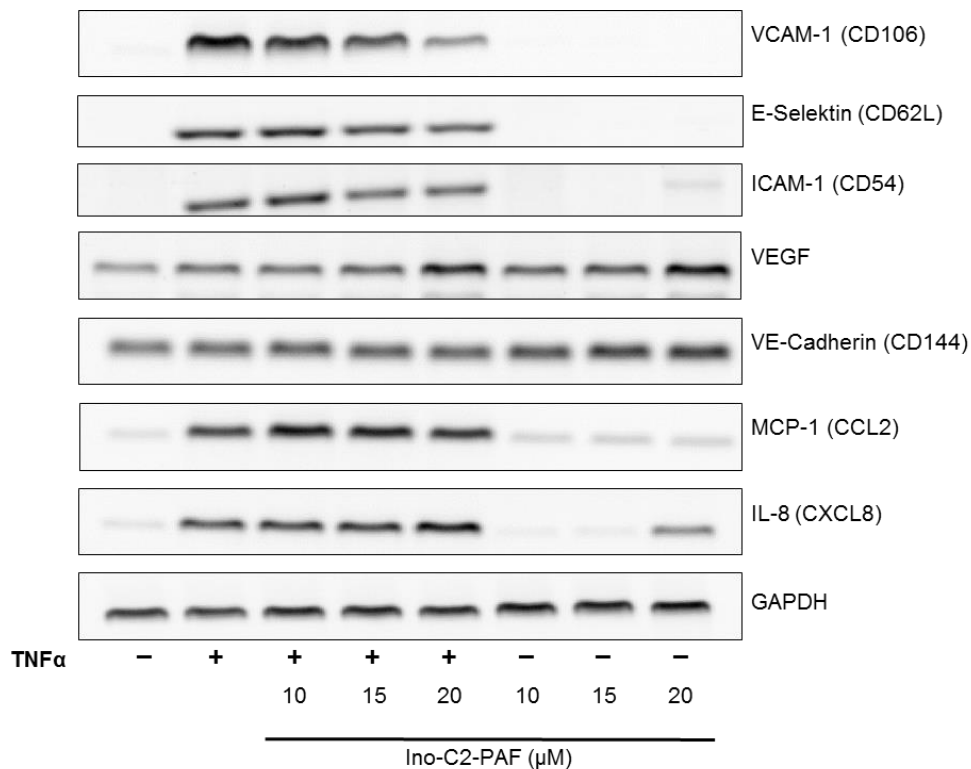


Abb. 7: Ino-C2-PAF reduziert die Transkription endothelialer Adhäsionsmoleküle. Die Bestimmung der spezifischen mRNA erfolgte mittels semiquantitativer PCR und densitometrischer Auswertung. Ino-C2-PAF inhibiert konzentrationsabhängig die Transkription von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin in TNF α -stimulierten Endothelzellen. Nicht beeinflusst wurde die Expression VEGF, VE-Cadherin, MCP-1 und IL-8. Die Expression des „Kontrollgens“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) war unter sämtlichen Bedingungen weitgehend konstant.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der entzündungsrelevanten Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene mit zwei komplementären Methoden, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie, untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen wiederum für 24 h mit Ino-C2-PAF behandelt und vier Stunden vor Versuchsende mit TNF α stimuliert. Die Ergebnisse der PCR-Experimente für VCAM-1 spiegeln sich in der durchflusszytometrischen Analyse wider. Die Expression dieses Rezeptors erhöhte sich nach der Stimulation mit TNF α auf mehr als das Doppelte (MFI=448,67 in unbehandelten

und MFI=954,33 in TNF α stimulierten Endothelzellen; $p < 0.05$; Abb. 8). Dieser Anstieg der Expressionsstärke wurde durch Ino-C2-PAF im Vergleich zur unbehandelten TNF α -stimulierten Kontrolle dosisabhängig reduziert; bei 10 und 15 μM signifikant um 57,6% beziehungsweise 65,2% (jeweils $p < 0,05$ beim Vergleich mit der TNF α -stimulierten Kontrolle). Die Expression von E- Selektin ließ sich um bis zu 22 % reduzieren bei 15 μM Ino-C2-PAF. Die ICAM-1-Expression wurde durch Ino-C2-PAF nicht eindeutig beeinflusst (Abb. 8).

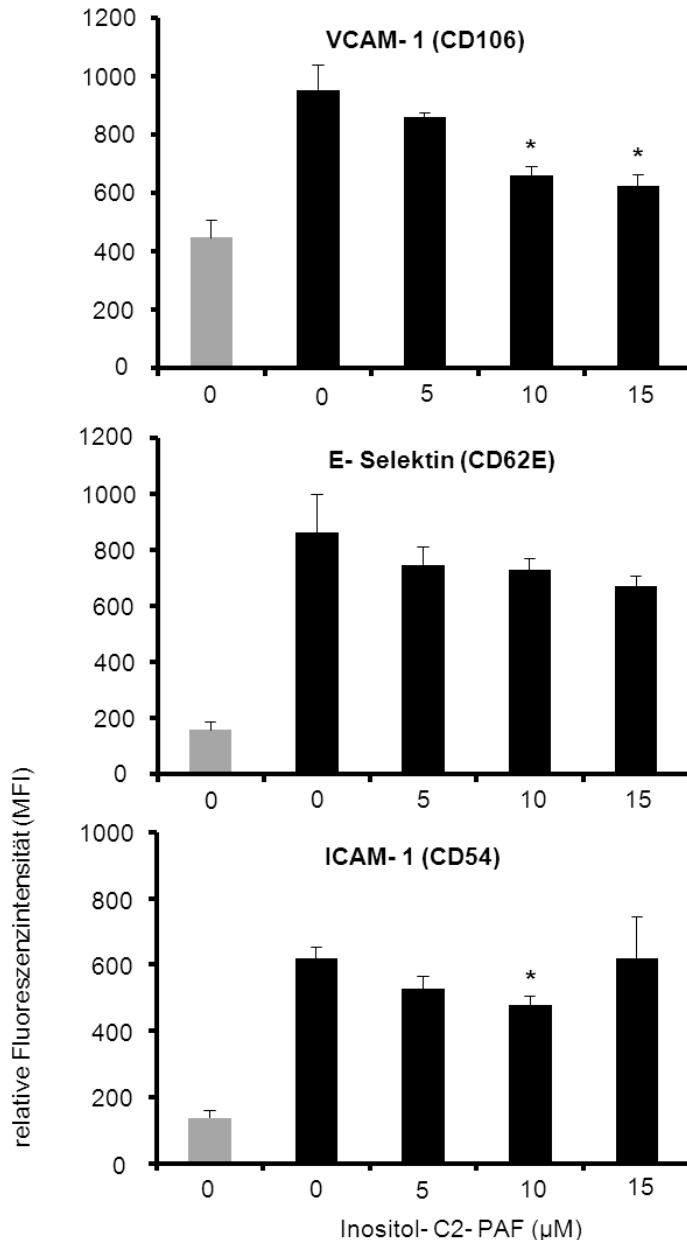


Abb. 8: Ino-C2-PAF reduziert die Oberflächenexpression von VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1 auf HUVEC.

Humane Endothelzellen wurden für 24 h mit Ino-C2-PAF (5, 10 oder 15 µM) behandelt. Die Proteinexpression wurde nach Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden 4 h vor Versuchsende mit 25 ng/ml TNF α stimuliert (schwarze Balken) oder blieben unstimuliert (graue Balken). Dargestellt ist der Standardfehler (\pm SEM) von 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich mit der unbehandelten TNF α -stimulierten Kontrolle.

Diese Ergebnisse wurden in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie von HUVEC prinzipiell bestätigt (Abb. 9). Die Endothelzellen wurden wieder für 24 h mit 15 µM Ino-C2-PAF

behandelt, 4 h vor Versuchsende erfolgte die Stimulation mit 25ng/ml TNF α . Die Fluoreszenz nach Bindung VCAM-1-spezifischer Antikörper präsentierte sich deutlich reduziert im Vergleich zu den unbehandelten stimulierten Kontrollzellen. E- Selektin wurde in moderatem Ausmaß herunterreguliert und die Expression von ICAM-1 erschien nicht vermindert.

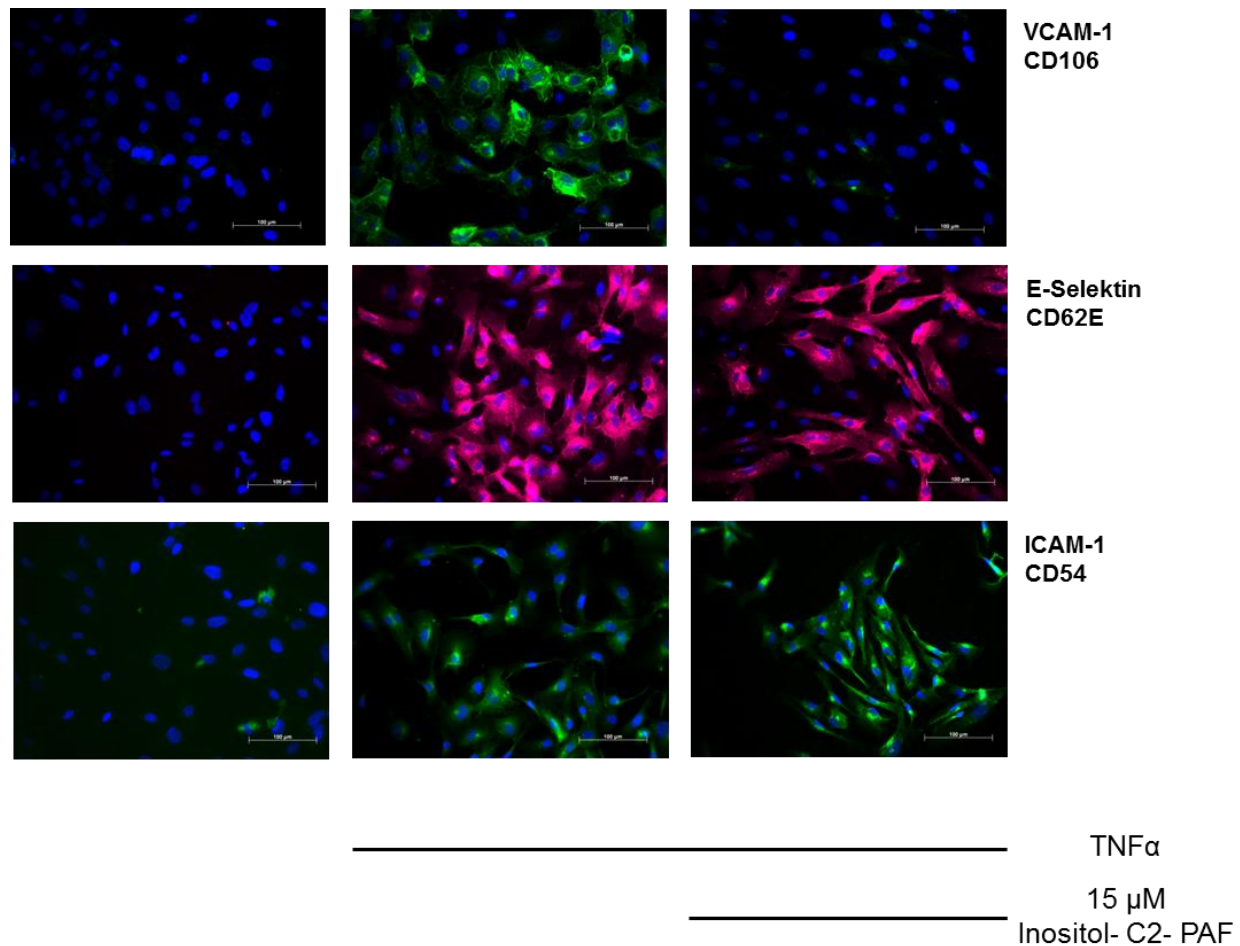


Abb. 9: Abnahme der Expression von VCAM-1 und E-Selektin, aber nicht von ICAM-1 bei einer Behandlung mit 15 μ M Ino-C2-PAF.

Dargestellt sind HUVEC nach Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die angegebenen Adhäsionsmoleküle. Der abgebildete Maßstab beträgt 100 μ m. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Es zeigte sich eine fast vollständige Aufhebung der VCAM-1-Fluoreszenz nach 24-stündiger Behandlung mit Ino-C2-PAF. Die Expression von E- Selektin ist moderat vermindert im Vergleich zur unbehandelten TNF α -Kontrolle. Für ICAM-1 war kein inhibitorischer Effekt darstellbar.

3.3 Inhibition entzündungsassoziierter Gene in HaCaT-Zellen durch Ino-C2-PAF

Bisher publizierte Untersuchungen mit Ino-C2-PAF erfolgten vor allem an HaCaT-Zellen. Dabei konnten Reduktion der Proliferation, Einleitung der Apoptose sowie gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker Involucrin und Transglutaminase gezeigt werden (Fischer et al. 2006). In Ergänzung dieser Ergebnisse zeigte sich in dieser Arbeit eine TNF α -abhängige Expression von VCAM-1, ICAM-1, IL-8, und MCP in HaCaT-Zellen (Abb. 10). Die verstärkte Expression von VCAM-1 wurde durch Ino-C2-PAF am stärksten gehemmt. Bereits eine Behandlung mit 3 μ M Ino-C2-PAF für 24 h führte zu einer deutlichen Inhibition, die durch RT-PCR nachgewiesen wurde. Bei einer Konzentration von 5 und 15 μ M war keine VCAM-1-Expression mehr detektierbar. Der Einsatz von 15 μ M resultierte darüber hinaus in einer kompletten Inhibition der ICAM-1-Expression auf mRNA-Ebene. Im Gegensatz zu den Resultaten in HUVEC-Zellen (Abb. 7) bewirkte Ino-C2-PAF in HaCaT-Zellen eine Inhibition der TNF α -stimulierten Expression von IL-8 und MCP-1 (Abb. 10). Die Expression von VEGF war vergleichbar derjenigen in HUVECs. Eine Inhibition konnte nicht dargestellt werden.

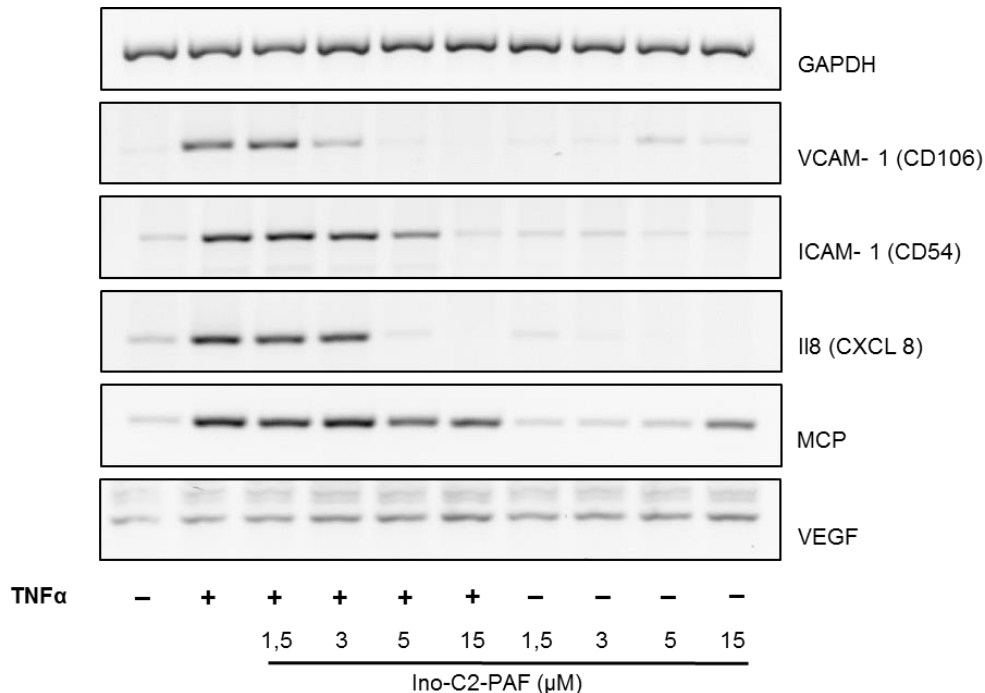


Abb. 10: Ino-C2-PAF inhibiert die Transkription von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen).

HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit Ino-C2-PAF in den Konzentrationen 1,5, 3, 5 und 15 μM in serumfreiem Medium behandelt. Vier Stunden vor Versuchsende erfolgte die Stimulation mit 25 ng/ml TNF α . Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. Ino-C2-PAF inhibiert konzentrationsabhängig die TNF α -induzierte Transkription von VCAM-1, ICAM-1, IL-8 und MCP-1. Nicht beeinflusst wurde die Expression VEGF. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Der Versuch wurde insgesamt 3-mal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.4 Die Expression humaner leukozytärer Adhäsionsmoleküle wird durch Ino-C2-PAF vermindert

Für die Rekrutierung der Entzündungszellen sind nicht nur endotheliale, sondern auch leukozytäre Zelloberflächen-Moleküle bedeutsam. Um die Wirkungen von Ino-C2-PAF auch auf die mobilen Leukozyten zu untersuchen, wurden mononukleäre Zellen (Leukozyten) des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Spendern mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut isoliert und in RPMI-Medium kultiviert. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit 5, 15 oder 30 μM Ino-C2-PAF bei 37° und 5 % CO₂ inkubiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD62L (L-Selektin), CD11a

(α -Kette des LFA-1, Leukocyte Function-associated Antigen-1), CD49d (VLA-4, Very Late Antigen-4) und CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) wurde nach Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch anhand der MFI (mean fluorescence intensity) ausgewertet.

Die Behandlung mit Ino-C2-PAF führte zu einer konzentrationsabhängigen Expressionsabnahme. Fünf μM Ino-C2-PAF führten zu einer Verminderung der MFI von CD62L um 34 % (Abb. 11). Die höchste eingesetzte Konzentration von 30 μM reduzierte die Expressionsstärke um 86 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die *in vitro* Behandlung von PBMC mit Ino-C2-PAF führte bei einer Konzentration von 30 μM zu einer Reduktion des Integrindimers VLA-4 um 50%. Das Integrin LFA-1 besteht gleichfalls aus einer α -Kette (CD11a) und einer β -Kette (CD18). CD11a wurde nach der zweistündigen Inkubation mit 30 μM Ino-C2-PAF um 89 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle herunterreguliert. Der Einsatz von 5 und 15 μM hatte keinen Einfluss auf die Expression von CLA. Erst ab einer Konzentration von 30 μM ließ sich eine moderate Reduktion der Expressionsstärke um 31% erzielen. Zusammenfassend führte die *in vitro* Behandlung humaner PBMC mit Ino-C2-PAF konzentrationsabhängig zu einer deutlich verminderten Expression aller hier untersuchten Oberflächenmoleküle.

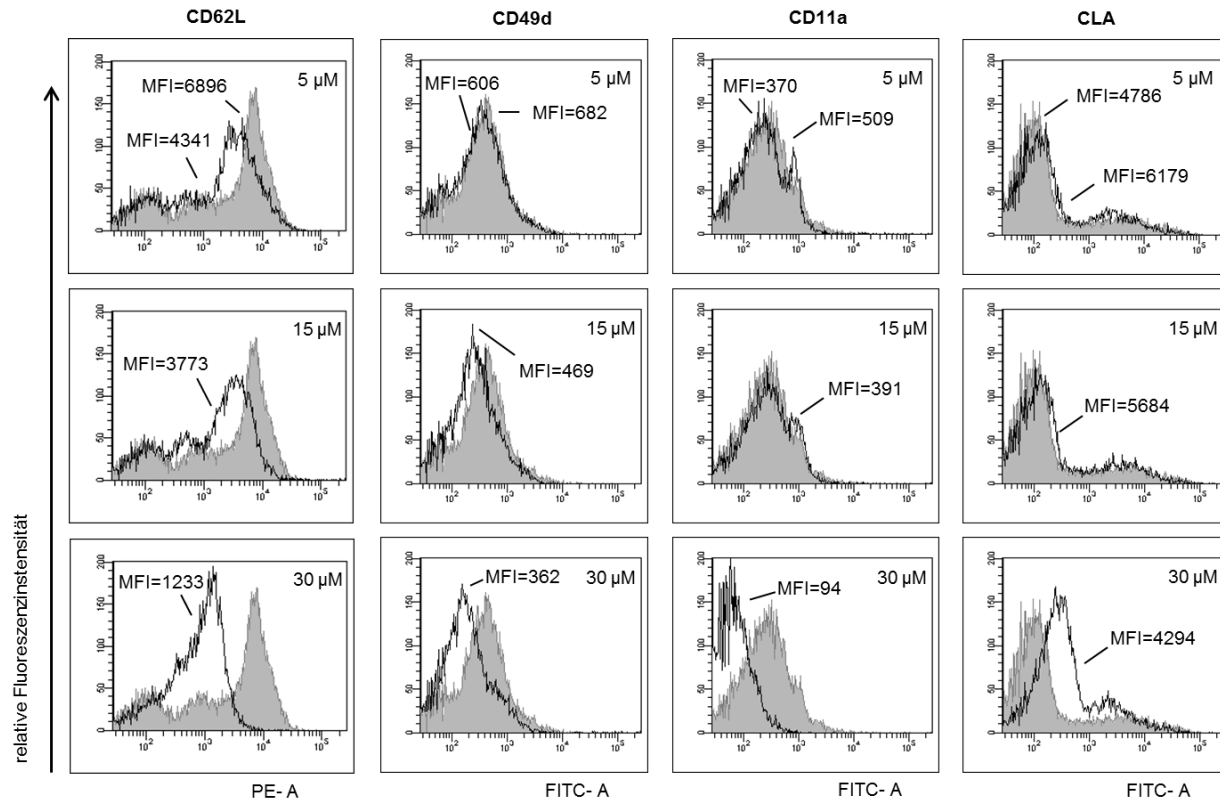


Abb. 11: Ino-C2-PAF reduziert die Expression von CD62L, CD49d, CD11a und CLA auf humanen PBMC.

PBMC wurden mittels Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Vollblut isoliert und für 2 h mit 5, 15 oder 30 μ M Ino-C2-PAF bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Expression der genannten Adhäsionsmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die grauen Histogramme demonstrieren jeweils die unbehandelten Kontrollen. Der stärkste inhibitorische Effekt zeigte sich auf die Expression von CD62L. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.5 C57BL6/J- Mäuse reduzieren nach der Behandlung mit Ino-C2-PAF *in- vivo* die leukozytäre Expression von CD62L, aber nicht von CD49d und CD11a

C57BL6/J-Wildtyp-Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt, wovon die Tiere in drei Gruppen mit Ino-C2-PAF (jeweils 30 mg/kg i. p.) behandelt wurden. Eine Gruppe wurde als Kontrollgruppe geführt und erhielt keine Behandlung. Gruppe 1 wurde einmalig 24 h vor Versuchsende mit Ino-C2-PAF behandelt. Gruppe 2 erhielt 72 h und 24h vor Beendigung jeweils eine Injektion. Gruppe 3 wurde je zu den Zeitpunkten 120 h, 72 h und 24 h vor der Blutentnahme behandelt. Das Blut wurde narkotisierten Mäusen mit einer mit Na-Heparin beschichteten Mikropipette aus dem retrobulbären Plexus entnommen. Nach zweimaliger Erythrozytenlyse erfolgte die Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Auswertung. Untersucht wurden die Oberflächenmoleküle auf den Leukozyten wie bei humanen Zellen (CD49d, CD11a und CD62L). Für CD49d und CD11a konnte keine Expressionsänderung unter diesen Versuchsbedingungen detektiert werden (nicht abgebildet). Die einmalige Applikation von 30 mg/kg Ino-C2-PAF führte zu einer Minderung der CD62L-Expression um 31 % (Abb. 12). Die Versuchstiere in den Gruppen 2 und 3 präsentierten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine noch weiter reduzierte Expression. Die zweimalige Applikation resultierte in einer signifikanten Minderung der Expression um 69 % ($p < 0,05$). Eine dreimalige Behandlung mit Ino-C2-PAF senkte die CD62L-Expression um 61 %.

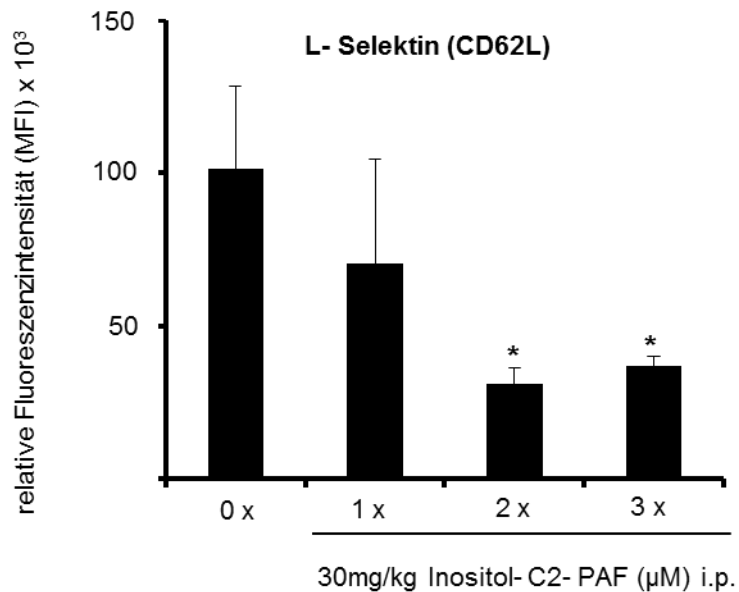


Abb. 12: Ino-C2-PAF reduziert die CD62L-Expression auf murinen Leukozyten *in vivo*. C57BL6/J-Wildtyp-Mäusen wurden jeweils 30 mg/kg Ino-C2-PAF i.p. appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 3 Versuchstieren einer Gruppe mit dem Standardfehler (\pm SEM). * $p < 0,05$. Nach zwei- und dreifacher Behandlung ist die Expression signifikant geringer als in unbehandelten Mäusen.

3.6 Ino-C2-PAF reduziert die dynamische Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen im Flusskammerexperiment

Nachdem gezeigt wurde, dass die Behandlung mit Ino-C2-PAF Adhäsionsmoleküle sowohl auf Endothelzellen und Keratinozyten als auch auf Leukozyten supprimierte, wurden diese Ergebnisse im Hinblick auf ihre funktionelle Relevanz überprüft. Dazu wurde die dynamische Interaktion (Rollen und feste Adhäsion) zwischen Endothelzellen und mobilen Leukozyten in der Flusskammer analysiert. HUVECs wurden auf Coverslips bis zur Konfluenz kultiviert. PBMCs wurden jeweils frisch aus humanem Vollblut isoliert, intravital mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFDA-SE markiert und anschließend in RPMI mit 2 mM CaCl_2 auf Eis aufbewahrt. Das Rollen und die feste Adhäsion der fluoreszierenden Leukozyten an den Endothelzellen wurde videomikroskopisch dokumentiert.

3.6.1 Behandlung der Endothelzellen mit Ino-C2-PAF reduziert adhäsive Interaktionen mit Leukozyten

Im ersten Versuchsteil wurden humane Endothelzellen (HUVEC) für 24 h mit Ino-C2-PAF in den Konzentrationen 10 und 15 μM inkubiert. Vier Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte die Stimulation mit 25 ng/ml $\text{TNF}\alpha$. Die PBMCs erhielten keine Behandlung. Im Flusskammerversuch adhärten die mononukleären Zellen nicht auf unstimulierten Endothelzellen. Auf den mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten HUVECs rollten bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,12 ml/h im Durchschnitt 40 PBMCs pro Blickfeld während der 10-minütigen Beobachtungsdauer (Abb. 13). Gleichzeitig adhärten im Durchschnitt 26 Zellen fest an den Endothelzellen. Die Behandlung mit 10 μM Ino-C2-PAF reduzierte die Anzahl an rollenden Zellen um 48 % auf 16,5 im Vergleich zu unbehandelten $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten HUVECs. Die Zahl an adhärenenten PBMCs reduzierte sich parallel um 38 %. Die Steigerung der eingesetzten Konzentration auf 15 μM Ino-C2-PAF resultierte in einer Halbierung der Zahl rollender Zellen auf durchschnittlich 20 Zellen/Blickfeld. Gleichermaßen reduzierte sich parallel die Zahl der fest adhärierenden Zellen signifikant um 75 % ($p < 0,01$ in allen Fällen; Abb. 14).

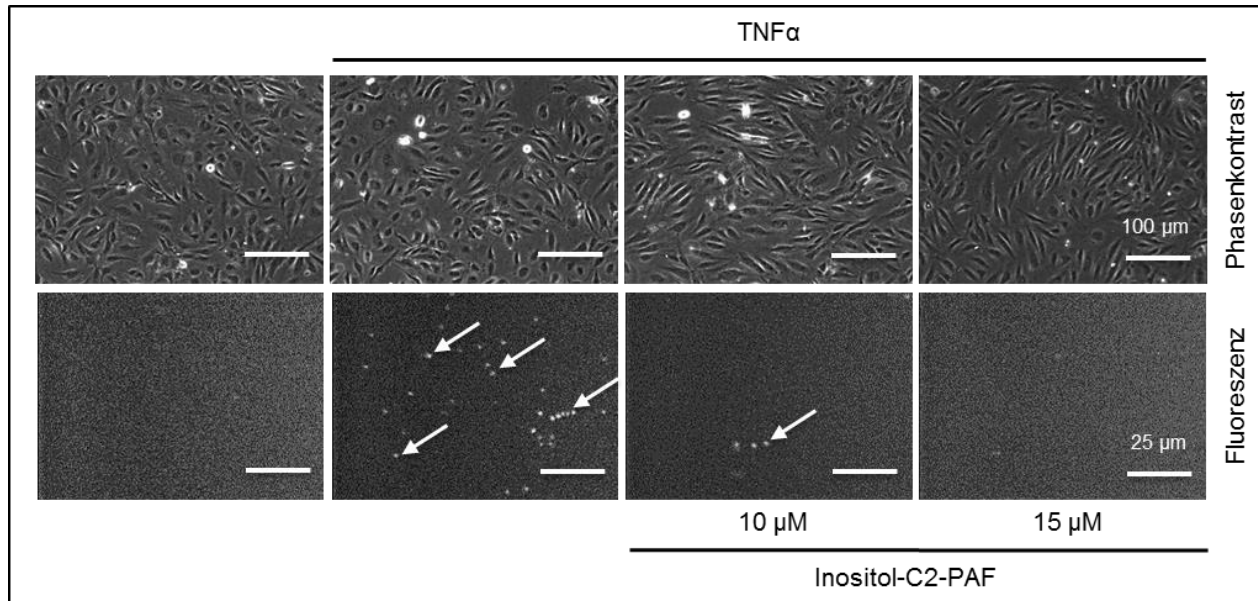


Abb. 13 Ino-C2-PAF reduziert dynamischer Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten im Flusskammerexperiment.

Für den Flusskammerversuch wurden humane Endothelzellen (HUVEC) für 24 h mit Ino-C2-PAF in den angegebenen Konzentrationen behandelt und 4 h vor Versuchsende mit 25 ng/ml TNF α stimuliert. CFDA-SE markierte PBMCs wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,12 ml/l für 10 Minuten über die mit Endothelzellen bewachsenen Glasböden perfundiert. In den oberen Aufnahmen sind lichtmikroskopische Bilder der Endothelzellen unter den jeweiligen Bedingungen dargestellt. Weder die Behandlung mit TNF α noch diejenige mit Ino-C2-PAF bewirkt morphologische Änderungen der Endothelzellen. In der unteren Reihe sind exemplarisch korrespondierende Standbilder mit den fluoreszenzmarkierten adhären Leukozyten gezeigt. Die Pfeile zeigen auf die Leukozyten (PBMC).

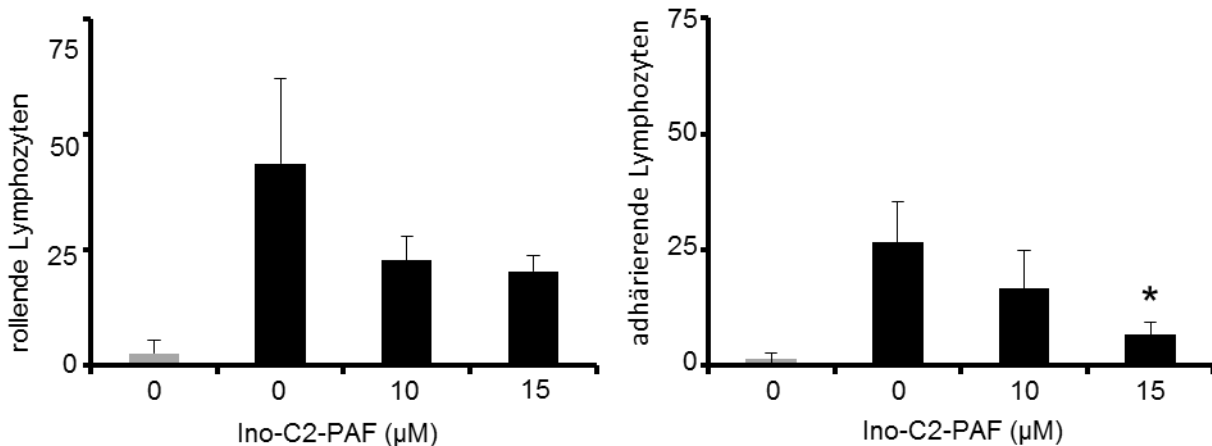


Abb. 14: Die Behandlung von Endothelzellen mit Ino-C2-PAF führt zu einer Abnahme der Zahl rollender und adhärenter Lymphozyten im Flusskammerversuch.

HUVEC wurden auf Glas-Objektträger ausgesät und bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung für 24 h mit Ino-C2-PAF in den angegebenen Konzentrationen. Die Anzahl der rollenden Zellen wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten ermittelt. Anschließend wurde die Perfusion beendet und die adhärenierenden Lymphozyten ausgezählt. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der rollenden und der adhärenenten Leukozyten. Die grauen Balken zeigen die Messwerte der Kulturen ohne TNF α -Stimulation.

Ino-C2-PAF-Behandlung TNF α -stimulierter Endothelzellen bewirkt eine konzentrationsabhängige Abnahme des Rollens und der festen Adhäsion der Leukozyten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SEM). * $p < 0,05$ im Vergleich mit der unbehandelten TNF α -stimulierten Kontrolle.

3.6.2 Ino-C2-PAF-Behandlung der PBMCs hemmt Rollen und feste Adhäsion an TNF α -stimulierten Endothelzellen

Komplementär zur Reduktion endothelialer Adhäsionsmoleküle wurde auch die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L, CD49d und CD11a auf humanen mononuklearen Zellen *in vitro* durch Ino-C2-PAF vermindert. In der zweiten Serie der Flusskammerexperimente wurde der Versuchsaufbau daher insofern modifiziert, als dass anstelle der Endothelzellen nun die PBMCs mit 5, 15 oder 30 μ M Ino-C2-PAF für 2 h behandelt wurden. Die übrigen Bedingungen wurden beibehalten. Endothelzellen wurden auf Glasböden kultiviert und 4 h vor dem Versuch mit 25 ng/ml TNF α stimuliert.

Auch in diesen Versuchen fand keine Interaktion zwischen unstimulierten Endothelzellen und unbehandelten PBMCs statt. Nach TNF α -Stimulation rollten im Durchschnitt 45 Zellen/Blickfeld während der 10-minütigen Beobachtungsdauer über den Endothelzell-Rasen (Abb. 15). Während dieser Zeit adhärten 28 PBMCs fest. Ab einer Konzentration von 15 μ M wurde eine Reduktion beider Parameter gemessen. Dabei rollten ungefähr 27 Zellen/ Blickfeld und 22 Zellen adhärten in dieser Zeit. Bei einer Konzentration von 30 μ M verringerte Ino-C2-PAF den Anteil der rollenden Zellen um 84% im Vergleich zu den unbehandelten TNF α -stimulierten Kontrollen. Während dieses Prozesses adhärten im Mittel 8 Zellen pro Blickfeld (Reduktion um 72 %; $p < 0,05$).

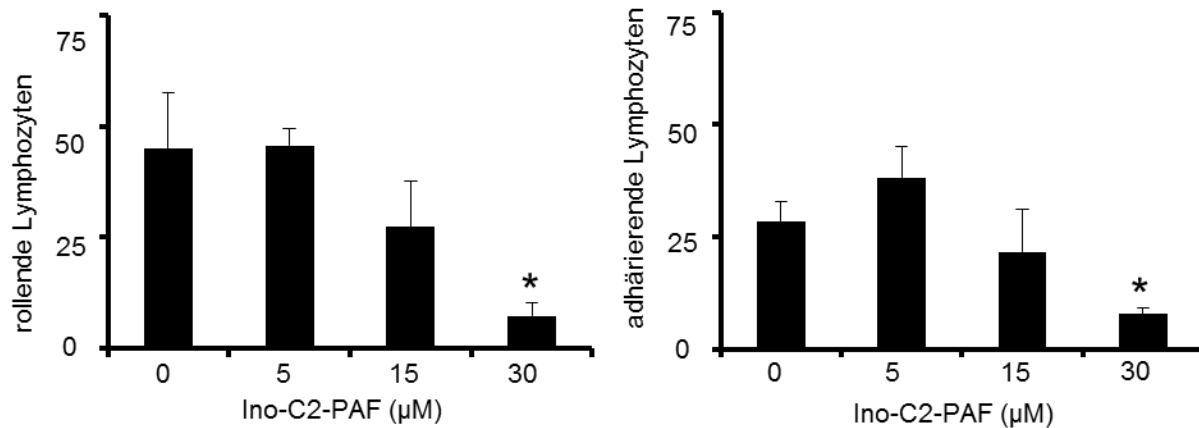


Abb. 15: Die Behandlung von PBMCs mit Ino-C2-PAF hemmt das Rollen und die feste Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen.

HUVEC wurden auf Glasböden kultiviert. Die Endothelzellen wurden 4 Stunden vor Versuchsende mit TNF α stimuliert. Die Lymphozyten wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend für 2 h mit Ino-C2-PAF inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SEM), * $p < 0,05$.

3.7 Ino-C2-PAF bessert chronisch-entzündliche Hauterkrankungen *in vivo* in zwei komplementären Maus-Modellen der Psoriasis

Um die Ergebnisse der In-vitro-Versuche auch *in vivo* bestätigen zu können, wurden zwei verschiedene Mausmodelle mit psoriasisformen Phänotypen für die experimentelle Untersuchung ausgewählt. Dabei handelt es sich um Mäuse mit transgener epidermaler Expression des latenten humanen TGF β 1 (k5.hTGF β 1-transgene Mäuse; Li et al. 2004) sowie um Mäuse mit epidermaler Deletion der Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunB (JunB/c-Jun-defiziente Mäuse; Zenz et al. 2005).

3.7.1 Ino-C2-PAF bessert den psoriasiformen Phänotyp in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen

TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1) ist ein chemotaktisch wirksames Zytokin. Die Kontrolle der TGF β 1-Expression durch den Keratin 5-Promotor, der selektiv in der basalen Schicht der Epidermis aktiv ist, führt zu einer konstitutiven epidermalen TGF β 1-Expression. Die Überexpression des humanen TGF β 1 in der epidermalen Basalschicht transgener Mäuse resultiert unter anderem in der Hyperproliferation der Keratinozyten (Li et al. 2004). Zusätzlich zu den epidermalen Veränderungen weisen die transgenen Mäuse eine dermale Hypervaskularisation, Angiogenese, sowie ein gemischtzelliges entzündliches Infiltrat auf. Insgesamt resultiert in der Haut ein psoriasiformer Phänotyp. In diesem Modell wurde zur Beurteilung des „klinischen“ Schweregrades eine Skala angewendet, die von 0 (gesunde Haut) bis 20 (erythrodermatische Ausdehnung, starke Infiltration, starke Schuppung) reichte. Es erfolgten zwei 2 Versuchsreihen, in denen die K5.hTGF β 1-transgenen Tiere jeweils mit dem Vehikel oder mit je 30 mg/kg Ino-C2-PAF intraperitoneal behandelt wurden. Der erste Versuch (n=5 Mäuse in jeder Gruppe) wurde über 7 Tage durchgeführt und die behandelten Tiere erhielten insgesamt 4 Injektionen. Der zweite Versuch dauerte 14 Tage, dabei erfolgten 3 Applikation pro Woche.

Erfolgte die Behandlung über eine Woche, zeigte sich am Tag 7 ein signifikant ($p < 0,05$) besserer Phänotyp in der behandelten Gruppe im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe.

Gleichzeitig erhöhte sich das Gewicht der mit Ino-C2-PAF behandelten Mäuse über den Versuchszeitraum signifikant ($p < 0,05$; Abb. 16 a und b).

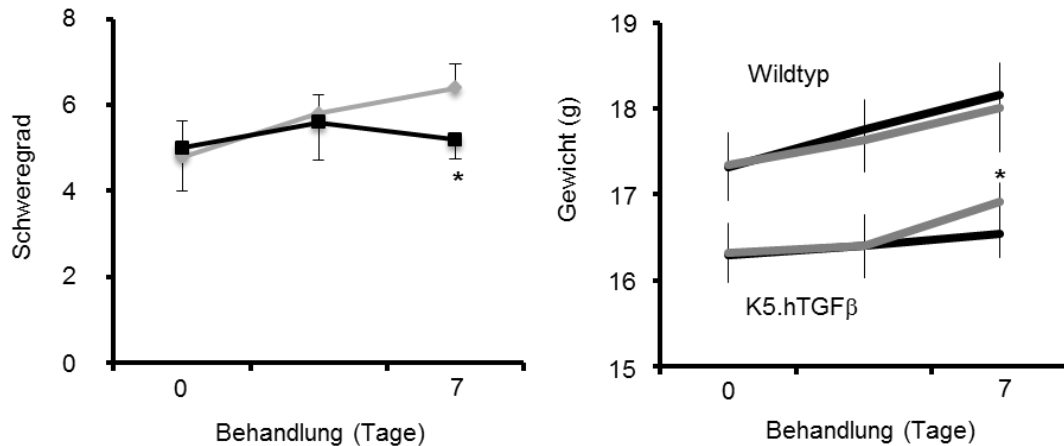


Abb. 16: Die Behandlung mit Ino-C2-PAF über 7 Tage bessert signifikant den klinischen Schweregrad in K5.TGFβ-Mäusen.

Die Behandlung mit jeweils 30 mg/kg Ino-C2-PAF erfolgte intraperitoneal. a) Die grauen Kurven stellen die Mittelwerte der unbehandelten Tiere und die schwarzen die Werte der mit Ino-C2-PAF behandelten dar. In jeder Gruppe betrug die Anzahl der Versuchstiere $n=5$. Dargestellt ist der klinische Schweregrad an den Tagen 0, 4 und 7. b) Abgebildet ist das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere in Gramm (g). Die schwarzen Kurven stellen die Mittelwerte der unbehandelten Tiere und die grauen die Werte der mit Ino-C2-PAF behandelten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren in beiden Graphen die Standardabweichungen (\pm SD). * $p < 0,05$.

Diese Ergebnisse bestätigten sich im zweiten Versuch, bei dem die Tiere über einen etwas längeren Zeitraum von 2 Wochen behandelt wurden, um die Wirkung von Ino-C2-PAF, die sich im ersten Versuch abzeichnete, zu bestätigen und klarer herauszuarbeiten (Abb. 17). Dabei wurde ab Tag 11 ein signifikant niedrigerer klinischer Schweregrad in der behandelten Gruppe nachgewiesen ($p < 0,05$, Abb. 17 und 18a). Die mit Ino-C2-PAF behandelten Tiere hatten am Ende des Versuches einen mittleren Schweregrad von 4,75 Punkten. Im Vergleich dazu hatten die unbehandelten Tiere einen Mittelwert von 8,33 Punkten ($p < 0,001$). Auch im zweiten Versuch steigerten die Tiere, die mit Ino-C2-PAF behandelt wurden, ihr Gewicht signifikant mehr als die Kontrolltiere ($p < 0,001$; Abb. 18 b).

Die makroskopische Beurteilung konnte mikroskopisch bestätigt werden. Am Ende des Versuches zeigte sich eine signifikant dünnere Epidermis in den mit Ino-C2-PAF behandelten Mäusen ($19,45 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $24,39 \mu\text{M}$; $p < 0,05$; Abb. 19 a). Parallel dazu war die Anzahl der dermalen Mastzellen ebenfalls signifikant geringer ($24,54$ im Vergleich zu $37,36$ Mastzellen pro mm; $p < 0,001$; Abb. 19 b). In immunhistochemischen Färbungen stellten sich nach Ino-C2-PAF-Therapie deutlich geringere Anfärbungen von CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1), einem für Angiogenese charakteristischen Antigen, sowie CD4 und CD8, welche von T-Lymphozyten exprimiert werden, dar (Abb. 20).

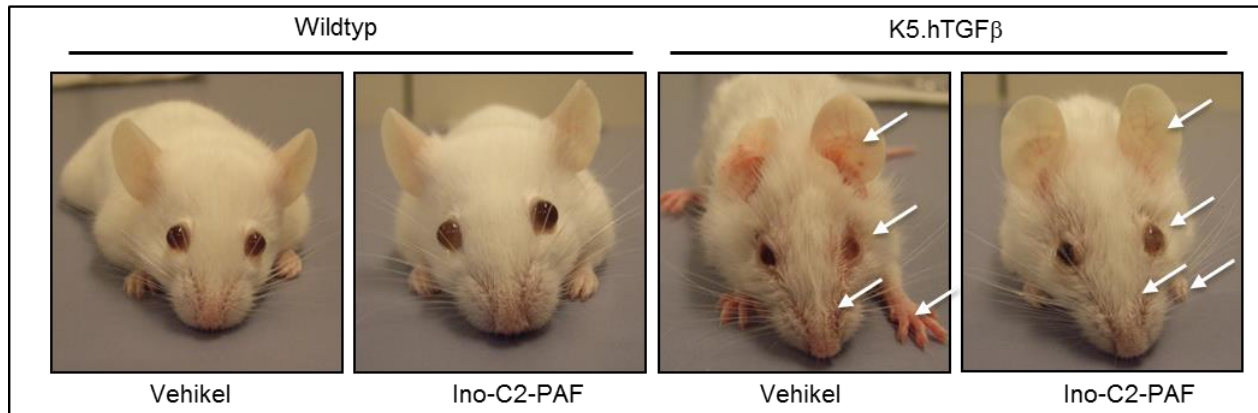


Abb. 17: Ino-C2-PAF reduziert die Ausprägung psoriasiformer Hautveränderungen in K5.TGFβ-transgenen Mäusen.

Wildtyp- und K5.hTGFβ1-transgene Mäuse wurden intraperitoneal mit Vehikel ($n=8$) oder 30 mg/kg Ino-C2-PAF ($n=9$) für einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt. Pfeile weisen auf die typischen Läsionen an Schnauze, Ohren, Augenlidern und Füßen exemplarisch ausgewählter Tiere hin. Unbehandelte K5.TGFβ1-transgene Mäuse zeigen einen Psoriasis-ähnlichen Phänotyp, der in den mit Ino-C2-PAF behandelten Tieren deutlich geringer ausgeprägt ist.

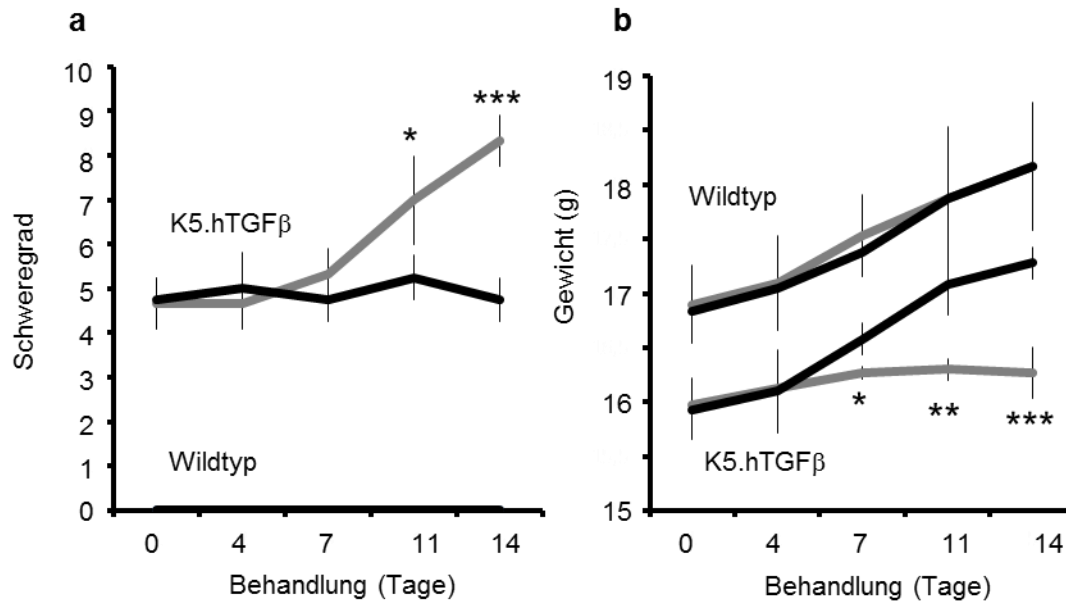


Abb. 18: Mit Ino-C2-PAF behandelte K5.hTGFβ1-transgene Mäuse entwickeln eine geringere Krankheitsaktivität und nehmen besser an Gewicht zu als mit Vehikel behandelte Tiere. Graphisch abgebildet sind der klinische Schweregrad (a) und das durchschnittliche Körpergewicht (b) der mit Ino-C2-PAF (schwarze Kurven, ± SD) sowie der mit Vehikel behandelten Mäuse (graue Kurven, ± SD). Die Gruppengrößen betragen bei Wildtyp-Mäusen jeweils n=3 und bei den K5.hTGFβ1-transgenen Mäusen jeweils n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

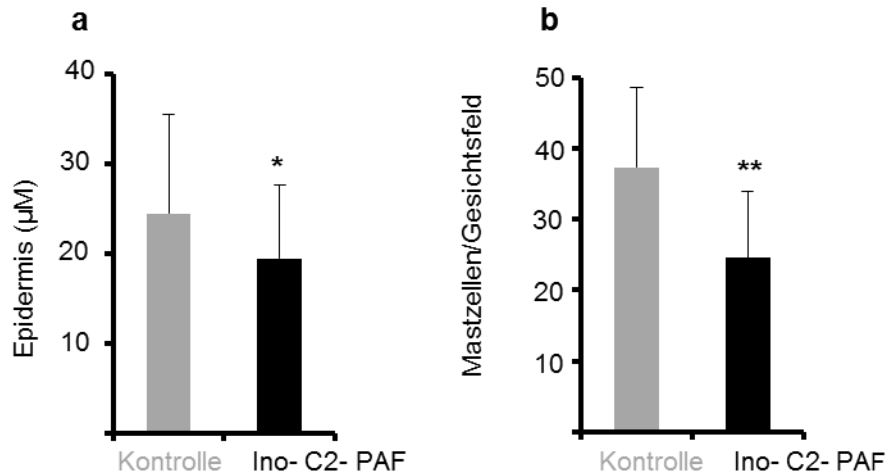


Abb. 19: K5.hTGF β 1-transgene Mäuse haben nach der Behandlung mit Ino-C2-PAF eine signifikant dünnere Epidermis und eine geringere dermale Mastzellichte.

Die nach Giemsa sowie die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Hautschnitte wurden morphometrisch analysiert. Zur Auswertung wurde pro Tier standardisiert in 10 verschiedenen Gesichtsfeldern ausgemessen und gezählt. Dargestellt sind die Standardabweichungen (\pm SD). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

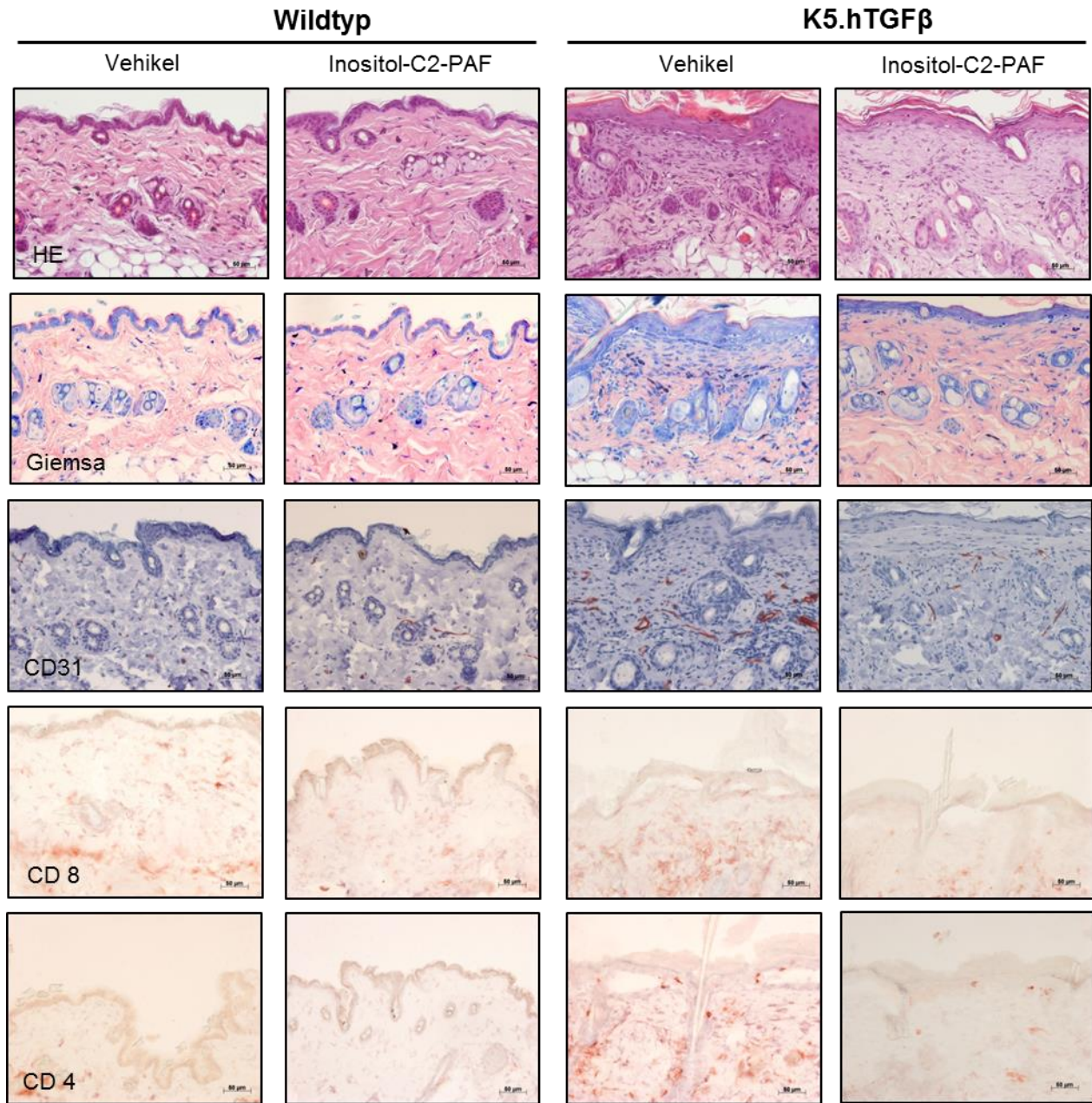


Abb. 20: Ino-C2-PAF verbessert den hyperproliferativ-entzündlichen Phänotyp in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen.

Wildtyp und K5.hTGF β 1-transgene Mäuse wurden intraperitoneal mit Vehikel oder mit Ino-C2-PAF (30 mg/kg) behandelt, wie in Abb. 17 umrissen. Bei der mikroskopischen Auswertung der mit Hämatoxylin und Eosin oder nach Giemsa gefärbten Hautschnitte stellte sich in den K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen nach Therapie mit Ino-C2-PAF eine Abnahme der epidermalen Akanthose und Hyperkeratose sowie des dermalen Infiltrates einschließlich der Mastzellen dar. Immunhistochemisch wurde darüber hinaus auch eine Abnahme der in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen pathologisch gesteigerten Vaskularisierung (CD31-Färbung) sowie der Infiltration CD4- und CD8-positiver Zellen nachgewiesen. Der dargestellte Maßstab beträgt 50 μ m.

3.7.2 Ino-C2-PAF bessert den psoriasiformen Phänotyp in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen

JunB (19p13.2) ist beim Menschen im Bereich der Psoriasis Susceptibility Region des PSORS6 Gens lokalisiert. JunB und c-Jun gehören zur Gruppe der Jun-Proteine und bilden zusammen mit den fos- und ATF-Proteinen den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivierendes Protein-1). Dieser ist maßgeblich an der Keratinozytenproliferation und -differenzierung beteiligt (Angel et al. 2001). Bezüglich der JunB-Expression in Psoriasisläsionen wurde einerseits ein Anstieg (Haider et al. 2006) aber auch eine verminderte Expression (Park et al. 2009) beschrieben. Doppelte Defizienz (knockout) von JunB und c-Jun führte in Mäusen zu einem prominenten psoriasiformen Phänotyp (Zenz et al. 2005).

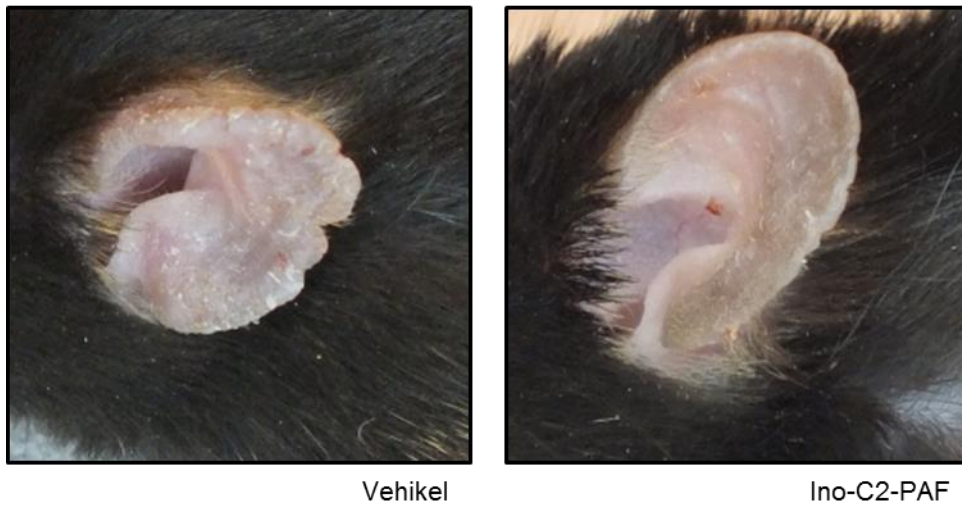
Im Gegensatz zur ersten Beschreibung (Zenz et al. 2005) entwickelten die JunB/c-Jun-defizienten Mäuse in der Göttinger Tierversuchsanlage einen chronisch-entzündlichen Phänotyp bereits ohne Tamoxifen-Induktion. Der Phänotyp war darüber hinaus deutlich geringer ausgebildet und im Wesentlichen auf die Ohren beschränkt. Aus diesem Grund wurde eine modifizierte „klinische“ Bewertungsskala zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung entwickelt und angewendet. Initial trat im Alter von etwa 4 Wochen eine zunehmende Schuppung der Ohren auf. Im Verlauf der Entzündung kamen bald eine Schwellung und Rötung hinzu. Die Erkrankung ging in eine zunehmende Verdickung und Deformation der Ohren über, die im Alter von 16 bis 20 Wochen ihren Endzustand erreichte. Die „klinische“ Bewertungsskala reichte von 0 (gesundes Ohr ohne makroskopisch sichtbare Veränderungen) bis 5 (starke Schuppung, Entzündung, Verdickung und Deformation des Ohres).

Die Tiere wurden im Alter von etwa 8 Wochen in zwei Gruppen mit gleichem durchschnittlichen Schweregrad aufgeteilt. Eine Gruppe (n=8) wurde mit dem Vehikel, die andere Gruppe (n=9) wurde mit 30 mg/kg Ino-C2-PAF intraperitoneal jeden zweiten Tag über insgesamt 3 Wochen behandelt. Im Verlauf des Versuches verschlechterte sich der Phänotyp der unbehandelten Kontrollgruppe deutlich (Abb. 21). Bereits nach einer Woche war der durchschnittliche Schweregrad des Phänotyps der behandelten Gruppe mit 1,3 deutlich besser als derjenige der unbehandelten Gruppe mit 2,2 (Abb. 21, 22 a). In der zweiten Woche ließ sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Ohren der

mit Ino-C2-PAF behandelten Tiere und der unbehandelten Gruppe nachweisen. Am Ende des Versuches war der Schweregrad der Kontrollgruppe etwa doppelt so groß wie derjenige der mit Ino-C2-PAF behandelten Gruppe. Gleichzeitig war die Gewichtszunahme (als Surrogat-Parameter für das allgemeine Wohlergehen der Tiere) in der Verum-Gruppe mit 10,4% über den Zeitraum von 3 Wochen signifikant höher ($p < 0,01$) als in der Kontrollgruppe, in der die Mäuse nur durchschnittlich 2,16 % Gewicht zunahmen (Abb. 22 b).

Die Mäuse wurden nach Beendigung des Versuches getötet und die Ohren wurden in Paraffin oder OCT eingebettet und anschließend histologisch ausgewertet. Die Deletion von JunB/c-Jun resultierte mikroskopisch in der erwarteten deutlich verbreiterten Epidermis (Akanthose) mit verdickter Hornschicht (Hyperkeratose). Außerdem konnte in den Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin sowie nach Giemsa ein entzündliches Infiltrat aus Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie einigen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Ino-C2-PAF reduzierte diese Parameter in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen deutlich (Abb. 23).

C- Jun/JunB defiziente Mäuse

**Abb. 21: Die Behandlung mit Ino-C2-PAF verbessert den Phänotyp von JunB/c-Jun-defizienten Mäusen.**

JunB/c-Jun-defiziente Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 3 Wochen jeweils Vehikel-Lösung oder 30 mg/kg Ino-C2-PAF jeden 2. Tag i.p.. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen zweier Ohren am Versuchsende. Die behandelten Tiere zeigten eine geringere Schwellung, Schuppung und Deformation im Vergleich zu Tieren aus der Kontrollgruppe.

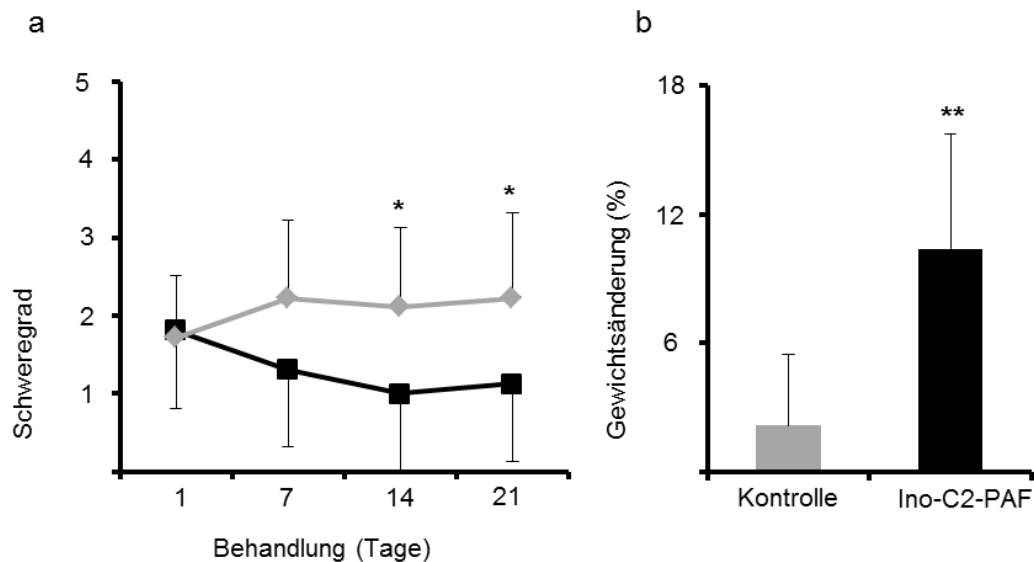


Abb. 22: Die Behandlung JunB/c-Jun-defizienter Mäuse mit Ino-C2-PAF führt zu einem verbessertem „klinischem“ Verlauf.

Die graue Kurve und der graue Balken stellen die Werte der unbehandelten Gruppe (n=8) dar. Die schwarze Kurve und der schwarze Balken repräsentieren die mit Ino-C2-PAF behandelten Tiere (n=9). a). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des klinischen Schweregrades zu den angegebenen Messzeitpunkten. *p < 0,05 verglichen mit der Kontrollgruppe. b) Abgebildet ist die prozentuale Gewichtsänderung der Mäuse während des Versuchszeitraums. **p < 0,01.

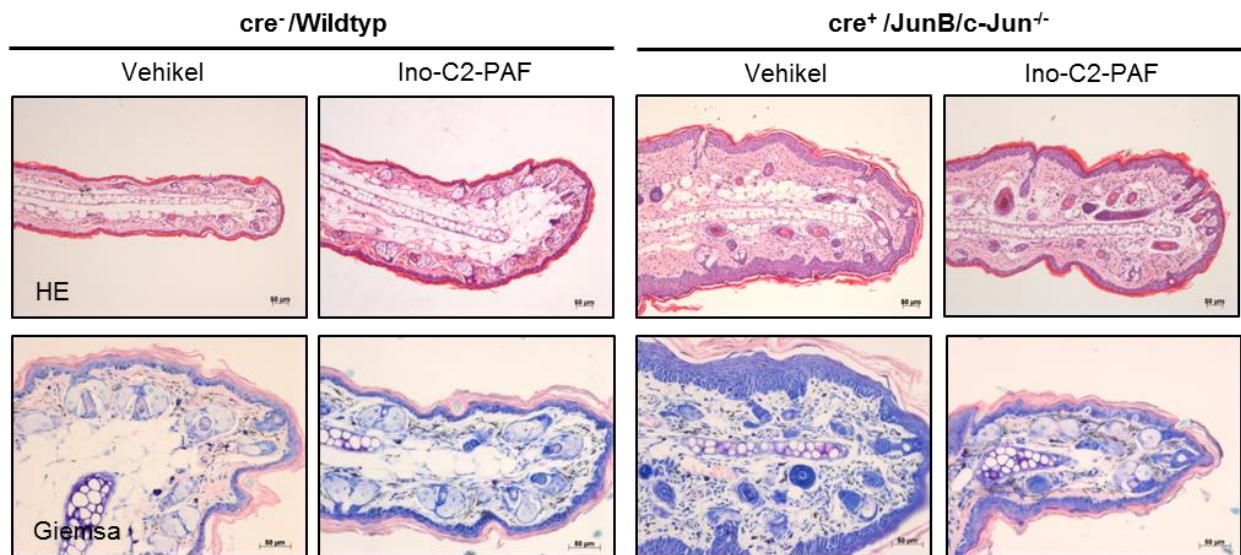


Abb. 23: Ino-C2-PAF hemmt die psoriasiforme chronisch-hyperproliferative Hautentzündung in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen *in vivo*.

Die Ohren der JunB/c-Jun-defizienten Mäuse wurden histochemisch mit Hämatoxylin-Eosin (obere Reihe) und nach Giemsa (untere Reihe) gefärbt. Gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Der angegebene Maßstab beträgt 50 µm. JunB/c-Jun-Defizienz führt zu epidermaler Akanthose und Hyperkeratose sowie einem dermalen gemischtzelligen entzündlichen Infiltrat. Diese Parameter sind in den mit Ino-C2-PAF behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Mäusen deutlich geringer ausgeprägt.

4. Diskussion

Antitumorlipide sind bislang nur hinsichtlich ihrer anti-neoplastischen Wirkung untersucht worden. Erst in jüngerer Zeit rückten ihre anti-inflammatorische Wirkung und somit ihr möglicher Einsatz zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen in den Fokus des wissenschaftlichen und klinischen Interesses. In einer umfangreichen Genanalyse konnte gezeigt werden, dass Ino-C2-PAF die Expression vieler Gene, welche sowohl für das angeborene und das adaptive Immunsystem als auch für generelle Entzündungsmechanismen relevant sind, herabreguliert (Semini et al. 2011b). Die antiproliferative Wirkung der Antitumorlipide konnte bereits in verschiedenen Tumorzelllinien, aber auch in HaCaT-Zellen (spontan immortalisierte humane Keratinozyten) gezeigt werden (Mollinedo et al. 2010; Wieder et al. 1995; Verhaar et al. 2013; Fischer et al. 2006). Die klinische Anwendung blieb allerdings durch die konzentrationsabhängige Zelllyse mit konsekutivem Zelltod limitiert (Wiese et al. 2000). Durch Substitution des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) mit dem zyklischen Polyalkohol Inositol wurde eine Substanz generiert, die sich neben einer hohen anti-neoplastischen Effizienz durch eine vergleichsweise geringere Toxizität auszeichnet (Fischer et al. 2006; Danker et al. 2010). Seine bisher bekannten Wirkungen auf zelluläre Funktionen machten Ino-C2-PAF zu einem interessanten Kandidaten für die Behandlung entzündlicher Prozesse, wobei das Wirkprinzip neuartig ist.

Die eingangs gestellten Fragen zur In-vitro- und In-vivo-Wirkung von Ino-C2-PAF konnten durch die Experimente der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ino-C2-PAF auf humane Endothelzellen untersucht. Dazu wurde *in vitro* eine Entzündungssituation durch die Zugabe von TNF α simuliert. TNF α gehört zur TNF-Zytokin-Superfamilie und induziert intrazelluläre Signalkaskaden durch die Bindung an TNFR-1 oder TNFR-2. Diese Wirkung entfaltet es auch auf Immunzellen und endotheliale Zellen. In der Folge kommt es zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in Endothelzellen sowie zu gesteigerter endothelialer Permeabilität und zur Aktivierung von Leukozyten (Kane et al. 2004). Die klinische Relevanz von TNF α bei der Psoriasis hat sich zum einen in der

Korrelation von TNF α -Spiegeln im Serum und der Höhe des PASI-Wertes bestätigt (Mussi et al. 1997; Roussaki-Schulze et al. 2005), und zum anderen viel mehr noch durch den in den letzten Jahren zunehmend erfolgreichen Einsatz von anti-TNF-Antikörpern in der Psoriasis-therapie (Krueger and Callis 2004).

Die direkte Wirkung von TNF α auf Endothelzellen ist komplex und scheint von weiteren Mediatoren und Einflussfaktoren im Mikromilieu moduliert zu werden. So wurde eine Hemmung der Endothelzell-Proliferation durch TNF α beschrieben (Sato et al. 1986; Frater-Schröder et al. 1987). Eine andere Arbeit demonstrierte eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation von HUVEC durch VEGF (Shen et al. 2010). In Kombination mit VEGF konnte dabei der inhibitorische Einfluss von TNF α deutlich reduziert werden (Patterson et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit hatte TNF α in einer Konzentration von 25 ng/ml keinen wesentlichen Einfluss auf Proliferation und Apoptose kultivierter menschlicher Endothelzellen. Die Proliferation dieser Zellen wurde durch Ino-C2-PAF dosisabhängig gehemmt. Dies geschah unabhängig von der TNF α -Stimulation. Im Gegensatz dazu steigerte die Behandlung mit Ino-C2-PAF signifikant die Apoptoserate nur in TNF α -stimulierten, nicht hingegen in unstimulierten Endothelzellen. Warum Ino-C2-PAF diese bevorzugte pro-apoptotische Wirkung auf TNF-stimulierte Endothelzellen hat, kann letztlich nicht genau erklärt werden. Es scheint, dass TNF α die Endothelzellen in einen „suszeptiblen“ Status versetzt, in dem sie der Apoptose-Induktion durch Ino-C2-PAF leicht zugänglich sind. Der erklärende Pathomechanismus könnte in einer Verstärkung der durch TNF induzierten Aktivierung der Caspase-8 *via* FADD begründet sein (Chen and Goeddel 2002). Dieser Aktivierungsweg konnte bereits in Jurkat-Zellen (immortalisierte humane T-Lymphozyten) nach der Behandlung mit Ino-C2-PAF nachgewiesen werden (von Haefen et al. 2011).

Neben der direkten Apoptose-Induktion hatte Ino-C2-PAF noch weitere anti-entzündliche Wirkungen auf TNF α -aktivierte Endothelzellen. Insbesondere hemmte Ino-C2-PAF dynamische Interaktionen zwischen aktivierten Endothelzellen und in der flüssigen Phase mobilen Leukozyten. Der Austritt der Leukozyten aus den Blutgefäßen ist einer der Schlüsselschritte in der entzündlichen Kaskade und stellt damit einen besonders interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar (Boehncke und Schön 2003). Der erste

Schritt in der Diapedese, das lockere Anheften (tethering) wird durch die Expression des Glykoproteins CLA auf reifen T-Zellen vermittelt. Dieses sogenannte „skin addressin“ findet sich auf der Mehrheit aller eingewanderten T-Zellen in psoriatischen Plaques (Davison et al. 2001). Der initiale Kontakt der CLA-exprimierenden Lymphozyten erfolgt über endotheliales P- und E-Selektin in den postkapillären Venolen (Fuhlbrigge et al. 1997). Aktiviert durch Chemokine wird die Bindung und Durchwanderung der Lymphozyten durch die Integrine VLA-4 und LFA-1 vermittelt (Krueger und Mooren 2007). Diese interagieren auf endothelialer Seite mit den Mitgliedern der Immunglobulin Superfamilie VCAM-1 und ICAM-1 (Deane und Hickey 2009; Allingham et al. 2007). Die läsionalen Endothelzellen der Psoriasispatienten exprimieren VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin im Vergleich zu nicht befallener Haut deutlich verstärkt (Schön und Boehncke 2005). *In vitro* lässt sich diese Situation durch die Zugabe von TNF α erreichen.

In dieser Arbeit wurde eine dosisabhängige Reduktion der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin durch Behandlung mit Ino-C2-PAF sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erzielt. Der deutlichste Effekt wurde dabei auf VCAM-1 sichtbar. Der prinzipielle inhibitorische Effekt der Antitumorlipide auf die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle humaner Endothelzellen konnte bereits früher für Edelfosine gezeigt werden (Bosse et al. 1995). Im Gegensatz dazu wurde keine inhibitorische Wirkung von Ino-C2-PAF auf die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Zytokine wie VEGF, VE-Cadherin sowie MCP-1 und IL-8 nachgewiesen. Daraus kann geschlossen werden, dass durch Ino-C2-PAF keine generelle Inhibition der Transkription erfolgte, sondern dass die Wirkung in humanen Endothelzellen bevorzugt diejenigen Genprodukte umfasste, die in entzündliche Prozesse involviert sind und/oder die durch zentrale Entzündungs-Mediatoren wie TNF α induziert werden.

Auf der „leukozytären Seite“ wurde durch Ino-C2-PAF die Expression der Adhäsionsmoleküle L-Selektin, VLA-4, LFA-1 und CLA auf humanen PBMCs reprimiert. Diese Wirkung trat bereits nach einer Behandlungsdauer von 2 Stunden auf. Wegen der Schnelligkeit des Wirkeintrittes kann der Ino-C2-PAF-Effekt wahrscheinlich nicht ausschließlich durch die transkriptionelle Regulation der betroffenen Genprodukte erklärt werden. Vielmehr sind pleiotrope Wirkungen wie die Aktivierung proteolytischer Enzyme,

welche zur Abspaltung (Shedding) der Zelloberflächenmoleküle führen, wahrscheinlich (Mollinedo et al. 2009). Man kann spekulieren, dass die durch den amphiphilen Charakter des Ino-C2-PAF-Moleküls bedingte Veränderung der Zellmembranstruktur zur Instabilität und damit zu vermehrtem Abbau bestimmter Oberflächenrezeptoren führt (Semini et al., 2014; Semini et al. 2011a). Unter den Bedingungen dieser Arbeit wurde keine proapoptische Wirkung von Ino-C2-PAF auf isolierte humane oder murine Leukozyten detektiert. Dies schließt selbstverständlich eine entsprechende Wirkung bei höheren Konzentrationen oder längerer Einwirkzeit nicht aus.

Allerdings scheint die Wirkung von Ino-C2-PAF auf humane und murine Leukozyten nicht einheitlich zu sein: Während in isolierten humanen Leukozyten mehrere Adhäsionsrezeptoren unterdrückt wurden, konnte *in vivo* in Mäusen nur eine Verminderung der L-Selektin-Expression nachgewiesen werden. Die Gründe für diese scheinbar diskrepanten Wirkungen sind noch unklar. Allerdings kann vermutet werden, dass in der komplexen Situation in einem intakten Organismus vielfältige Regulationsmechanismen interagieren, welche in ihrer Summe die Wirkung von Ino-C2-PAF modulieren könnten. Es ist auch denkbar, dass Ino-C2-PAF *in vivo* rasch degradiert wird oder dass die optimale Konzentration noch nicht gefunden wurde.

Wie auch immer die molekularen Wirkungen auf Endothelzellen und Leukozyten reguliert sind, so führten sie auf zellulärer Ebene zur Hemmung dynamischer Interaktionen zwischen beiden Zelltypen, die für die therapeutische Wirkung in chronisch-entzündlichen Erkrankungen wichtig sind. Um diese funktionellen Wirkungen nachzuweisen, wurde ein Flusskammermodell eingesetzt, welches das Rollen und die feste Adhäsion der Leukozyten an aktivierte Endothelzellen simuliert. Angewendet wurde dieses experimentelle System bereits zur Untersuchung der Wirkmechanismen etablierter und für die Psoriasis-therapie zugelassener Medikamente wie Adalimumab und Fumarsäureester (Wallbrecht et al. 2011; Lockmann und Schön 2014). In den Experimenten dieser Arbeit führte die separate Behandlung jedes der beiden Interaktionspartner, also sowohl der Endothelzellen (HUVECs) als auch der PBMCs, zu einer signifikant reduzierten Anzahl rollender und adhätierender PBMCs. Dieser Effekt lässt sich zumindest teilweise, wenn nicht sogar hauptsächlich, durch die verminderte Expression der relevanten Adhäsionsmoleküle

erklären. Eine durch simultane Behandlung beider Zellreihen gesteigerte Effektivität ist durchaus denkbar und wäre zur Erklärung der guten In-vivo-Wirksamkeit geeignet. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint es sinnvoll und notwendig, bei der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Psoriasis mehrere Adhäsionsmoleküle gleichzeitig herabzuregulieren. Untersuchungen mit einem selektiv gegen E-Selektin gerichteten Antikörper zeigte in einer klinischen Studie zur Behandlung der Psoriasis keine Wirksamkeit (Bhushan et al. 2002). Pan-Selektin-Inhibitoren scheinen hier besser zu wirken (Schön et al. 1997; Friedrich et al. 2006). Darüber hinaus könnten bei selektiver Blockade eines einzelnen Rezeptors paradoxe Wirkungen auftreten, wie dies kasuistisch für den gegen VLA-4 gerichteten Antikörper Natalizumab berichtet wurde, der in einem Fall zu einer schweren Aggravation einer Schuppenflechte führte (Millan- Pascual et al. 2012). Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass zahlreiche biologische Mechanismen redundant reguliert sind; in diesem speziellen Fall, dass bei der Blockade eines einzelnen Adhäsionsrezeptors die Funktion von anderen Adhäsionsmolekülen übernommen oder sogar „überkompensiert“ wird (Boehncke und Schön 2003).

Für die Therapie entzündlicher Erkrankungen, bei denen TNF α eine wichtige pathogenetische Rolle spielt, könnten die In-vitro-Befunde dieser Arbeit insgesamt bedeuten, dass Ino-C2-PAF bevorzugt in einem durch erhöhte TNF α -Wirkung gekennzeichneten Milieu seine therapeutische Wirkung entfaltet, während nicht entzündete Gewebe weniger beeinflusst werden. Tatsächlich konnte in Übereinstimmung mit dieser Hypothese die chronisch-entzündliche Hauterkrankung in K5.hTGF β 1-transgenen Mäusen, die deutlich erhöhte TNF α -Expression aufweisen (Li et al. 2004), gebessert werden, während die Wildtyp-Kontrolltiere durch Ino-C2-PAF nicht beeinflusst wurden. Ähnlich gute Wirksamkeit wurde in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen (Zenz et al. 2005) beobachtet. Beide Tiermodelle zeigen einen charakteristischen psoriasiformen Phänotyp mit epidermaler Hyperproliferation, Akanthose und Hyperkeratose, eine gesteigerte Angiogenese und kutane Hypervaskularisierung sowie ein Th-1-gewichtetes entzündliches Infiltrat. Anti-angiogene Therapien haben sich in beiden Modellen bereits als wirksam erwiesen (Schönthaler et al. 2009; Zibert et al. 2011). In den Versuchen dieser Arbeit wurde Ino-C2-PAF erstmalig bei entzündlichen Erkrankungen *in vivo* angewendet und seine anti-entzündliche Wirkung konnte sowohl „klinisch“-makroskopisch als auch histopathologisch

nachgewiesen werden. Zusätzlich nahmen die behandelten Tiere in beiden Modellen deutlich mehr an Gewicht zu als die Kontrolltiere. Diese Beobachtung bestätigte, dass die mit Ino-C2-PAF therapierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen einen insgesamt besseren Gesundheitszustand erlangten. Die Ergebnisse der In-vivo-Versuche lassen sich durch die Resultate der mechanistischen In-vitro-Versuche zumindest teilweise erklären.

Die gute anti-entzündliche Wirkung in den beiden Mausmodellen der Psoriasis steht darüber hinaus im Einklang mit der Wirkung des mit Ino-C2-PAF verwandten Edelfosines in autoinflammatorischen chronisch-entzündlichen Tiermodellen der Multiplen Sklerose (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) und der chronischen Colitis (Abramowski et al. 2014; Mollinedo et al. 2009). In diesen Studien konnte ein deutlicher Rückgang der gewebspezifischen lymphozytären Infiltration bei insgesamt guter Verträglichkeit verzeichnet werden.

In guter Übereinstimmung mit der inhibitorischen Wirkung von Ino-C2-PAF auf TNF α -induzierte pro-inflammatorische zelluläre Funktionen *in vitro* liegt die Vermutung nahe, dass Ino-C2-PAF auch in den beiden Tiermodellen auf TNF α -vermittelte entzündliche Gewebeveränderungen wirkte. Einschränkend ist hier allerdings anzumerken, dass in den Mausmodellen nicht nur TNF α , sondern auch zahlreiche andere entzündliche Mediatoren, beispielsweise IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MCP-1 sowie Matrix-Metalloproteasen deutlich verstärkt exprimiert werden (Li et al. 2004). Direkte oder indirekte Wechselwirkungen von Ino-C2-PAF mit diesen letztgenannten Mediatoren wären also ebenfalls denkbar.

Obwohl sicherlich noch viele Details der molekularen Ino-C2-PAF-Wirkung in der komplexen In-vivo-Situation unbekannt oder spekulativ sind, scheint Ino-C2-PAF einen ausgeprägten anti-entzündlichen „Nettoeffekt“ in zwei komplementären murinen Psoriasis-Modellen zu haben. Darüber hinaus wurden in den Kurzzeit-Versuchen dieser Arbeit keine offensichtlich toxischen Wirkungen festgestellt. Deshalb machen die Ergebnisse dieser Arbeit Ino-C2-PAF (oder verwandte Substanzen) für die Entwicklung neuer Therapeutika gegen die Psoriasis oder pathogenetisch verwandte chronisch-entzündliche Erkrankungen interessant.

5. Zusammenfassung

Die Psoriasis ist mit einer Prävalenz von 1-3% eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Sie ist gekennzeichnet durch epidermale Hyperkeratose und Akanthose, gesteigerte Angiogenese sowie ein gemischtzelliges Infiltrat. Ihre Immunpathogenese auf dem Boden genetischer Prädisposition ist komplex. Psoriasis kann mit kardiovaskulären, metabolischen und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert sein (Komorbidität).

Hier wurde erstmals die Wirkung des inositylierten Plättchen-aktivierenden Faktors (Ino-C2-PAF), eines synthetischen Alkylphospholipids mit geringer Toxizität, in experimentellen Modellen chronisch-entzündlicher (Haut)-Erkrankungen untersucht. Die Wirkung beruht auf Zellmembran-Interaktionen, wodurch der Cholesterol- und Phospholipidmetabolismus verändert und zelluläre Signalkaskaden der Proliferation, Apoptose und Motilität beeinträchtigt werden. Ino-C2- PAF reguliert außerdem entzündungsrelevante Proteine herab.

In vitro lag der Schwerpunkt auf der Wirkung von Ino-C2-PAF auf Endothelzellen und Leukozyten. Ino-C2-PAF hemmte die Proliferation humaner Endothelzellen moderat, steigerte allerdings die Apoptose TNF α -stimulierter Endothelzellen sehr deutlich. Diese Wirkung war begleitet von einer Reduktion der durch TNF α stimulierbaren endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin sowie der lymphozytären Adhäsionsmoleküle CD49d, CD11a, CD62L und CLA. Funktionell führte dies zu signifikanter Abnahme dynamischer Interaktionen (Roll- und feste Adhäsion) von Leukozyten und aktivierten Endothelzellen in Flusskammerexperimenten.

Die anti-entzündliche Wirkung von Ino-C2-PAF wurde in zwei komplementären Modellen *in vivo* bestätigt. Sowohl in K5.hTFG β -transgenen als auch in JunB/c-Jun-defizienten Mäusen bewirkte Ino-C2-PAF eine signifikante Besserung des psoriasisformen Phänotyps sowohl auf makroskopischer als auch auf histopathologischer Ebene.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Ino-C2-PAF oder verwandte Substanzen zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen wie der Psoriasis eingesetzt werden könnten.

6. Literaturverzeichnis

Abramowski P, Steinbach K, Zander AR, Martin R (2014): Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 274 (1-2), 111-24

Ahlehoff O, Skov L, Gislason G, Lindhardse J, Kristensen SL, Iversen L, Lasthein S, Gniadecki R, Dam TN, Torp-Pedersen C et al. (2013): Cardiovascular disease event rates in patients with severe psoriasis treated with systemic anti-inflammatory drugs: a Danish real-world cohort study. *J Intern Med* 273(2), 197-204

Akman A, Yilmaz E, Mutlu H, Ozdogan M (2009): Complete remission of psoriasis following bevacizumab therapy for colon cancer. *Clin Exp Dermatol* 34(5), e202-4

Allingham MJ, van Buul JD, Burrige K (2007): ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration. *J Immunol* 179(6), 4053-4064

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M (2001): Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20(19), 2413-23

Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maitre M, Aractingi S, Bachelez H, Cribier B, Joly P et al. (2012): Efficacy of psoralen UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 Suppl 3, 1-21

Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J, Munro M, Veal C, Allen M, Leman J, David Burden A et al. (2003): Genetic Analysis of PSORS1 Distinguishes Guttate Psoriasis and Palmoplantar Pustulosis. *J Invest Dermatol* 120(4), 627-632

Augustin M, Glaeske G, Radtke MA, Christophers E, Reich K, Schäfer I (2010a): Epidemiology and comorbidity of psoriasis in children. *Br J Dermatol* 162(3), 633-6

Augustin M, Reich K, Blome, Schäfer I, Laass A, Radtke MA (2010b): Nail psoriasis in Germany: epidemiology and burden of disease. *Br J Dermatol* 163(3), 580-585

Baeta IG, Bittencourt FV, Gontijo B, Goulart EM (2014): Comorbidities and cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *An Bras Dermatol* 89(5), 735-44

Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK (2010): The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol* 49(12), 1351-61

- Bazill GW, Dexter TM (1990): Role of endocytosis in the action of ether lipids on WEHI-3B, HL60, and FDCP- mix A4 cells. *Cancer Res* 50(23), 7505-12
- Besgen P, Trommler P, Vollmer S, Prinz JC (2010): Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and heat shock protein 27: potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis. *J Immunol* 184(9), 5392-402
- Beswick TSL (1957): Robert Willan: The Solution of a Ninety-Year-Old Mystery. *J Hist Med Allied Sci* XII(7), 349-365
- Bhushan M, McLaughlin B, Weiss JB, Griffiths CEM (1999): Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. *Br J Dermatol* 141(6), 1054-1060
- Bhushan M, Bleiker TO, Ballsdon AE, Allen MH, Sopwith M, Robinson MK, Clarke C, Weller RP, Graham-Brown RA, Keefe M et al. (2002): Anti-E-selectin is ineffective in the treatment of psoriasis: a randomized trial. *Br J Dermatol* 146(5), 824-31
- Boehncke WH, Schön MP (2003): Interfering with leukocyte rolling--a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? *Trends Pharmacol Sci* 24(2), 49-52
- Boehncke WH, Boehncke S (2012): Cardiovascular Mortality in Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Epidemiology, Pathomechanisms, Therapeutic Implications, and Perspectives. *Curr Rheumatol Rep* 14(4), 343-348
- Boehncke WH, Schön MP (2015): Psoriasis. *Lancet*, pii: S0140-6736(14) 61909-7
- Boehncke, WH, Boehncke S, Schön, MP (2010): Managing comorbid disease in patients with psoriasis. *BMJ* 340, b5666
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S (1995): Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J Biol Chem* 270(13), 7757-64
- Bosse DC, Parker JT, Vogler WR, Ades EW (1995): Selective inhibition of adhesion molecule expression by edelfosine (ET-18-OCH₃) on human umbilical vein or microvascular endothelium. *Pathobiology* 63(2), 109-14
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3), 761-71
- Brazzelli V, Carugno A, Alborghetti A, Grasso V, Cananzi R, Fornara L, De Silvestri A, Borroni G (2011): Prevalence, severity and clinical features of psoriasis in fingernails and toenails in adult patients: Italian experience. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26(11), 1354-1359

Busto JV, Sot J, Goni FM, Mollinedo F, Alonso A (2007): Surface-active properties of the anti-tumour ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (edelfosine). *Biochim Biophys Acta* 1768(7), 1855-60

Catanoso M, Pipitone N, Salvarani C (2012): Epidemiology of psoriatic arthritis. *Reumatismo* 64(2), 66-70

Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geisler R, Brodie S, Kimball AB et al. (2006): IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 203(12), 2577-87

Chen G, Goeddel DV (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296(5573), 1634-5

Chi CC, Wang SH (2014): Efficacy and cost-efficacy of biologic therapies for moderate to severe psoriasis: a meta-analysis and cost-efficacy analysis using the intention-to-treat principle. *Biomed Res Int* 2014, 862851

Clive S, Gardiner J, Leonard RC (1999): Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 44 Suppl, S29-30

Coimbra S, Oliveira H, Reis F, Belo L, Rocha S, Quintanilha A, Figueiredo A, Teixeira F, Castro E, Rocha-Pereira P et al. (2010): Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy. *Br J Dermatol* 163(6), 1282-90

Danker K, Reutter W, Semini G (2010): Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane. *Br J Pharmacol* 160(1), 36-47

Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JNWN (2001): Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 10(4), 280-285

Deane JA, Hickey MJ (2009): Molecular mechanisms of leukocyte trafficking in T-cell-mediated skin inflammation: insights from intravital imaging. *Expert Rev Mol Med* 11, e25

Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF (1994): Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180(3), 1141-6

Devaux S, Castela A, Archier E, Gallini A, Joly P, Misery L, Aractingi S, Aubin F, Bachelez H, Cribier B et al. (2012): Topical vitamin D analogues alone or in association with topical steroids for psoriasis: a systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26, 52-60

- Diaconu D, Fritz Y, Dawes SM, Loyd CM, Ward NL (2013): VEGF-Trap decreases CD4+ T cells, Th17 cytokines improving psoriasis-like skin inflammation in KC-Tie2 mice. *J Dermatol Sci* 72(3), 322-5
- Dika E, Varotti C, Bardazzi F, Maibach HI (2006): Drug-Induced Psoriasis: An Evidence-Based Overview and the Introduction of Psoriatic Drug Eruption Probability Score. *Cutan Ocul Toxicol* 25(1), 1-11
- Dika E, Bardazzi F, Balestri R, Maibach H (2007): Environmental factors and psoriasis. *Curr Probl Dermatol* 35, 118-35
- Diomede L, Bizzi A, Magistrelli A, Modest EJ, Salmona M, Nosedà A (1990): Role of cell cholesterol in modulating antineoplastic ether lipid uptake, membrane effects and cytotoxicity. *Int J Cancer* 46(2), 341-6
- Diomede L, Piovani B, Modest EJ, Salmona M (1993): The effect of culture medium composition on ether lipid cytotoxic activity. *Lipids* 28(3), 189-92
- Emre S, Metin A, Demirseren DD, Kilic S, Isikoglu S, Erel O (2013): The relationship between oxidative stress, smoking and the clinical severity of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27(3), e370-5
- Famenini S, Wu JJ (2013): Infliximab-induced psoriasis in treatment of Crohn's disease-associated ankylosing spondylitis: case report and review of 142 cases. *J Drugs Dermatol* 12(8), 939-43
- Farber EM, Nall ML, Watson W (1974): Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol* 109(2), 207-11
- Fenix-Caballero S, Alegre-del Rey EJ, Castano-Lara R, Puigventos-Latorre F, Borrero-Rubio JM, Lopez-Vallejo JF (2013): Direct and indirect comparison of the efficacy and safety of Adalimumab, etanercept, infliximab and golimumab in psoriatic arthritis. *J Clin Pharm Ther* 38(4), 286-93
- Ferrara N (2000): Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55, 15-35; discussion 35-6
- Finzel S, Englbrecht M (2011): Psoriatic arthritis : a permanent challenge for rheumatologists and patients--Part 1: epidemiology, pathogenesis and clinical course. *Z Rheumatol* 70(8), 685-97
- Fischer A (2006): Aufklärung der Wirkung eines neuartigen, modifizierten Phospholipid-analogons: Inositol-C2-PAF. MED Diss. Berlin, <http://www.diss.fu-berlin.de/2006/300/>

Fischer A, Müller D, Zimmermann-Kordmann M, Kleuser B, Mickleit M, Laabs S, Löwe W, Cantagrel F, Reutter W, Danker K (2006): The ether lipid inositol-C2-PAF is a potent inhibitor of cell proliferation in HaCaT cells. *Chembiochem* 7(3), 441-9

Fleer EA, Berkovic D, Eibl H, Unger C (1993): Investigations on the cellular uptake of hexadecylphosphocholine. *Lipids* 28(8), 731-6

Fotiadou C, Lazaridou E, Ioannides D (2014): Management of psoriasis in adolescence. *Adolesc Health Med Ther* 5, 25-34

Frater-Schröder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P (1987): Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(15), 5277-81

Friedrich M, Bock D, Philipp S, Ludwig N, Sabat R, Wolk K, Schroeter-Maas S, Aydt E, Kang S, Dam TN et al. (2006): Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man. *Arch Dermatol Res* 297(8), 345-51

Frieta M, Siebert S, McInnes IB (2014): The interleukin-17 pathway in psoriasis and psoriatic arthritis: disease pathogenesis and possibilities of treatment. *Curr Rheumatol Rep* 16(4), 414

Fuhlbrigge R, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS (1997): Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 389(6654), 978-981

Gajate C, Mollinedo F (2001): The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98(13), 860-3

Garcia Bustos MF, Barrio A, Parodi C, Becker J, Moreno S, Basombrio MA (2014): Miltefosine versus meglumine antimoniate in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Medicina (B Aires)* 74(5), 371-377

Giegold O, Ludwig RJ, Hardt K, Will J, Schön MP, Oostingh GJ, Pfeilschifter JM, Boehncke WH, Radeke HH (2009): Computer-aided analysis of cell interactions under dynamic flow conditions. *Exp Dermatol* 18(3), 238-45

Gisondi P, Dalle Vedove C, Girolomoni G (2014): Efficacy and safety of secukinumab in chronic plaque psoriasis and psoriatic arthritis therapy. *Dermatol Ther (Heidelb)* 4(1), 1-9

Gollnick HPM (1996): Oral retinoids-efficacy and toxicity in psoriasis. *Br J Dermatol* 135, 6-17

Gordon KB, Duffin KC, Bissonnette R, Prinz JC, Wasfi Y, Li S, Shen YK, Szapary P, Randazzo B, Reich K (2015): A Phase 2 Trial of Guselkumab versus Adalimumab for Plaque Psoriasis. *N Engl J Med* 373, 136-144

- Grundmann-Kollmann M, Ludwig R, Zollner TM, Ochsendorf F, Thaci D, Boehncke WH, Krutmann J, Kaufmann R, Podda M (2004): Narrowband UVB and cream psoralen- UVA combination therapy for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 50(5), 734-9
- Haider AS, Duculan J, Whynot JA, Krueger JG (2006): Increased JunB mRNA and protein expression in psoriasis vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* 126(4), 912-4
- Henseler T, Christophers E (1985): Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13(3), 450-456
- Henseler T, Christophers E (1995): Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 32(6), 982-6
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M (2001): Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10(1), 1-10
- Heydendael VMR, Spuls PI, Opmeer BC, de Borgie CAJM, Reitsma JB, Goldschmidt WFM, Bossuyt PMM, Bos JD, de Rie MA (2003): Methotrexate versus Cyclosporine in Moderate-to-Severe Chronic Plaque Psoriasis. *N Engl J Med* 349(7), 658-665
- Hsu L, Armstrong AW (2014): JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis. *J Immunol Res* 2014, 283617
- Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002): Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur J Biochem* 269(18), 4649-55
- Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A (2010): Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 130(5), 1373-83
- Kane D, Gerald OF (2004): Tumor necrosis factor-alpha in psoriasis and psoriatic arthritis: a clinical, genetic, and histopathologic perspective. *Curr Rheumatol Rep* 6(4), 292-8
- Kavanaugh A, Mease PJ, Gomez-Reino JJ, Adebajo AO, Wollenhaupt J, Gladman DD, Lespessailles E, Hall S, Hochfeld M, Hu C et al. (2014): Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor. *Ann Rheum Dis* 73(6), 1020-6
- Keijsers RR, Joosten I, van Erp PE, Koenen HJ, van de Kerkhof PC (2014): Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol* 23(11), 799-803
- Kivelevitch D, Mansouri B, Menter A (2014): Long term efficacy and safety of etanercept in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biologics* 8, 169-82

Krueger JG (2002): The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 46(1), 1-23; quiz 23-6

Krueger JG, Callis K (2004): Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis. *Arch Dermatol* 140(2), 218-25

Li AG, Wang D, Feng XH, Wang XJ (2004): Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J* 23(8), 1770-81

Li AG, Lu SL, Han G, Hoot KE, Wang XJ (2006): Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis. *Mol Carcinog* 45(6), 389-96

Lockmann A, Schön MP (2013): Phenotypic and functional traits of peripheral blood mononuclear cells retained by controlled cryopreservation: implications for reliable sequential studies of dynamic interactions with endothelial cells. *Exp Dermatol* 22(5), 358-9

Lockmann A, Schön MP (2014): TNF alpha-induced leukocyte-endothelial cell interactions show marked interindividual differences independent of the clinical response to adalimumab. *Exp Dermatol* 23(2), 133-4

Loewe R, Holnthoner W, Groger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, Hofer E, Wolff K, Petzelbauer P (2002): Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 168(9), 4781-7

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445(7130), 866-873

Lynde CW, Poulin Y, Vender R, Bourcier M, Khalil S (2014): Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 71(1), 141-50

Magerl M, Rother M, Bieber T, Biedermann T, Brasch J, Dominicus R, Hunzelmann N, Jakob T, Mahler V, Popp G et al. (2013): Randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of miltefosine in antihistamine-resistant chronic spontaneous urticaria. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27(3), e363-9

Man XY, Yang XH, Cai SQ, Bu ZY, Zheng M (2008): Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF. *J Cell Mol Med* 12(2), 649-60

Marco C, Rios-Marco P, Jimenez-Lopez JM, Segovia JL, Carrasco MP (2014): Antitumoral alkylphospholipids alter cell lipid metabolism. *Anticancer Agents Med Chem* 14(4), 545-58

Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR, Puel A, Pei XY, Freitag S, Zribi J, Bal E, Cluzeau C, Chrabieh M et al. (2011): Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med*. 365(7), 620-8

Martin BA, Chalmers RJ, Telfer NR (1996): How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis? *Arch Dermatol* 132(6), 717-8

Mierke CT, Ballmaier M, Werner U, Manns MP, Welte K, Bischoff SC (2000): Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cells. *J Exp Med* 192(6), 801-11

Millan-Pascual J, Turpin-Fenoll L, Del Saz-Saucedo P, Rueda-Medina I, Navarro-Munoz S (2012): Psoriasis during natalizumab treatment for multiple sclerosis. *J Neurol* 259(12), 2758-60

Moll JM, Wright V (1973): Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 3(1): 55-78

Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, Modolell M (1997): Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res* 57(7), 1320-8

Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, Collia F, Rivas JV, Modolell M, Iglesias A (2009): Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329(2), 439-49

Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, de Frias M, Roué G, Gil J, Colomer D, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ (2010): In vitro and In vivo Selective Antitumor Activity of Edelfosine against Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Involving Lipid Rafts. *Clinical Cancer Research* 16(7), 2046-2054

Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, Acuna AU, Nieto-Miguel T, Villa-Pulgarin JA, Gonzalez-Garcia C, Cena V et al. (2011): Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis* 2, e158

Montaudié H, Sbidian E, Paul C, Maza A, Gallini A, Aractingi S, Aubin F, Bachelez H, Cribier B, Joly P et al. (2011): Methotrexate in psoriasis: a systematic review of treatment modalities, incidence, risk factors and monitoring of liver toxicity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 12-18

Moustafa F, Feldman SR (2014): A review of phosphodiesterase-inhibition and the potential role for phosphodiesterase 4-inhibitors in clinical dermatology. *Dermatol Online J* 20(5), 22608

Mrowietz U und K Asadullah (2005). "Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity." *Trends Mol Med* 11(1): 43-48.

Muller WA (2003): Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24(6), 327-34

Munder PG, Ferber E, Fischer H (1965): Studies on the dependence of the cytolytic effect of lysolecithin on cell membrane enzymes. *Z Naturforsch B* 20(11), 1048-61

- Munder PG, Ferber E, Modolell M, Fischer H (1969): The influence of various adjuvants on the metabolism of phospholipids in macrophages. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 36(1), 117-28
- Mussi A, Bonifati C, Carducci M, D'Agosto G, Pimpinelli F, D'Urso D, D'Auria L, Fazio M, Ameglio F (1997): Serum TNF-alpha levels correlate with disease severity and are reduced by effective therapy in plaque-type psoriasis. *J Biol Regul Homeost Agents* 11(3), 115-8
- Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, Ockenfels HM, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M et al. (2012). S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J Dtsch Dermatol Ges* 10 Suppl 2: S1-95
- Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M, (2005): Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202(1), 135-43
- Nevitt GJ, Hutchinson PE (1996): Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 135(4), 533-7
- Ni C, Chiu MW (2014): Psoriasis and comorbidities: links and risks." *Clin Cosmet Investig Dermatol* 7, 119-32
- Nosedá A, Godwin PL, Modest EJ (1988): Effects of antineoplastic ether lipids on model and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 945(1), 92-100
- Nosedá A, White JG, Godwin PL, Jerome WG, Modest EJ (1989): Membrane damage in leukemic cells induced by ether and ester lipids: an electron microscopic study. *Exp Mol Pathol* 50(1), 69-83
- Oostingh GJ, Schlickum S, Friedl P, Schön MP (2007): Impaired induction of adhesion molecule expression in immortalized endothelial cells leads to functional defects in dynamic interactions with lymphocytes. *J Invest Dermatol* 127(9), 2253-8
- Park CC, Kim KJ, Woo SY, Chun JH, Lee KH (2009): Comparison of the Expression Profile of JunB, c-Jun, and S100A8 (Calgranulin A) in Psoriasis Vulgaris and Guttate Psoriasis. *Ann Dermatol* 21(1), 35-8
- Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E (1996): Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98(2), 490-6
- Petersen ES, Kelley EE, Modest EJ, Burns CP (1992): Membrane lipid modification and sensitivity of leukemic cells to the thioether lipid analogue BM 41.440. *Cancer Res* 52(22), 6263-9

Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ (2010): PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* 87(3-4), 69-82

Radtke MA, Reich K, Blome C, Rustenbach S, Augustin M (2009): Prevalence and clinical features of psoriatic arthritis and joint complaints in 2009 patients with psoriasis: results of a German national survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23(6), 683-691

Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, Millan J (2012): Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation. *Cell Mol Life Sci* 69(18), 3079-99

Reich K, Nestle FO, Papp K, Ortonne JP, Evans R, Guzzo C, Li S, Dooley LT, Griffiths CE (2005): Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet* 366(9494), 1367-74

Roelofzen JH, Aben KK, Oldenhof UT, Coenraads PJ, Alkemade HA, van de Kerkhof PC, van der Valk PG, Kiemeneij LA (2010): No increased risk of cancer after coal tar treatment in patients with psoriasis or eczema. *J Invest Dermatol* 130(4), 953-61

Roussaki-Schulze AV, Kouskoukis C, Petinaki E, Klimi E, Zafiriou E, Galanos A, Rallis E (2005): Evaluation of cytokine serum levels in patients with plaque-type psoriasis. *Int J Clin Pharmacol Res* 25(4), 169-73

Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K (2007): Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 16(10), 779-98

Sato N, Goto T, Haranaka K, Satomi N, Nariuchi H, Mano-Hirano Y, Sawasaki Y (1986): Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 76(6), 1113-21

Saurat JH, Stingl G, Dubertret L, Papp K, Langley RG, Ortonne JP, Unnebrink K, Kaul M, Camez A et al. (2008): Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). *Br J Dermatol* 158(3), 558-66

Schmitt J, Rosumeck S, Thomaschewski G, Sporbeck B, Haufe E, Nast A (2014): Efficacy and safety of systemic treatments for moderate-to-severe psoriasis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol* 170(2), 274-303

Schoels M (2014): Psoriatic arthritis indices. *Clin Exp Rheumatol* 32(5 Suppl 85), S-109-12

Schön MP (2014): The plot thickens while the scope broadens: a holistic view on IL-17 in psoriasis and other inflammatory disorders. *Exp Dermatol* 23(11), 804-6

Schön MP, Boehncke WH (2005): Psoriasis. *N Engl J Med* 352(18), 1899-1912

Schön MP, Krahn T, Schön M, Rodriguez ML, Antonicek H, Schultz JE, Ludwig RJ, Zollner TM, Bischoff E, Bremm KD et al. (2002): Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med* 8(4), 366-72

Schön MP, Zollner TM, Boehncke WH (2003): The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 121(5), 951-62

Schönthaler HB, Huggenberger R, Wculek SK, Detmar M, Wagner EF (2009): Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(50), 21264-9

Schweckendiek W (1959): Treatment of psoriasis vulgaris. *Med Monatsschr* 13(2), 103-4

Semini G, Hildmann A, Reissig HU, Reutter W, Danker K (2011a): 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. *Biochem Pharmacol* 81(8), 985-95

Semini G, Klein A, Danker K (2011b): Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells. *Pharmacogenet Genomics* 21(7), 375-87

Semini G, Hildmann A, von Haefen C, Danker K (2014): Glycosidated phospholipids - a promising group of anti-tumour lipids. *Anticancer Agents Med Chem* 14(4), 607-17

Shen K, Sheng Y, Ji L, Wang Z (2010): Involvement of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in EGF-induced angiogenesis. *Cell Biol Int* 34(12), 1213-8

Shlyankevich J, Mehta NN, Krueger JG, Strober B, Gudjonsson JE, Qureshi AA, Tebbey PW, Kimball AB (2014): Accumulating Evidence for the Association and Shared Pathogenic Mechanisms between Psoriasis and Cardiovascular-Related Co-morbidities. *Am J Med* 127(12), 1148-53

Smith KE, Fenske NA (2000): Cutaneous manifestations of alcohol abuse. *J Am Acad Dermatol* 43(1 Pt 1), 1-16

Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G (1992): The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol* 128(1), 39-42

Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, Ding J, Li Y, Tejasvi T, Gudjonsson JE et al. (2012): Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet.* 44(12), 1341-8

van Blitterswijk WJ, Hilkmann H, Storme GA (1987): Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion. *Lipids* 22(11), 820-3

van der Luit AH, Budde M, Ruurs P, Verheij M, van Blitterswijk WJ (2002): Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem* 277(42), 39541-7

Verhaar AP, Wildenberg ME, te Velde AA, Meijer SL, Vos AC, Duijvestein M, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR (2013): Miltefosine suppresses inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(9), 1974-82

Villani AP, Rouzaud M, Sevrain M, Barnetche T, Paul C, Richard MA, Beylot-Barry M, Misery L, Joly P, Aractingi S, Aubin F et al. (2014): Symptoms dermatologists should look for in daily practice to improve detection of psoriatic arthritis in psoriasis patients: an expert group consensus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28 Suppl 5, 27-32

von Haefen C, Wendt J, Semini G, Sifringer M, Belka C, Radetzki S, Reutter W, Daniel PT, Danker K (2011): Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 16(6), 636-51

Wallbrecht K, Drick N, Hund AC, Schön MP (2011): Downregulation of endothelial adhesion molecules by dimethylfumarate, but not monomethylfumarate, and impairment of dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions. *Exp Dermatol* 20(12), 980-5

Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH (1998): Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187(2), 205-16

Weitz JE, Ritchlin CT (2014): Ustekinumab : targeting the IL-17 pathway to improve outcomes in psoriatic arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 14(4), 515-26

Wendling D, Prati C (2014): Paradoxical effects of anti-TNF- α agents in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 10(1), 159-69

Wieder T, Haase A, Geilen CC, Orfanos CE (1995): The effect of two synthetic phospholipids on cell proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. *Lipids* 30(5), 389-93

Wieder T, Reutter W, Orfanos CE, Geilen CC (1999): Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog Lipid Res* 38(3), 249-59

Wiese A, Wieder T, Mickleit M, Reinöhl S, Geilen CC, Seydel U, Reutter W (2000): Structure-dependent effects of glucose-containing analogs of platelet activating factor (PAF) on membrane integrity. *Biol Chem* 381(2), 135-44

Wohlrab J, Fiedler G, Gerdes S, Nast A, Philipp S, Radtke MA, Thaci D, Koenig W, Pfeiffer AF, Harter M et al. (2013): Recommendations for detection of individual risk for comorbidities in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res* 305(2), 91-8

Wu JJ, Poon KY, Channual JC, Shen AY (2012): Association between tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 148(11), 1244-50

Yan HX, Wang Y, Yang XN, Fu LX, Tang DM (2013): A new selective vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor ablates disease in a mouse model of psoriasis. *Mol Med Rep* 8(2), 434-8

Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF (2005): Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437(7057), 369-75

Zibert JR, Wallbrecht K, Schön M, Mir LM, Jacobsen GK, Trochon-Joseph V, Bouquet C, Villadsen LS, Cadossi R, Skov L et al. (2011): Halting angiogenesis by non-viral somatic gene therapy alleviates psoriasis and murine psoriasiform skin lesions. *J Clin Invest* 121(1), 410-21

7. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Forkel S*, Schön M*, Hildmann A, Claßen A, John SM, Danker K, Schön MP (2014): Inositolated platelet-activating factor (Ino-C2-PAF) modulates dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions and alleviates psoriasis-like skin inflammation in two complementary mouse models. *J Invest Dermatol* 134(10): 2510-20.[#]

*geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Michael Schön und Frau Prof. Margarete Schön aussprechen. Ihnen beiden ist es zu verdanken, dass ich dieses spannende Forschungsprojekt übernehmen und unter ihrer Betreuung durchführen konnte.

Meinen Dank möchte ich ebenfalls dem gesamten Team des wissenschaftlichen Labors der Arbeitsgruppe Schön aussprechen, welche mich alle stets unterstützt haben und mir sowohl mit Rat als auch Tat zur Seite standen. Ich möchte mich besonders bei Bianca Messerschmidt bedanken für die freundliche und geduldige Einführung in die experimentelle Laborarbeit und auch bei Karolin Zachmann für die äußerst kompetente Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Dr. Anike Lockmann, Dr. Katharina Amschler, Dr. Verena Lorenz, Anna-Carina Hund und Dr. Nadin Dewert für die vielen gemeinsamen schönen Stunden voller fachlicher Diskussionen und anregender Worte.