

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie

Universität zu Lübeck

Klinikdirektorin: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten

**Untersuchung der Wirkung von Endothelinrezeptor-
Antagonisten auf die Migration von
polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und
Tumorzelllinien**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Lucy Marie Kappes

aus Aachen

Lübeck 2022

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Ing. Antje Müller
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Frerker

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.11.2022

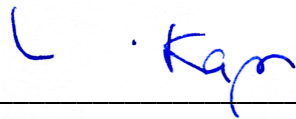
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Lucy Marie Kappes, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Textpassagen, die wörtlich oder sinngemäß auf Publikationen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Weder Teile noch die gesamte Arbeit habe ich an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Lübeck, den 14.03.2022



Lucy Marie Kappes

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	7
1.1	Die Endothelin-Achse: potente Vasokonstriktion und vieles mehr.....	7
1.1.1	Einführung zu Endothelinen, ihren Rezeptoren und ihre physiologische Rolle.....	7
1.1.2	Die Endothelin-Achse in verschiedenen Pathologien	10
1.1.3	Blockade der Endothelinrezeptoren als neue Therapieansätze	11
1.1.4	Systemische Sklerose: eine seltene, komplexe Kollagenose	14
1.1.5	Die Endothelin-Achse in der Pathogenese verschiedener Neoplasien	21
1.2	Zielsetzung.....	25
2	MATERIAL UND METHODENFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
2.1	Material.....	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Verbrauchsmaterial und Assays	28
2.1.3	Reagenzien.....	28
2.1.4	Antikörper.....	30
2.1.5	Software	30
2.1.6	Zelllinien	31
2.1.7	Zellkulturmedien.....	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Verwendete Zellen, Zellreihen und Kultivierung	31
2.2.2	Verwendete ETAR-Antagonisten	33
2.2.3	Messung der Expression von ETAR und ETBR bei humanen PMN, HL60- und Colo357-Zellen mittels Durchflusszytometrie	33
2.2.4	Einfluss von Sitaxentan und Ambrisentan auf Vitalität und Funktionalität von PMN und Colo357- Zellen	37
2.2.5	Messung der <i>in vitro</i> Migration humaner PMN und Tumorzelllinien unter Einfluss von ETAR- Antagonisten	42
2.2.6	Messung des Einflusses von Ambrisentan auf das Transkriptom von Colo357-Zellen	44
2.2.7	Statistik	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Expression der Endothelinrezeptoren Typ A und B	46
3.1.1	ETR-mRNA-Expression von Colo357-, MDA-MB-231-, OvCar3- und HL60-Zelllinien	46
3.1.2	Oberflächenexpression von ETR bei Colo357- und HL60-Zelllinien sowie PMN.....	47

3.2	Einfluss von Endothelinrezeptor-Antagonisten auf Vitalität und Funktionalität von PMN und Colo357-Zellen	55
3.2.1	Die Vitalität von Colo357-Zellen und humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten nicht gemindert	55
3.2.2	Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten nicht beeinflusst	57
3.2.3	Die Phagozytosekapazität von humanen PMN bleibt durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten unbeeinflusst	59
3.2.4	Die Behandlung von Colo357- und MDA-MB-231-Zellen mit Sitaxentan und Ambrisentan deuten auf proliferationshemmende Eigenschaften hin	60
3.3	Beeinflussung der <i>in vitro</i> Migration von humanen PMN und HL60 Zellen durch ETAR-Antagonisten.....	63
3.3.1	Die <i>in vitro</i> Migration von humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten dosisabhängig gehemmt.....	63
3.3.2	Die fMLP-stimulierte <i>in vitro</i> Migration von HL60-Zellen wird durch Behandlung mit Sitaxentan gehemmt	66
3.4	Migration im Krebsmodell unter dem Einfluss von ETAR-Antagonisten	68
3.4.1	Die <i>in vitro</i> Migration von Colo357-Zellen wird durch die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan gehemmt.....	68
3.4.2	Die <i>in vitro</i> Migration der OvCar3-Zellen wird durch Behandlung mit Sitaxentan gehemmt.....	70
3.5	Die Behandlung mit Ambrisentan inhibiert die Aktivierung des Transkriptoms von Colo357-Zellen	72
4	DISKUSSION	74
4.1	Humane PMN und Tumorzelllinien exprimieren ETAR und ETBR	74
4.1.1	Die Tumorzelllinien Colo357, HL60, OvCar3 und MDA-MB-231 exprimieren mRNA für ETAR und ETBR.....	75
4.1.2	Humane PMN sowie die Tumorzelllinien HL60 und Colo357 exprimieren die Endothelinrezeptoren Typ A und Typ B auf ihrer Oberfläche.....	76
4.2	Wie beeinflussen Sitaxentan und Ambrisentan Vitalität und Funktionalität von Immunzellen und Tumorzelllinien?.....	80
4.2.1	Unter den hier gewählten <i>in vitro</i> Zellkulturbedingungen zeigen die ETAR-Antagonisten keinen Einfluss auf die Vitalität von humanen PMN und Colo357	80
4.2.2	Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von humanen PMN wird unter den hier gewählten <i>in vitro</i> Zellkulturbedingungen nicht durch ETAR-Antagonisten verändert.....	82

4.2.3	Unter den hier gewählten <i>in vitro</i> Zellkulturbedingungen bleibt die Phagozytosekapazität von humanen PMN durch ETAR-Antagonisten unbeeinflusst	83
4.2.4	ETAR-Antagonisten wirken unter den hier gewählten <i>in vitro</i> Zellkulturbedingungen möglicherweise proliferationshemmend auf Tumorzelllinien.....	85
4.3	Die Migration von humanen PMN und HL60-Zellen wird durch ETAR-Antagonisten gehemmt....	87
4.4	Migration im Krebsmodell wird durch ETAR-Antagonisten gehemmt	90
4.4.1	Ambrisentan reduziert die Migrationskapazität von Colo357-Zellen	90
4.4.2	Sitaxentan reduziert die Migrationskapazität von OvCar3-Zellen	94
5	AUSBLICK: ETAR-ANTAGONISTEN, CHEMOTHERAPEUTIKA DER ZUKUNFT?	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
8	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE.....	114
9	ANHANG.....	115
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	115
9.2	Abbildungsverzeichnis	117
9.3	Tabellenverzeichnis.....	119
9.4	Ethikvotum	121
10	DANKSAGUNG	122
11	CURRICULUM VITAE.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

1 Einleitung und Fragestellung

Diese Arbeit beleuchtet die Rolle des Endothelinrezeptors Typ A (ETAR) und ausgewählter ETAR-Antagonisten im Hinblick auf die Modulation der Migration von Immun- und Tumorzellen anhand von *ex vivo* und *in vitro* Versuchen. Hauptsächlich wurden zwei verschiedene Aspekte betrachtet. Zum einen wurde die Beeinflussung der Migration humaner polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten durch ETAR-Antagonisten vor dem Hintergrund einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung, namentlich der Systemischen Sklerose, untersucht. Zum anderen wurde die Migration verschiedener Tumorzelllinien in Abhängigkeit von ETAR-Antagonisten analysiert, als potenziell neues, antineoplastisches Anwendungsgebiet dieser Medikamentengruppe.

1.1 Die Endothelin-Achse: potente Vasokonstriktion und vieles mehr

1.1.1 Einführung zu Endothelinen, ihren Rezeptoren und ihre physiologische Rolle

Die Gruppe der Endotheline umfasst drei einander ähnelnde Peptide Endothelin-1, -2 und -3 (ET-1, ET-2 und ET-3) (1), die jeweils 21 Aminosäuren umfassen. ET-1 stellt den Hauptvertreter dieser Gruppe dar, die erste Beschreibung des Polypeptids als „potenter (...) Vasokonstriktor“, sezerniert durch Endothelzellen, sowie die Aufklärung der Molekularstruktur erfolgte in den 80er Jahren an Koronararterien verschiedener Spezies (2,3). Die größte Quelle von ET-1 stellen Endothelzellen dar (4), zu einem geringeren Umfang produzieren jedoch auch Leukozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und diverse andere Gewebe ET-1 (5–8). Die Sekretion aus den Endothelzellen erfolgt abluminal direkt in Richtung der glatten Muskelzellen als physiologische Effektoren (9). ET-1 wird in Abhängigkeit verschiedener chemischer und physikalischer Reize wie Hypoxie, Kälteexposition, Scherkräfte, Angiotensin-II und Zytokinen freigesetzt (6,7,10). Gehemmt wird die Produktion und Freisetzung u. a. durch Stickstoffmonoxid (NO), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und atriales natriuretisches Peptid (ANP) (10). Nach feinregulierter Transkription des ET-1-Gens (EDN1) auf Chromosom 6 entsteht das aus 212 Aminosäuren (AS) bestehende pre-pro-ET-1. Dies wird enzymatisch in das 38 AS-lange big-ET-1 gespalten. Eine erneute enzymatische Spaltung durch das Endothelin-Converting Enzyme (ECE) liefert das biologisch aktive ET-1 (10,11).

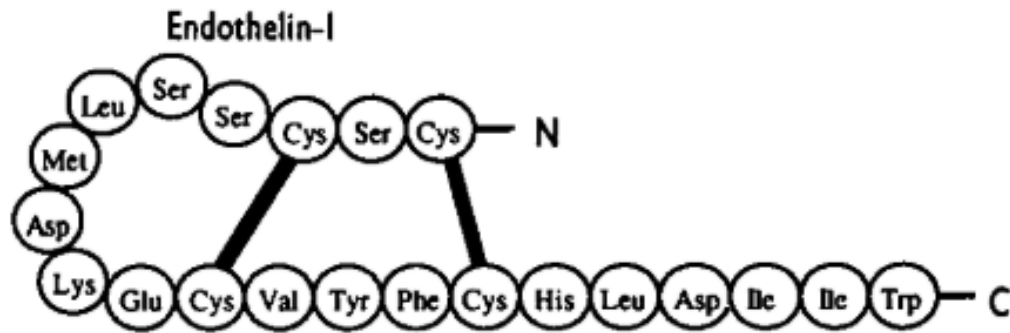


Abbildung 1: Aminosäuresequenz von Endothelin-1, adaptiert nach Haynes und Webb (10).

ET-1 wird über zwei verschiedene sekretorische Wege freigesetzt: der *constitutive secretory pathway* über fein regulierte Proteinbiosynthese und der *regulated secretory pathway* über kleinere intrazelluläre Speicher (4,8), obwohl es auch Stimmen gibt, die keine Speicherung von ET-1 sehen (9,10,12). Der Abbau erfolgt zum einen über Internalisierung aus der Blutbahn ins Gewebe insbesondere der Lunge, zum anderen wird ET-1 über die Niere ausgeschieden. Eine reduzierte Nierenfunktion führt dementsprechend zu erhöhten ET-1-Konzentrationen (7,10). Die Wirkung von ET-1 wird v. a. parakrin (4,6,7) entfaltet, passend dazu hat ET-1 eine kurze Halbwertszeit von ca. einer Minute sowie die niedrige und stark fluktuierende venöse Plasmakonzentration im pg/ml-Bereich (10).

Beim Menschen ist ET-1 – ETAR-vermittelt – der potenteste bekannte Vasokonstriktor mit langanhaltender Wirkung (10,13), dementsprechend ist seine Hauptfunktion die Kreislaufferhaltung durch Regulation des Blutdrucks in allen Organsystemen, erstmals beschrieben 1988 (3). Weiterführend ist die Endothelin-Achse (ET-Achse) am Wasser- und Salz-Haushalt beteiligt (7). Für ET-1 konnten neben der physiologischen vasokonstriktischen Wirkung mittel- und langfristig auch eine Beteiligung an Fibrose, Matrix-Remodelling, Gefäßhypertrophie und Zellproliferation sowie Entzündung nachgewiesen werden (12,14). Über den Endothelinrezeptor Typ B vermittelt ET-1 eine Vasodilatation über NO (4).

1.1.1.1 Endothelinrezeptor-Typ A: Aufbau und Signalkaskade, Lokalisation und Wirkung

Es gibt zwei Endothelinrezeptoren Typ A und B (ETAR, ETBR), die verschiedene, zum Teil gegensätzliche Wirkungen vermitteln, ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Gewebe aufweisen und eigene Affinitäten den Endothelinen gegenüber aufweisen (10), gelegentlich wird auch von einem dritten Endothelinrezeptor Typ C (ETCR), selektiv für ET-

3 berichtet (15). ETAR hat für ET-1 und -2 eine gleichermaßen hohe Affinität, niedriger für ET-3 (16). In dieser Studie steht der Endothelinrezeptor Typ A im Vordergrund, weshalb sich hier v. a. auf seine Charakterisierung konzentriert wurde. Die Hauptwirkungen von ETAR sind Vasokonstriktion, Zellproliferation und Beteiligung an Entzündungsreaktionen (17).

Bei ETAR handelt es sich um einen transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) der Klasse 1 (*Family A/rhodopsin-like*), mit einer Sequenz von 427 Aminosäuren in sieben transmembranären Domänen auf Chromosom 4 (18,19). Der Rezeptor wurde 1990 erstmals beschrieben (20). Abbildung 2 zeigt die Aminosäuresequenz des Rezeptors.

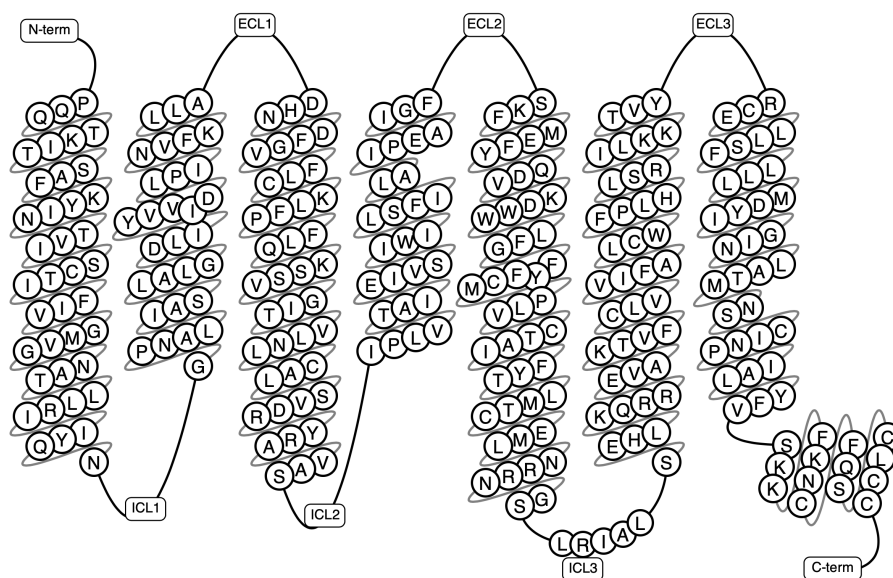


Abbildung 2: Aminosäuresequenz des Endothelinrezeptors Typ A. Schlangen-Diagramm erstellt auf https://gpcrd.b.org/protein/ednra_human/ am 21.10.2020, nach Pándy-Szekeres et al. (21).

Er ist unter anderem an das heterotrimere Gq/11-Protein gekoppelt (22,23). Eines der Effektormoleküle stellt die Phospholipase C dar, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) als löslichen *second messenger* und das membranständige Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP₃ aktiviert Ca²⁺-Kanäle im endoplasmatischen Retikulum und setzt so Ca²⁺ ins Cytosol frei (24). Ferner fungiert ETAR selbst als unselektiver Ca²⁺-Kanal, der einen zusätzlichen Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär erlaubt. Es kommt zur Kontraktion der glatten Muskulatur und folgenden Vasokonstriktion (14). DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC) sowie Proteintyrosinkinase, die den mitogenen Effekt von ET-1 vermitteln (9,25). In diesem Zusammenhang wurde bereits früh ein *crosstalk* von ETAR mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren suggeriert (25).

ETAR wird vor allem im kardiovaskulären System, genauer auf glatten Muskelzellen exprimiert (13,26,27). Des Weiteren ist ETAR auch im Herzen, Lungenparenchym, glatter Bronchusmuskulatur, submukösen Drüsen und Epithelzellen in hoher Dichte exprimiert, jedoch auch auf Immunzellen und in verschiedenen Neoplasien (28–31). Verschiedene Promotorregionen beeinflussen die Transkription in Abhängigkeit diverser Stimuli wie Hypoxie, Cyclosporin A, epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Östrogen, Angiotensin-II, *transforming growth factor* (TGF- β) und Endothelin selbst (9,30). Abbildung 3 stellt die ubiquitäre Expression von ETAR dar.

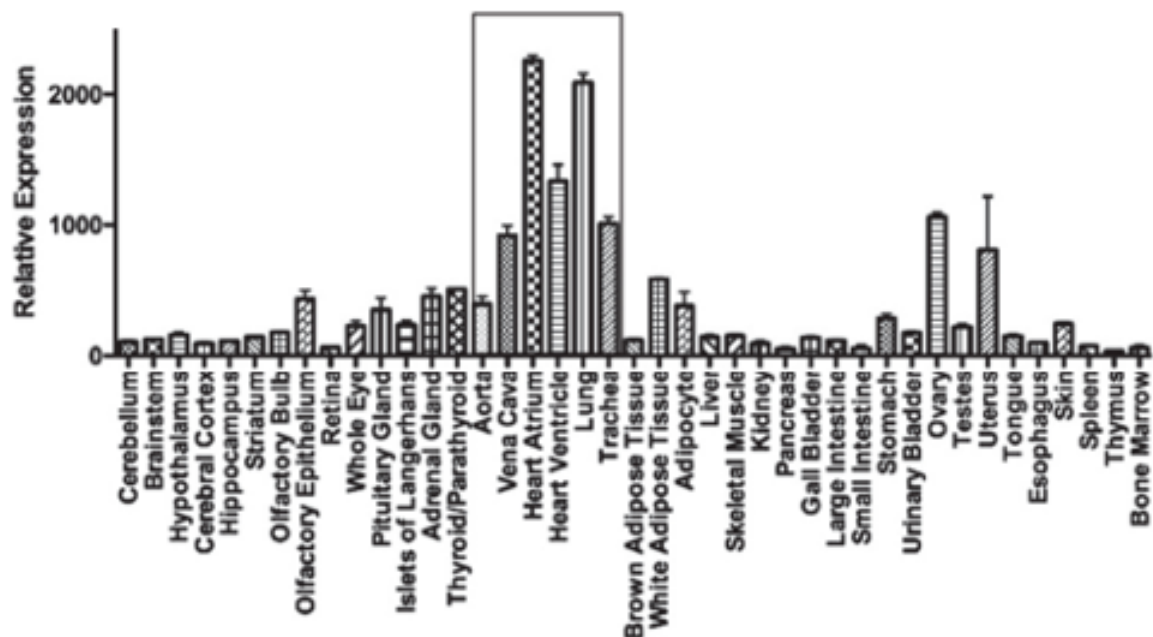


Abbildung 3: Lokalisationen des Endothelinrezeptors Typ A. ETAR ist v. a. im kardiovaskulären System vertreten: so auf der glatten Gefäßmuskulatur und insbesondere in Herz und Lunge exprimiert. Graphik adaptiert nach Davenport et al. (13) und Regard et al. (32).

1.1.2 Die Endothelin-Achse in verschiedenen Pathologien

Es lassen sich zahlreiche Pathologien beschreiben, in denen für ET-1 oder ETAR eine modulierende Wirkung auf die jeweiligen Erkrankungen bekannt ist: Bereits in der Embryonal- und Fetalperiode nimmt die ET-Achse eine fundamentale Funktion in der kraniofazialen und kardiovaskulären Entwicklung ein (33,34). Die Endothelin-Achse wurde im Rahmen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose, arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankung, akutem Myokardinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz beschrieben (17,24,35,36). Außerdem wird der ET-Achse eine pathophysiologische Rolle bei chronischer Nierenerkrankung, Subarachnoidalblutungen und Präeklampsie zugeschrieben (36–38). Auch bei verschiedenen rheumatologischen

Erkrankungen ist die ET-Achse von Bedeutung, wie z. B. bei Systemischer Sklerose (SSc), die in dieser Arbeit genauer behandelt wird, systemischem Lupus Erythematoses, Rheumatoide Arthritis und Takayasu Arteriitis (12). Darüber hinaus spielt die ET-Achse bei diversen Neoplasien im Progress dieser eine Rolle (30,39,40).

Besonders bekannt im Zusammenhang mit der pathologischen Rolle der ET-Achse ist die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) (41,42). Die PAH wird definiert durch einem mittleren pulmonal-arteriellem Druck von über 25 mmHg (43). Die Erkrankung hat verschiedene Ätiologien, darunter die im späteren näher beschriebene Systemische Sklerose (44). Pathophysiologische Charakteristika sind ET-1-vermittelte Hypertrophie der Lungenarteriolen, erhöhter Gefäßwiderstand u. a. durch erhöhte ET-Plasmaspiegel und schließlich Rechts-Herz-Versagen mit hoher Mortalität (17,45). Bei dieser Erkrankung kamen erstmals Endothelinrezeptor-Antagonisten zum Einsatz (16,46).

1.1.3 Blockade der Endothelinrezeptoren als neue Therapieansätze

Grundsätzlich werden selektive ETAR-Blocker wie Sitaxentan, Ambrisentan, Atrasentan, Zibotentan oder BQ-123 von selektiven ETBR-Blockern und unselektiven ETR-Antagonisten wie z. B. Bosentan oder Macitentan, die beide Rezeptortypen A und B blockieren, unterschieden (16,46–48). Da die Rezeptoraffinitäten der Antagonisten fließend sind, wurde als *cut-off* zwischen „selektiv“ und „unselektiv“ eine 100-fach höhere Affinität gegenüber einem der Rezeptoren definiert, um die Substanz als „selektiv“ zu kategorisieren (16).

Für den klinischen Gebrauch zugelassen sind die Medikamente Bosentan, Ambrisentan und Macitentan für die Behandlung von PAH, Bosentan auch in der Behandlung von digitalen Ulzera (16,46,49). In diesem Zusammenhang konnte für die Medikamente eine verbesserte physische Belastbarkeit der Patient*innen (verlängerte 6-Minuten-Gehstrecke) sowie eine subjektiv-verminderte Dyspnoe nachgewiesen werden (50–53).

Experimentell wurde die Medikamentengruppe als adjuvantes bzw. chemotherapeutisches Agens an verschiedenen Tumoren untersucht, im Zusammenhang mit diversen Nierenerkrankungen, zur Schmerzbehandlung sowie im Kontext weiterer Erkrankungen wie z. B. Systemische Sklerose und Vasospasmen nach Subarachnoidalblutungen, jedoch

bisher ohne ausreichende Evidenz für eine erfolgreiche Übernahme von ETR-Antagonisten in andere klinische Bereiche (46,54). ETR-Antagonisten wirken nachgewiesenermaßen u. a. vasokonstriktionshemmend, antiproliferativ (bisher nur *in vitro*) aber auch antiinflammatorisch und antimigratorisch (55–57).

Gemeinsame unerwünschte Arzneimittelwirkungen der ETR-Antagonisten (selektiv und unselektiv) sind Hepatotoxizität insbesondere bei Sitaxentan und Bosentan (58), Abfall des Hb-Werts (Anämie), Wasserretention, Teratogenität und verschiedene Arzneimittelinteraktionen (54,59). Einige davon lassen sich durch die vasodilatatorische Hauptwirkung erklären, andere sind auf die einzelnen Substanzen selbst zurückführen.

Theoretischer Vorteil selektiver ETAR-Antagonisten wie Ambrisentan ist, dass sie den vasokonstriktiven sowie zellproliferativen Effekt von ETAR antagonisieren, den vasodilatativen Effekt von ETBR sowie die Clearance über ETBR jedoch unbeeinflusst lassen (46,60). Gleichzeitig führt diese einseitige Blockade möglicherweise zu einer konsekutiven Dysbalance der Rezeptorexpression zwischen ETAR und ETBR (31). Auf die in dieser Studie verwendeten ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan soll nun näher eingegangen werden.

1.1.3.1 Ambrisentan

Ambrisentan (Volibris von GlaxoKlineSmith, Letairis von Gilead, LU-208075) ist ein FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) und EMA (*European Medicines Agency*) zugelassenes Medikament für die Behandlung von PAH mit hoher oraler Bioverfügbarkeit. 2007 bzw. 2008 wurde es nach zwei großen doppel-verblindeten, randomisierten, placebo-kontrollierten Studien (ARIES-1 und -2) auf den Markt gebracht (13,51,52). Ambrisentan hat eine, in humanem linken Ventrikel determinierte, Affinität (K_D) gegenüber ETAR von $0,28 \pm 0,23$ nM und gegenüber ETBR eine Affinität (K_D) von $0,25 \pm 0,05$ μ M (61). Für die Behandlung der PAH beträgt die zugelassene Dosis 5 bis 10 mg einmal täglich dank einer Halbwertszeit von 9 – 15 h (62). Chemisch handelt es sich um ein Diphenyl-Propionsäure-Derivat (63). Generell ist Ambrisentan ein gut verträgliches Medikament, das Nebenwirkungsprofil zeichnet sich durch periphere Ödeme und nasale Obstruktion (also v. a. vasodilatatorische Phänomene) aus, Hepatotoxizität wird im Gegensatz zu Bosentan oder Sitaxentan als geringer beschrieben (62). Ambrisentan wird hauptsächlich über hepatische Glucuronidierung und weniger über das Cytochrom P450 (CYP)-System (v. a.

CYP3A4) verstoffwechselt, sodass Medikamenteninteraktionen seltener sind (46,62,64). Mögliche Interaktionen treten jedoch mit Ciclosporin A, Ketokonazol oder Omeprazol auf (46). Ambrisentan zeigt weniger Selektivität für ETAR als Sitaxentan (13). Zudem wurde Ambrisentan in verschiedenen Tierversuchen und klinischen Studien außerhalb der PAH untersucht, genauer nach Transplantation von Leber bzw. Pankreas zur Vermeidung von Ischämien und bei Nieren- bzw. Herzinsuffizienz bisher jedoch ohne Erfolg für eine klinische Anwendung mit neuer Evidenz (63).

1.1.3.2 Sitaxentan

Der zweite selektive ETAR-Antagonist, der in dieser Studie untersucht wurde, ist Sitaxentan (auch Sitaxsentan, Thelin von Pfizer, TBC11251). 2009 wurde Sitaxentan für die PAH-Behandlung zugelassen und zeigte eine vielversprechende Verbesserung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks und der Belastbarkeit der Patient*innen. 2010 wurde es jedoch von Seiten des Herstellers vom Markt genommen weil es schwere, irreversible, z.T. letale akute Hepatitiden auslöste (60,65). Bis zu diesem Zeitpunkt war Sitaxentan ebenso ein FDA-zugelassenes Medikament für die Behandlung von PAH mit hoher oraler Bioverfügbarkeit (66). Die zugelassene Dosis betrug 100 mg einmal täglich (in Studien bis 500 mg zweimal tgl.) mit einer ungefähren Zieldosis von 4-6 mg/kg Körpergewicht (60,67). Sitaxentan hat eine in humanem linken Ventrikel determinierte Affinität (K_D) gegenüber ETAR von $1,65 \pm 0,80$ nM und gegenüber ETBR eine Affinität (K_D) von 327 ± 134 μ M (61). Sitaxentan wurde als Kontrollsubstanz zu Ambrisentan für diese Studie gewählt. Dies dient der Aufklärung darüber, ob die Beobachtungen substanzspezifisch oder ETAR-vermittelt sind, d. h. bei beiden Substanzen beobachtbar sind.

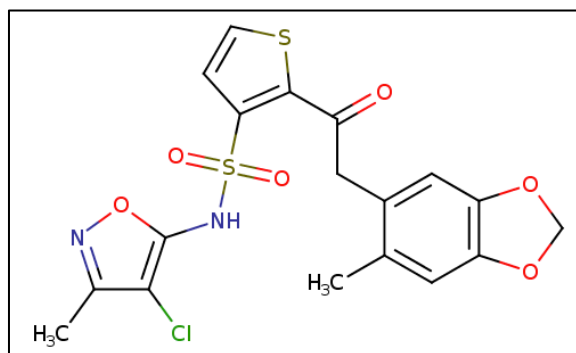


Abbildung 4: Strukturformel Sitaxentan, Quelle: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06268>, Tag des Zugriffs: 24.03.2020

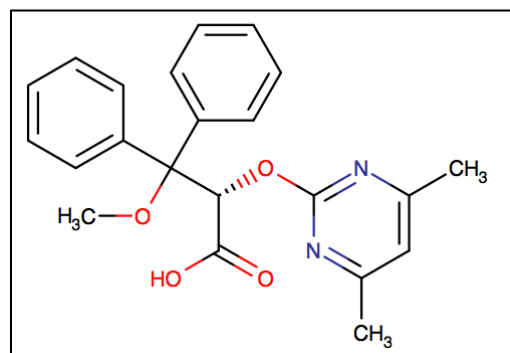


Abbildung 5: Strukturformel Ambrisentan, Quelle: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06403>, Tag des Zugriffs: 24.03.2020

Auf zwei der o. g. Pathologien soll in dieser Arbeit genauer eingegangen werden. Zum einen wird im Rahmen der Erkrankung systemische Sklerose Augenmerk auf Migrationseigenschaften von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMN) gelegt, zum anderen wird auf die Rolle von ETAR-vermittelter Migration im Rahmen verschiedener Neoplasien fokussiert. Im Folgenden soll kurz skizziert werden, dass der Endothelin-ETAR-Achse für beide Pathologien eine pathophysiologische Rolle zugeschrieben wird.

1.1.4 Systemische Sklerose: eine seltene, komplexe Kollagenose

Systemische Sklerose (SSc) ist eine komplexe Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis. Das mittlere Erkrankungsalter liegt ca. bei 45 Jahren, Frauen sind häufiger betroffen als Männer (68,69). Die Prävalenz in Europa wird auf ca. 300 Erkrankte pro Million Erwachsene geschätzt, die Inzidenz beträgt ca. 19 - 40 pro Million Erwachsene (70). Systemische Sklerose hat unter den rheumatischen Erkrankungen trotz therapeutischer Fortschritte die höchste Mortalität (69,71,72). Es besteht eine genetische Prädisposition für die Erkrankung, ebenso haben Umwelteinflüsse wie z. B. organische Chemikalien oder Pestizide einen Effekt auf Pathogenese und Verlauf der Erkrankung (68,71).

Die grundlegende Pathogenese der Erkrankung setzte sich aus drei Hauptsäulen zusammen: Vaskulopathie, Fibrose und Autoimmunität bzw. Entzündung. Zusammenfassend und verkürzt wird die sogenannte „*vascular hypothesis*“ so beschrieben: Die Vaskulopathie umfasst u. a. fibrotisches Remodelling der Intima und Adventitia sowie Vasospasmen, was zu Mikrozirkulationsstörungen führt (69,73,74). Betroffen sind v. a. digitale und pulmonale Arterien. Diese Gefäßdysfunktion führt zu Gewebsschäden durch Ischämie und konsekutiv ein dysregulierter Reparatursversuch der in fibrotischem Umbau des Bindegewebes endet (71). Getrieben wird dies u. a. durch den Übergang von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch profibrotische Faktoren wie *transforming growth factor* β (TGF- β) (68). Beide Teile des Immunsystems spielen eine fundamentale Rolle in der Pathogenese der Systemischen Sklerose. Die Rolle des angeborenen Immunsystems wird beispielsweise durch Infiltration von Immunzellen in Hautbiopsien von SSc-Patient*innen unter Mitbeteiligung von u. a. Monozyten und Neutrophilen deutlich (69). Der Nachweis von diversen antinukleären Autoantikörpern (ANA) zeigte die Rolle des adaptiven Immunsystems (69,70).

Typische Symptome der SSc umfassen das Raynaud-Phänomen und Teleangiektasien als Gefäßmanifestation, digitale Ulzera oder Pits im Rahmen von ischämischen Prozessen und Hautverdickungen an den Fingern als Zeichen der Fibrose und Calcinosis cutis. Pulmonale Manifestationen wie pulmonal-arterielle Hypertonie oder interstitielle Lungenveränderungen im Sinne einer Fibrose stellen die Haupttodesursache dar (69). Aber auch kardiovaskuläre, renale, gastrointestinale und muskuloskeletale Beschwerden gehören zur Symptomatik (68,72). Grundlegend werden zwei Verlaufsformen anhand der Hautbeteiligung unterschieden: eine diffus-kutane Form mit proximaler Hautbeteiligung und eine limitiert-kutane Form mit distaler Hautbeteiligung (71). Beide Verlaufsformen zeigen Autoantikörper-Verteilungsmuster mit Schwerpunkten und weitere klinische Charakteristika über die Hautbeteiligung hinaus. Die Diagnosestellung erfolgt in Zusammenschau der klinischen Befunde sowie durch den Nachweis der o. g. Antikörper und/oder Kapillarmikroskopie der Nagelpfalz (68) in Abgleich mit den European League Against Rheumatism (EULAR) – Kriterien von 2013 und American College of Rheumatology (ACR) - Klassifikationskriterien (71,75). Mögliche Therapeutika umfassen diverse Immunsuppressiva wie Kortikosteroide, Methotrexat oder Cyclophosphamid. Zur Behandlung von pulmonal-arterieller Hypertonie werden Endothelinrezeptor-Antagonisten wie Ambrisentan oder Bosentan eingesetzt (68). ACE-Inhibitoren konnten die Mortalität der renalen Krisen bei Systemischer Sklerose reduzieren (72).

1.1.4.1 Endothelin-1, Endothelinrezeptor Typ A und spezifische Autoantikörper tragen zur Pathogenese von SSc bei

Die Endothelin-Achse trägt entscheidend zu Prozessen wie Entzündung und Hypernozeption, Autoimmunität und anderen immunvermittelten Phänomenen z. B. im Rahmen von Sepsis bei (14,17,76). ET-1 kann über ETAR oxidativen Stress induzieren (77) und die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-2 oder IL-6 initiieren, antagonisierbar durch ETAR-Blockade (41,78). Eine TNF- α -Produktion in Monozyten und Makrophagen wird stimuliert, die dann zur Chemotaxis von PMN führt und diese zur Phagozytose stimuliert (78).

Bei SSc-Patient*innen wurde schon früh beobachtet, dass ET-1-Serumlevel in verschiedensten Organsystemen signifikant höher waren als bei gesunden Kontrollen (79–

83). Diese Beobachtung passt auch dazu, dass Patient*innen mit diffuser SSc höhere ET-1-Serumspiegel als Patient*innen mit limitierter SSc aufweisen (84,85). Diese erhöhten ET-1-Spiegel korrelieren mit klinischen Parametern wie der Anzahl digitaler Ulzera, der Diffusionskapazität der Lunge, der Schwere des Gefäßschadens oder Fibrose der Haut (31,81,84). Doch nicht nur der ET-1-Spiegel ist bei SSc-Patient*innen auffällig, auch anti-ETAR-AK als funktionale Autoantikörper (Auto-AK) sind an der Pathogenese von SSc beteiligt (72,86).

Konkret spielt ET-1 eine Rolle in der Entstehung des Raynaud-Syndroms über Vermittlung von Vasokonstriktion und korreliert mit dem Ausmaß an Fibrose (31,85). ET-1 wirkt auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten mitogen, fibrogen durch Steigerung der Kollagensynthese und aktiviert Genexpression, z. B. vom intrazellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 über NF- κ B (s. u.) (80,83,84). Eine gesteigerte ET-1-Konzentration führt zum vermehrten Remodeling der extrazellulären Matrix und Fibrose (83). Zudem beeinflusst ET-1 die Expression des Moleküls ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1) und vermittelt hierüber eine vermehrte Interaktion mit T-Zellen was wiederum zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion führt (83). Eine signifikante Reduktion proinflammatorischer Zytokine bei SSc-Patient*innen konnte unter unselektiver ETR-Blockade nachgewiesen werden (78). Somit ist die ET-Achse am Prozess der Vaskulopathie, Fibrose und Entzündung, allen Hauptsäulen der SSc-Pathogenese, beteiligt. Inwiefern speziell die Blockade von ETAR die PMN-Migration als Teil der Entzündung beeinflusst, ist ein Schwerpunkt dieser Arbeit.

1.1.4.1.1 Auto-AK bei der SSc induzieren Migration von Immunzellen

Verschiedene Auto-Antikörper spielen in der Pathogenese von SSc eine Rolle, so wurden signifikant erhöhte Serumlevel funktioneller, d. h. agonistischer anti-ETAR-Antikörper bei SSc-Patient*innen gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen. Diese Autoantikörper von SSc-Patient*innen regen PMN zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) an und tragen so zum Prozess der Entzündung bei (87). Eine Bindung zwischen ETAR und anti-ETAR-AK bewirkt eine spezifische Phosphorylierung von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) sowie die Transkription des profibrotischen TGF- β (72).

Klinisch konnte eine Korrelation der Höhe der o. g. Auto-AK-Titer mit dem Vorliegen bestimmter klinischer Parameter wie pulmonale-arterieller Hypertonie oder Lungenfibrose sowie der Wahrscheinlichkeit an SSc-Komplikationen zu versterben gezeigt werden (72). Unter verschiedenen Formen von PAH waren bei PAH von SSc-Patient*innen die höchsten Titer von anti-ETAR-AK zu finden, sie könnten als prädiktive und prognostische Marker für die Entwicklung einer PAH und deren Mortalität genutzt werden (88). Außerdem wurde für sie eine pathogenetische Rolle in der Entwicklung von PAH bei SSc-Patient*innen nachgewiesen (88). Zusammenfassend weisen viele verschiedene Punkte darauf hin, dass Auto-AK von SSc-Patient*innen und hier insbesondere anti-ETAR-AK eine Rolle in der Pathogenese von Systemischer Sklerose spielen. Im Hinblick auf diese pathogenetische Rolle sollte auch der Einsatz von ETAR-Antagonisten kritisch überdacht werden, die bisher eher bei spät-auftretenden Krankheitsmanifestationen eingesetzt werden. Ein früherer Einsatz dieser Medikamentengruppe könnte die pathogenetische Rolle der anti-ETAR-AK reduzieren (89).

Für T-Zellen konnte bereits ein promigratorischer, durch ETAR-Blockade hemmbarer Effekt von anti-ETAR-Antikörpern gezeigt werden (90). In dieser Studie soll in Anlehnung daran ein antimigratorischer Effekt von ETAR-Antagonisten bei PMN nachgewiesen werden. Verschiedene Punkte gaben bereits Hinweise auf eine mögliche Rolle der ET-Achse für die PMN-Migration. So sezernierten Endothelzellen und Monozyten signifikant mehr IL-8 in Anwesenheit von Auto-AK von SSc-Patient*innen (90). Als proinflammatorisches Zytokin lockt IL-8 *in vitro* und *in vivo* Immunzellen wie PMN an und induziert deren Migration (87,91). Das Ausmaß der PMN-Migration korrelierte dabei mit den anti-ETAR-AK Titern der SSc-Patient*innen (87). Auch *in vivo* induzierten SSc-Auto-AK PMN-Migration, da eine erhöhte Neutrophilen-Zahl nach Injektion mit SSc-Auto-AK in BAL-Flüssigkeit nachgewiesen wurde (87).

Im Vorfeld dieser Studie wurde von Otavio Cabral-Marques eine *gene ontology*-Analyse hinsichtlich verschiedener Ziel-GPCR von Auto-AK durchgeführt (92). Diverse Interaktionen zwischen GPCR und Wachstumsfaktoren wurden durch diese Analyse beschrieben, zentral steht die Rolle von ETAR für die Regulation von Migration in diesem Netzwerk (Abbildung 6).

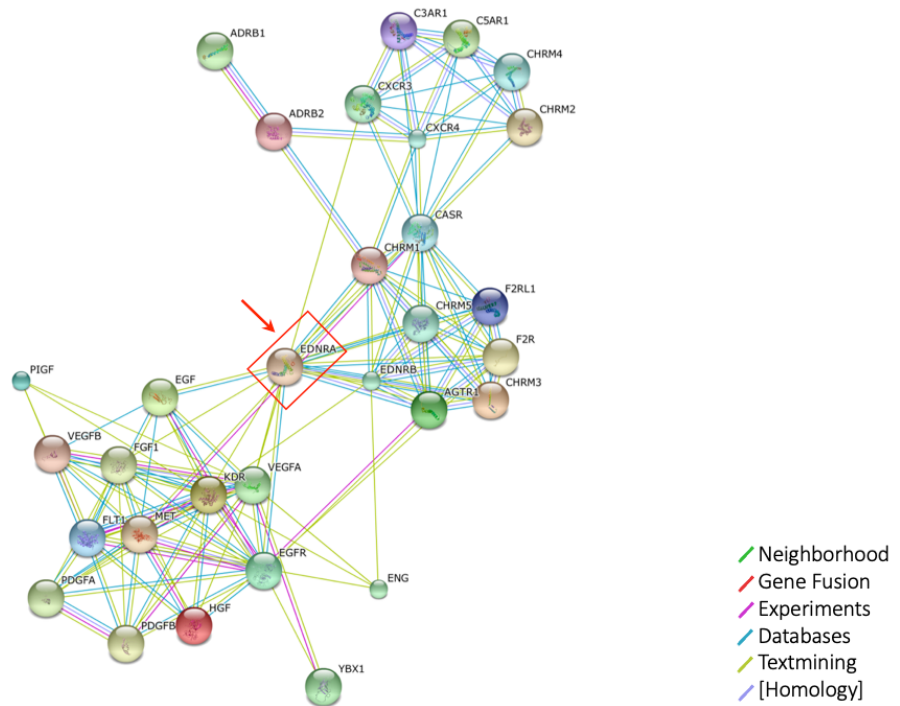


Abbildung 6: Netzwerk-Analyse zur Identifizierung von Zielmolekülen für Autoantikörper. Netzwerk aus GPCR, Wachstumsfaktoren und anderen Signalmolekülen, die jeweils Ziele für Autoantikörper darstellen, basierend auf der STRING-Datenbank. Zentral ist die Rolle von ETAR (EDNRA) in diesem Netzwerk (roter Pfeil). Verschiedene Farben zeigen verschiedene Evidenz für Beziehung zwischen Molekülen an: grün: Interaktion durch Nachbarschaft wahrscheinlich; rot: Beziehung durch Genfusion wahrscheinlich; violett: Interaktion wahrscheinlich basierend auf experimentellen Daten; hellblau: Interaktion wahrscheinlich basierend auf Datenbankinformationen; gelb: Interaktion wahrscheinlich durch text mining Analyse; blau: Interaktion durch gemeinsames Auftreten wahrscheinlich (92).

Dieses Ergebnis in Kombination mit der o. g. Literatur und einer gene ontology-Analyse führte zur Hypothese, dass die ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan die Migration von PMN im Kontext der SSc hemmen können.

1.1.4.2 Die Rolle von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese von Systemischer Sklerose

Die Gruppe der polymorphkernigen Granulozyten umfasst neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Gemessen an allen Leukozyten machen Granulozyten bis zu 80 % der Zellen aus (93). Aus der Gruppe der Granulozyten bilden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) die stärkste Fraktion mit ca. 93 – 98 % (94). Die in dieser Studie vorliegenden Ergebnisse bezüglich Granulozyten beziehen sich zum größten Teil auf das Zellkompartiment der Neutrophilen, daher wird diese Zellgruppe nun detaillierter beleuchtet.

Neutrophile bilden einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems und finden sich mit als erste Zellentität am Ort des Infektionsgeschehens (93). Sie zirkulieren v. a. im Blut und werden, wenn notwendig, in entzündetes Gewebe rekrutiert. Die primäre Aufgabe neutrophiler Granulozyten zur Bekämpfung von Pathogenen ist die Phagozytose beispielsweise bakterieller Bestandteile, die dann in intrazellulären Vesikeln über reaktive Sauerstoffspezies oder antibakterielle Proteine eliminiert werden. Sobald PMN aus der Blutbahn emigriert sind, ist Migration unerlässlich. Dies geschieht u. a. in Abhängigkeit von einer Hierarchie chemotaktischer Moleküle zu der z. B. das bakterielle N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) gehört (93). Migration bei PMN wird u. a. über die Phosphatidylinositol-3-Kinase und über die *p38-Mitogen-Activated-Protein-Kinase* (p38-MAP-Kinase) vermittelt (93,95,96).

Die Auto-Antikörper von SSc-Patient*innen, darunter anti-ETAR-AK, stimulieren Neutrophile zur Produktion von ROS sowie zu gesteigerter Migration (87). Darüber hinaus produzieren stimulierte Neutrophile von SSc-Patient*innen ROS in höherem Maße als gesunde Kontrollen (97). Die reaktiven Sauerstoffspezies tragen zur Fibrose und dem Gefäßschaden in Pathophysiologie der SSc bei (97,98). Wie oben beschrieben sind u. a. Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen die zentralen Zellen in der Pathogenese der SSc. Man nimmt jedoch an, dass auch PMN eine wichtige, wenn auch weniger bedeutende Rolle bei der SSc spielen. Auch darüber hinaus haben Neutrophile Endothelin-vermittelt eine proinflammatorische Wirkung. Die Expression von ETAR und ET-1 konnte auf PMN aus entzündlichem Gewebe wie auch an isolierten PMN aus Vollblut durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden (31,82,92,99–101). Die Inkubation von PMN mit ET-1 initiiert die Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine wie IL-8, TNF- α und Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) (31). Durch ETAR-Blockade konnte wiederum die Sekretion verschiedener Chemokine wie TNF- α , CXCL1 und IL-6 signifikant gehemmt werden (92,102,103). Außerdem bekannt ist bereits, dass eine Stimulation mit ET-1 (aber auch fMLP oder LPS) Migration von PMN und anderen Zellen induziert (104,105). Diese, durch verschiedene Stimuli induzierte Migration konnte durch diverse selektive ETAR-Antagonisten inhibiert werden (76,103–105). Welche Rolle die ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan dabei spielen ist noch ungeklärt. Eine Hemmung der Proteinkinase A (PKA) konnte die ET-1-induzierte Migration von PMN sowie fMLP-induzierte Migration von HL60-Zellen und PMN inhibieren (104). Es scheint also, dass auch

die PKA, nicht nur die oben beschriebene PKC eine wichtige Rolle in der entsprechenden Signalkaskade spielt (104). Die HL60-Zelllinie dient in dieser Arbeit als Kontrolle und Validierung für Migrationsergebnisse der humanen PMN, sie gilt als anerkanntes Modell für Neutrophilenmigration (106).

Zusammenfassend geht daraus hervor, dass die ET-Achse eine essenzielle Rolle in der Migration von PMN innehat. Nicht geprüft wurde jedoch bis dato, ob auch oral-verfügbare und im Falle von Ambrisentan FDA-zugelassene Medikamente eine PMN-Migration unterbinden können. Bereits jetzt sind Medikamente, die Neutrophilen-Migration inhibieren, Fokus intensiver Forschung. Überschießende Neutrophilen-Infiltration kann schwere Gewebeschäden mit sich bringen, wie bereits für Rheumatoide Arthritis, pulmonale Fibrose oder Multiorganversagen gezeigt (107). Auf der anderen Seite gilt es hier möglichst gezielt diesen spezifischen Aspekt zu beeinflussen, um eine Immunschwächung des Patienten gegen andere Pathogene z. B. in Form einer systemischen Immunsuppression zu vermeiden. Zu untersuchen bleibt ein potenziell migrationsinhibierender Effekt von Ambrisentan und Sitaxentan, der das Anwendungsspektrum um eine antiinflammatorische Wirkung dieser Medikamentengruppe erweitern würde.

1.1.4.2.1 ETAR/ETBR-Expressionsratio: Prädiktor für den klinischen Verlauf bei der SSc?

Um die Rolle von PMN bei SSc-Patient*innen vor dem klinischem Hintergrund zu beleuchten, wurde in dieser Studie zusätzlich ein Augenmerk auf das Verhältnis von ETAR zu ETBR auf CD15⁺ Granulozyten gelegt. Eine veränderte ETAR/ETBR-Expressionsratio konnte bereits bei PAH-Patient*innen sowie im PAH-Tiermodell nachgewiesen werden (108). Auch in fibrotischen Lungen von SSc-Patient*innen wurde eine erhöhte ETBR-Expression und reduzierte ETAR-Expression, also ein verändertes Verhältnis der Rezeptoren zueinander gemessen (82). Die absolute Rezeptordichte von ETAR bzw. ETBR auf PMN im Vergleich von Systemische Sklerose-Patient*innen zu gesunden Kontrollen zeigte bisher keinen signifikanten Unterschied. Jedoch ist ein Unterschied in der Expressionsratio von ETAR zu ETBR wie bereits oben beschrieben denkbar, da die ETAR-Expression einen höheren, die ETBR-Expression insgesamt einen niedrigeren Mittelwert aufwies (31). Aus diesem Grund wird die ETAR/ETBR-Expressionsratio in dieser Arbeit

genauer untersucht werden, um zur weiteren Aufklärung der ET-Achse bei PMN im Rahmen der systemischen Sklerose beizutragen.

1.1.5 Die Endothelin-Achse in der Pathogenese verschiedener Neoplasien

Der Endothelin-Achse wurde bei verschiedensten Neoplasien eine Bedeutung beigemessen, unter anderem dem Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und Mammakarzinom, aber auch dem Prostatakarzinom u. v. m. (17,109,110). Die Tumoren können anhand ihrer Rezeptorverteilung in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Pankreas- und Mammakarzinome exprimieren vornehmlich ETAR, Ovarialkarzinome exprimieren ETAR und ETBR gleichermaßen (111). Diverse Mechanismen, die in der Karzinogenese eine Rolle spielen wie Zellproliferation, Migration und Metastasendissemination, Apoptoseinhibition, Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT), Angiogenese und Invasion sind direkt oder indirekt ET-1 vermittelt (46,109,112). ET-1 stammt bei Tumoren vornehmlich parakrin aus den tumorassoziierten Endothelzellen, kann jedoch auch autokrin von Tumorzellen selbst sezerniert werden (54). Eine Überexpression der ET-Achse kann darüber hinaus auch über Dysregulation der Rezeptoren oder das Ausbleiben hemmender Einflüsse entstehen (30). ETAR-Überexpression korreliert z. B. mit Aggressivität von Tumoren und der Anzahl an Fernmetastasen (111). Bei Aktivierung der ET-1-Signalkaskade werden über *crossstalk* diverse andere Signalkaskaden aktiviert, u. a. die *mitogen-activated* Proteinkinase (MAPK), PI3K-AKT, NF- κ B, β -catenin, HIF1 α , Phospholipasen, der *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR), der *vascular endothelial growth factor* Rezeptor 3 (VEGFR 3), PKA und PKC 1 (30,40).

Apoptose, Zellproliferation und Migration im Zusammenhang mit den o. g. ETAR-Antagonisten werden in dieser Arbeit genauer untersucht. Ovarialkarzinome zeigen ET-1-abhängig eine apoptosehemmende Wirkung nach Paclitaxelgabe, die durch BQ-123 aufgehoben wurde (30,40). Diese Beobachtung konnte für verschiedene Tumoren *in vivo* und *in vitro* auch für andere selektive und nicht-selektive ETAR-Antagonisten demonstriert werden, noch nicht jedoch für Sitaxentan oder Ambrisentan (30). Um Apoptose selber zu induzieren, muss die Konzentration von ETAR-Antagonisten jedoch deutlich höher sein als im kardiovaskulären Anwendungsgebiet, sodass dies möglicherweise eine Anwendungs- und Therapielimitation darstellen wird (46). Zellproliferation wird durch die ETAR-

Antagonisten Zibotentan und Atrasentan in verschiedenen Tumorzelllinien, so auch Ovarialkarzinomzellen gehemmt (30). Für Ovarialkarzinomzellen und Melanomzellen konnte eine Migrationsinduktion durch ET-1 über eine veränderte Integrinexpression und veränderte Interaktion mit der Extrazellulären Matrix gezeigt werden (30). Darüber hinaus kann ET-1 Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte beeinflussen, was ebenfalls zum erleichterten Herauslösen maligner Zellen aus einem Zellverband und somit Tumorprogression führt (30). Auch in Mammakarzinom-Zelllinien konnte BQ-123 Migration nach Stimulation durch ET-1 und Lactoferrin hemmen. Die ET-1-Achse aktiviert zwei verschiedenen Proteinase-Systeme, die für Metastasierung von Tumoren relevant sind: Matrix-Metalloproteasen und einen Plasminogenaktivator von Urokinase-Typ, was für eine rasche Degradierung der extrazellulären Matrix und somit erleichterte Invasivität und Dissemination der Tumorzellen sorgt (30).

Klinische Studien mit ETAR-Antagonisten untersuchten u. a. das therapieresistente Prostatakarzinom und Ovarialkarzinom (46). Es standen v. a. Zibotentan und Atrasentan als potenziell antineoplastische, selektive ETAR-Antagonisten im Vordergrund (30). Bisher konnten die Ergebnisse jedoch keinen Vorteil für die Patient*innen darlegen. Als hochselektiver ETAR-Antagonist wurde beispielsweise Zibotentan in einer Phase-III-Studie zur Behandlung von Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms untersucht, eine Verbesserung der Überlebensrate blieb jedoch aus (13). Eine mögliche Ursache hierfür kann eine – im Krankheitsverlauf – zu späte Medikamentengabe darstellen (30), da die ET-Achse eine essenzielle zeitliche Rolle im Prozess der Metastasierung inne hat: So kann die ETAR-Blockade möglicherweise Metastasen im Sinne einer Kolonialisierung verhindern, nicht jedoch bereits klinisch manifeste Metastasen beeinflussen (113). Für Ambrisentan wurde eine verlangsamende Wirkung auf das Wachstum von Metastasen suggeriert (114), es wurde sogar als adjuvante Therapie zu Cisplatin oder Paclitaxel vorgeschlagen (114). Erneut sollte hier eine einseitige Blockade von ETAR mit Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung ETBR kritisch evaluiert werden, ETBR wiederum spielt ebenso eine tumorfördernde Rolle über Angiogenese und einen Einfluss auf das *microenvironment* des Tumors (30).

Diese Studie soll dazu beitragen, eine potenziell-therapeutische Rolle der bereits bekannten ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan zur Behandlung von Neoplasien, genauer Ovarial-, Pankreas- und Mammakarzinom aufzuklären. Im Folgenden

werden die zugehörigen Karzinome kurz dargestellt und die wichtigsten Zusammenhänge zur ET-1-Achse beschrieben. Ist im Folgenden die Rede von ETAR-Antagonisten handelt es sich nicht um Sitaxentan oder Ambrisentan, wurden diese Substanzen verwendet, sind die namentlich genannt.

1.1.5.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein aggressives Tumorleiden, die Inzidenz in Deutschland liegt bei ca. 18.000/Jahr mit steigender Tendenz. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 9 % sehr schlecht (115). Somit ist gerade für das Pankreaskarzinom das Aufdecken neuer Therapieoptionen von hoher Priorität. Eine kurative Therapie ist bisher nur operativ möglich, jedoch risikoreich und aufgrund der häufig späten Diagnose oft nicht mehr als R0-Resektion möglich (116). Palliativ können Radio- und/oder Chemotherapie (in erster Linie Gemcitabin) eingesetzt werden, die wenige Monate Überlebensvorteil bieten (116).

Verschiedene Pankreas-Tumorzelllinien sowie humane Pankreasadenokarzinomproben produzieren ET-1 (29,39). Für verschiedene, ETAR-positive Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte eine Inhibition von ETAR eine verminderte Zellproliferation bewirken, z. T. synergistisch mit Gemcitabin (110,117). Auch Angiogenese konnte durch ETAR-Blocker gehemmt werden und in Kombination mit Gemcitabin Apoptose induziert werden (110,117). Unter Behandlung mit Gemcitabin, wurde eine dosisabhängige Hochregulierung sowohl von ET-1 als auch ETAR nachgewiesen (117). Im Tierversuch konnte unter ETAR-Antagonisten ein reduziertes Tumolvolumen sowie weniger Metastasen beobachtet werden (110). Klinisch ergab sich der Nachweis einer niedrigeren Überlebensrate, also schlechterer Prognose beim Vorliegen einer Überexpression von ETAR (117).

1.1.5.2 Das Ovarialkarzinom

Ovarialkarzinome machen ca. ein Drittel der malignen Neoplasien des weiblichen Genitale aus, die Inzidenz für das Ovarialkarzinom liegt bei v. a. 7.000/Jahr in Deutschland mit rückläufiger Tendenz (115). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei ca. 43 %, u. a., weil auch hier eine Diagnose häufig in fortgeschrittenem Stadium (76 % in Stad. III/IV) erfolgt (115). Die Therapie erfolgt Stadien-abhängig. Eine radikale Operation steht im Vordergrund, dann folgt ggf. Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel (118). Bezüglich der Endothelin-Achse ist das Ovarialkarzinom eins der detailliert-erforschtesten Tumore.

Ovarialkarzinom-Zelllinien exprimieren ET-1 sowie ETAR (119). Übergeordnet wurde die Endothelin-Achse im Zusammenhang mit Metastasen, Chemotherapie-Resistenz und einem höherem Tumorgrad beim Ovarialkarzinom beschrieben (30). Die Endothelin-Achse aktiviert über Proteasen eine gesteigerte Invasivität und Metastasierung. Eine Überexpression der ET-Achse bewirkt außerdem eine gesteigerte Migration (40). Auch Angiogenese, Apoptoseinhibition und Zellproliferation können ET-1 vermittelt sein (120). Durch Blockade von ETAR konnte Migration bei Ovarialkarzinom-Zelllinien signifikant gehemmt werden, Apoptose induziert werden und Zellproliferation bzw. Tumorstadium in Ovarialtumor-Zelllinien sowie im Mausmodell gehemmt werden (40,111,114). Darüber hinaus spielt ET-1 eine entscheidende Rolle in Initiation und Vermittlung von Epithelial-Mesenchymal-Transition bei epithelialen Ovarialkarzinomen (114,120).

1.1.5.3 Das Mammakarzinom

Rund ein Drittel aller malignen Neuerkrankungen bei Frauen sind auf das Mammakarzinom zurückzuführen. Mit einer Inzidenz von knapp 70.000/Jahr ist das Mammakarzinom die häufigste maligne Neuerkrankungen und häufigste Tumorlokalisation aller Krebssterbefälle bei Frauen in Deutschland (115). Die Therapie basiert auf Operation, Chemotherapie, endokriner Therapie, Antikörper-Gabe und Radiatio. Chemotherapeutisch kommen u. a. Anthrazykline, Taxane und Platin-Derivate infrage. Endokrin sind Aromatasehemmer und Tamoxifen zugelassen (121).

Auch verschiedene Mammakarzinomzellen produzieren ET-1 (39). Die Invasivität und Aggressivität von Brustkrebs-Zelllinien wird durch Hypoxie über ET-1 erhöht. Antagonisiert werden, konnte dieser Effekt durch einen selektiven ETAR-Inhibitor (122). Zudem ist die ETAR-Expression ein Prädiktor für schlechtes Chemotherapie-Ansprechen beim Mammakarzinom (122). Im Mausmodell wurden das Tumorstadium des Mammakarzinoms signifikant durch eine ETAR-Blockade reduziert (111,123). Um diesen Effekt weiter zu beleuchten, wurde in dieser Studie die Proliferation einer Mammakarzinom-Zelllinie unter ETAR-Antagonisten näher untersucht. In Kombination mit antihormoneller Therapie konnte durch Blockierung von ETAR eine signifikant höhere Reduktion der Migration erreicht werden (123) als durch die etablierten endokrinen Therapeutika allein. Klinisch sind sowohl ein reduziertes Überleben der Patientinnen als auch eine erhöhte Rate an Knochenmetastasen mit der Endothelin-Achse assoziiert (30).

1.2 Zielsetzung

Die Hypothese der Relevanz von ETAR für die zelluläre Migration begründet sich auf einer von unserer Arbeitsgruppe 2018 publizierten Netzwerk- und *gene ontology*-Analyse, basierend auf der STRING-Datenbank, zur Identifizierung von Zielmolekülen für Autoantikörper. Diese Analysen zeigen ETAR als zentralen Mediator in einem Netzwerk von anderen GPCR sowie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren und identifizieren in diesem Zusammenhang die Regulation von zellulärer Migration durch die genannten Moleküle als wichtigen Mechanismus (siehe Abbildung 6). Deshalb wird angenommen, dass die ETAR- Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan die Migration von humanen PMN bzw. HL60 als PMN-Surrogat im Kontext einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung (systemische Sklerose, SSc) sowie die Migration der Tumorzelllinien Colo357, OvCar3 und MDA-MB-231 im Kontext von Pankreas-, Ovarial-, und Mammakarzinomen hemmen können. Dazu wurden verschiedene *ex vivo* und *in vitro* Versuche mit humanen PMN, gewonnen von gesunden Spender*innen und Patient*innen mit SSc, sowie mit den Tumorzelllinien HL60, Colo357, OvCar3 und MDA-MB-231 durchgeführt.

Im Detail werden folgende Fragen adressiert:

1. Exprimieren humane PMN, gewonnen von Gesunden und Patient*innen mit SSc, sowie die Tumorzelllinien HL60, Colo357, OvCar3 und MDA-MB-231 ETAR und ETBR?
2. Werden unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Vitalität (Nekrose, Apoptose) und andere Funktionen von humanen PMN Gesunder (Phagozytosekapazität, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies) durch die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan beeinflusst?
3. Moduliert unter den gewählten Zellkulturbedingungen die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan die Migration von humanen PMN im Vergleich mit HL60-Zellen?

4. Verändert unter den gewählten Zellkulturbedingungen die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan die Vitalität (Nekrose, Apoptose) und die Proliferation der Tumorzelllinien Colo357 und MDA-MB231?
5. Verändert unter den gewählten Zellkulturbedingungen die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan die Migration der Tumorzelllinien Colo357 und OvCar3?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Analysenwaage Adventurer™	OHAUS Europe GmbH, Greifensee, Schweiz
Autoklav	Webeco GmbH, Selmsdorf, DE
BD FACS Canto II	Becton, Dickinson & Co., Heidelberg, DE
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Cytoflex S	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Evos M5000 Mikroskop	Thermo Fischer Scientific, Pinneberg, DE
Blackfly Kamera	FLIR Integrated Imaging Solution Inc., Richmond CA
Axioskop HBO 50 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Gefrierschrank, -20°C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, DE
Kühlschrank 2-8°C	Liebherr-International GmbH, Birberach an der Riß, DE
Mikropipetten (0,5-10µl, 10-100µl, 10-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikroskop Olympus CK2	OLYMPUS EUROPA SE & Co. KG, Hamburg, DE
C-Chip Neubauer improved (0,0025 mm ² / 0,1 mm)	NanoEnTek
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument
Sterilbank Class II, Type A/B3	Nuaire, Plymouth, USA
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, DE
Vortex Mixer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge Allegra™ X12-R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

Zentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 1.0	Thermo Fischer Scientific, Pinneberg, DE
-----------------------------------	--

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Assays

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial und Assays

Einmalhandschuhe NitraTex Microtouch	Ansell GmbH, München, DE
Einweg-Pasteurpipetten 3 ml	LabSolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Einweg-Stabpipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
FACS-Röhrchen	Falcon® Corning Brand, New York, USA
Falcon (15 ml; 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Lithium-Heparin-Monovetten (7,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Oris™ Cell Migration Assay	Platypus Technologies, Madison, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen gestopft	Biosphere® plus, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Transwell®, 24 well-plate, Porengröße 5µm	Corning Incorporated, New York, USA
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Ambrisentan	Gilead Sciences, Foster City, USA
<i>Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit</i>	PromoCell, Heidelberg, DE
BD Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD PermWash Buffer (10x)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BioParticles® Staphylococcus aureus, FITC-gekoppelt	Molecular Probes®, ThermoFisher Scientific, Pinneberg, DE
Biotase	Biochrom GmbH, Berlin, DE

Celltrace CFSE <i>Cell Proliferation Kit</i>	Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific, Pinneberg, DE
Dextran	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
<i>Diff Quik Cell Staining Kit</i>	Medion Diagnostics, Gräfelfing, DE
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
FCS	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Ficoll-Hypaque	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Glutamin 100x	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Human TruStain FcX	Biolegend, San Diego, CA, USA
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
N-Formylmethionin-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Natrium-Pyruvat (Na-Pyr)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Panexin NTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Par-2-Agonist	AnaSpex Inc, Fremont, CA, USA MoBiTec GmbH, Göttingen, DE
Penicillin, Streptomycin (PenStrep)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Phorbol 12-Myristate 13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
<i>Red Blood Cell</i> (RBC) Lyse	QIAGEN Sciences, Maryland, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640	Lonza Group AG, Basel, CH Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Sitaxentan	Pfizer GmbH, Berlin, DE
TRIzol	Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific, Pinneberg, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Spezifität	Konjugation	Clone	Isotyp	Eingesetztes Volumen	Firma
CD14	PE	M5E2	Mouse IgG ₁	1 µl	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD15	PE-Cy7	W6D3	Mouse IgG ₁	1 µl	Biolegend, San Diego, CA, USA
ETAR Sc-33535	-	polyklonal	Rabbit IgG	4 µl	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
ETBR Sc-33537	-	polyklonal	Rabbit IgG	4 µl	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Isotype Sc-3888	-	polyklonal	Rabbit IgG	4 µl	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Sek. Antikörper	BV 421	polyklonal	Donkey Anti Rabbit IgG	4 µl (1:10 verdünnt)	Biolegend, San Diego, CA, USA

Abkürzungen: Cyanin 7 (Cy7), Phycoerythrin (PE), Brilliant Violet (BV)

2.1.5 Software

Tabelle 5: Software

Fiji (Image J, Version 2.0.0-rc-59/1.51k)	Open Source Software, GNU General Public License
FlowJo 10.2	License Dongle der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
Windows 8	privat
GraphPad Prism 5 for Windows	Version 5.01, August 2007
Microsoft Excel für Mac	Version 16.36, 2020

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle
Colo357	Pankreasadenokarzinom (Lymphknotenmetastase) ECACC: 94072245	Geschenk der AG Prof. Dr. Frank Gieseler, European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
HL60	Akute Promyelozyten Leukämie ATCC: CCL-240	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
MDA-MB-231	Mammakarzinom (Pleuraerguss) ATCC: HTB26	Geschenk der AG Prof. Dr. Frank Gieseler, ATCC
OvCar3	Ovarialadenokarzinom (Aszites) ATCC: HTB161	Geschenk der AG Prof. Dr. Frank Gieseler, ATCC

2.1.7 Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zellkulturmedien

Nährmedium HL60	RPMI 1640 (ohne Glutamin), 20 % FCS, 1 % PenStrep, 2 mM L-Glutamin
Nährmedium Colo357	RPMI 1640 (ohne Glutamin), 10 % Panexin NTA, 1 % PenStrep Glutamine 100x, 1 % Na-Pyr
Nährmedium OvCar3	RPMI 1640 (ohne Glutamin), 10 % Panexin NTA, 1 % PenStrep Glutamine 100x, 1 % Na-Pyr
Nährmedium MDA-MB-231	RPMI 1640 (ohne Glutamin), 10 % Panexin NTA, 1 % PenStrep Glutamine 100x, 1 % Na-Pyr

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Zellen, Zellreihen und Kultivierung

2.2.1.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) wurden aus Vollblut von gesunden Erwachsenen mittels Dextran-Sedimentation und anschließender Ficoll-Hypaque-Zentrifugation gewonnen, wie bereits beschrieben (124–126). Die Zellisolierung

und das anschließende Experiment erfolgten stets am Tag der Blutentnahme. Die isolierten Granulozyten enthalten hauptsächlich neutrophile, jedoch auch eosinophile und basophile Granulozyten. Von gesunden Proband*innen wurden 15 ml Vollblut in Natrium-Heparin-Röhrchen entnommen und 1:1 mit einer sechsprozentigen Dextranlösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde die Blut-Dextransuspension im nächsten Schritt vorsichtig per Stabpipette über 12,5 ml Ficoll-Hypaque ohne Vermischung der Flüssigkeiten geschichtet und anschließend 25 Minuten bei 800 G ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die unterste Phase gesäubert. So wurde das Blut anhand seiner verschiedenen Dichten der Blutbestandteile und -zellen in diese separiert. Das Blutplasma als obere Schicht im Falcon und die Monozyten in der Interphase wurden verworfen, Granulozyten und Erythrozyten im Pellet weiterverwendet. Es erfolgte die Resuspension des Pellets in 3 ml kaltem Wasser zur Lyse der Erythrozyten, nach ca. 30 Sekunden wurde die Lyse durch Hinzufügen von 6 ml 37 °C - warmem Phosphat-gepufferte Saline (*phosphate buffered saline*, PBS) gestoppt, um eine Schädigung der Granulozyten zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI 1640 ohne Zusatz wurde das gesäuberte Pellet in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung auf Vitalität geprüft und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.1.2 HL60-Zelllinie

Die humane promyeloische Leukämie-Zelllinie HL60 wurde im Nährmedium RPMI 1640 mit 20% hitzeinaktiviertem fetalem bovines Serum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich. Zur Differenzierung der Zellen wurden diese vor Experiment 6 Tage zusätzlich in 1% Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert, wie bereits beschrieben (127). Anschließend wurde die Vitalität der Zellen durch Trypanblau-Färbung sichergestellt und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.1.3 Colo357-, OvCar3- und MD-MBA-231-Zelllinie

Die Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Colo357, die Ovarialkarzinom-Zelllinie OvCar3 sowie die Mammakarzinom-Zelllinie MD-MBA-231, alle humanen Ursprungs, wurde im Nährmedium RPMI 1640 mit 10 % Panexin NTA, sowie 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 1 % Natriumpyruvat kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte nach Bedarf

bei Erreichen von mehr als 80 % Konfluenz. Das Ablösen der Zellen geschah durch 3 ml angewärmte Biotase. Vor Experimenten wurde die Vitalität der Zellen durch Trypanblaufärbung sichergestellt und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt

2.2.2 Verwendete ETAR-Antagonisten

Zur Blockade des Endothelinrezeptors Typ A wurden die Medikamente Sitaxentan (Thelin®) und Ambrisentan (Volibris®) verwendet. Sitaxentan wurde mit einer Zielkonzentration von 20 mM in PBS gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt. Der pH betrug 7,4. Die Auflösung von Ambrisentan erfolgte in RPMI 1640 über mehrere Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer mit einer Zielkonzentration von 10 mM. Entgegen den Hinweisen in der Literatur gelang dies ohne Rückstände (128). Der pH-Wert betrug 7,0. Die Lösung wurde aliquotiert und zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Messung der Expression von ETAR und ETBR bei humanen PMN, HL60- und Colo357-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der Expression von Endothelinrezeptoren Typ A und Typ B erfolgte durchflusszytometrisch am FACS Canto II (Becton Dickinson & Co., Deutschland). Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mithilfe der Software FlowJo10.2 mit Licence Dongle auf Windows 8. PMN wurden nach o. g. Isolationsmethode gemessen (vgl. 2.2.1.1). Die Untersuchung der HL60-Zelllinie erfolgte nach Differenzierung der Zellen durch DMSO wie beschrieben (vgl. 2.2.1.2). Die Rezeptorexpression von Colo357-Zellen wurde direkt nach Kultivierung gemessen. Eine durchflusszytometrische Messung der OvCar3- und MDA-MB-231-Rezeptorexpression ist nicht erfolgt.

Zur Darstellung der Oberflächenexpression von ETAR wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper genutzt, der laut Hersteller an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 21 – 80 der N-terminalen extrazellulären Domäne von humanem ETAR spezifisch bindet (129). Zur Darstellung der Oberflächenexpression von ETBR wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper genutzt, der laut Hersteller an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 27 - 100 der N-terminalen extrazellulären Domäne von humanem ETBR spezifisch bindet (130). Zur Sichtbarmachung des Rezeptors wurde ein sekundärer Brilliant Violet (BV) 421-gekoppelter Esel-Antikörper genutzt, der spezifisch an Kaninchen-Antikörper bindet. 1×10^6 Zellen wurden zunächst in 1 ml PBS aufgenommen. Es erfolgte die Blockade der Fc-Rezeptoren durch 40 µl Blockierungspuffer (TruStain) für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur zur

Vermeidung unspezifischer Bindung der Antikörper. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-ETAR- bzw. anti-ETBR-Antikörper (AK) (4 µl, vgl. Tabelle 4). Nachfolgend wurden die Zellen 45 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimalig mittels PBS gewaschen. Im Anschluss wurde mit o. g. Sekundärantikörper analog zum oben beschriebenen Vorgehen gefärbt. Vor der Messung am Durchflusszytometer erfolgte erneut eine zweimalige Waschung mit PBS. Zur Kontrolle blieb ein Ansatz ungefärbt, zudem wurde eine Kontrolle nur mit sekundärem AK mitgeführt. Das Experiment wurde für ETAR und ETBR in doppelten Ansätzen durchgeführt. Es wurden für HL60-Zellen vier Experimente und für Colo357-Zellen zwei Experimente durchgeführt.

Die Expression von ETAR und ETBR auf CD15⁺ PMN wurde im Labor der Klinik für experimentelle Rheumatologie und klinische Immunologie gemessen an 38 SSc-Patient*innen und 18 gesunden Proband*innen. Die Analyse dieser Daten ist als Teil dieser Studie erfolgt. Die Gatingstrategie geht aus Abbildung 7 hervor. Die MFI aus zwei Ansätzen wurde gemittelt und die Endothelinrezeptorexpression als Differenz zwischen der MFI und der des sekundären Antikörpers ausgedrückt wie bereits beschrieben (Δ MFI) (31).

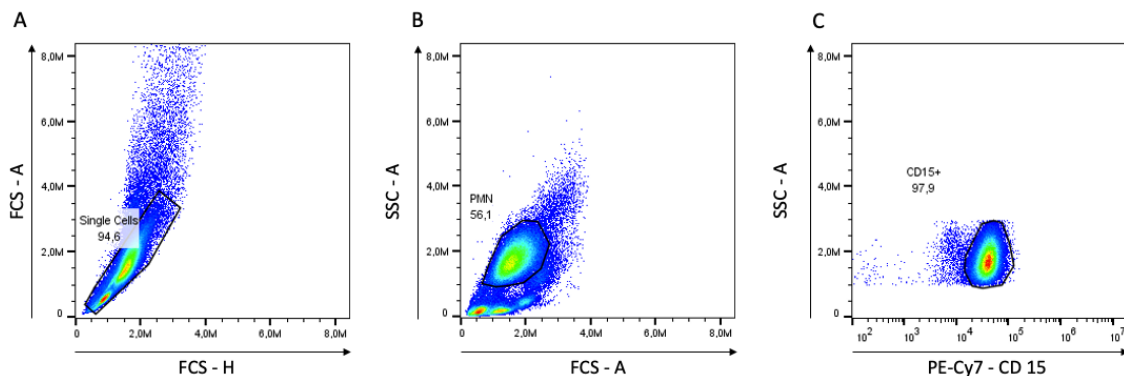


Abbildung 7: Gating von PMN für MFI von ETAR und ETBR. (A) FSC-Höhe (height, H) gegen FSC-Fläche (area, A) zur Selektion der Einzelzellen. (B) FCS-A gegen SSC-A zur Selektion der PMN nach Größe und Granularität anhand Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (C) Granulozyten-Population als Gate nach CD15⁺.

In Abbildung 8 ist die Selektion der entsprechenden Zellpopulation nach Größe mittels Vorwärtsstreulicht und Granularität mittels Seitwärtsstreulicht für die Zellpopulation von HL60 und Colo357 nach anti-ETAR-/anti-ETBR-Färbung dargestellt.

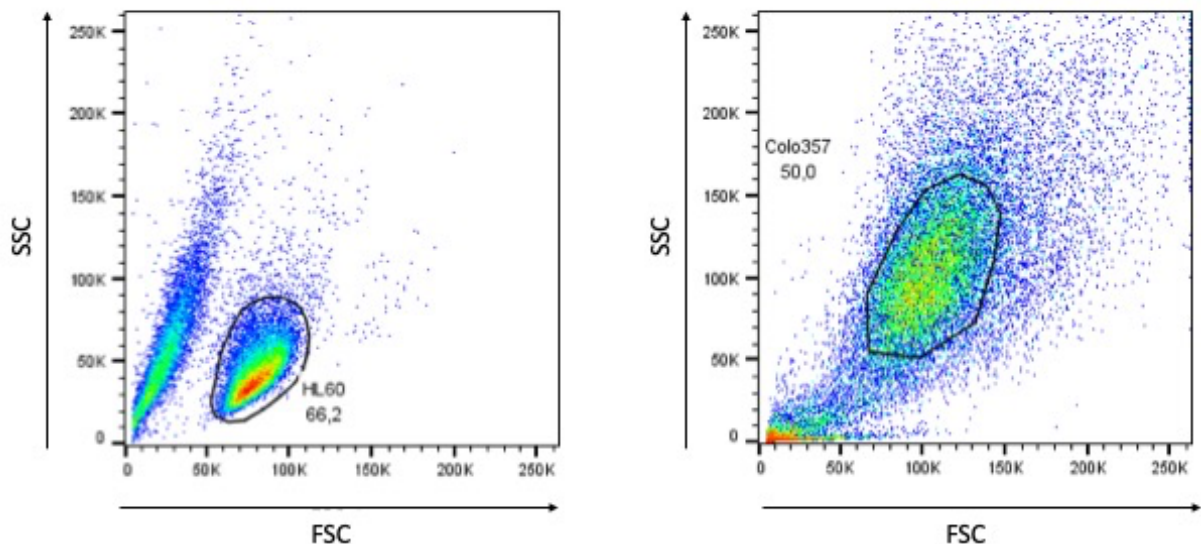


Abbildung 8: Gating von HL60 und Colo357. FSC zur Selektion nach Größe der Zelle, SSC zur Selektion der Granularität.

2.2.3.1 Analyse des ETAR/ETBR-Expressionsratios auf CD15⁺-PMN bei der SSC in Korrelation zu klinischen Parametern

Das Rezeptorexpressionsmuster als Verhältnis von ETAR zu ETBR wie in 2.2.3 beschrieben, wurde auf CD15⁺ Granulozyten untersucht und mit klinischen Parametern korreliert, wie bereits für Monozyten beschrieben (131). Es handelte sich um die Daten von 38 Patient*innen mit der Diagnose Systemische Sklerose gemäß American College of Rheumatology and European League against Rheumatism-Kriterien (ACR/EULAR) von 2014 (75). Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte gemäß EUSTAR-Empfehlungen (132) von Ärzt*innen der Klinik für Rheumatologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Lübeck (vgl. Tabelle 8). Die Aufklärung über die Verwendung ihrer Daten zu Forschungszwecken wurde von diesen Ärzt*innen durchgeführt und das Einverständnis der Patient*innen eingeholt.

Es wurde der klinische Hautscore *modified Rodnan Skin Score* (mRSS) erhoben, um die Hautbeteiligung zu objektivieren. Zur Evaluierung des *Interstitial Lung Disease* (ILD) wurde die Diffusionskapazität der Lunge (*diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide*, DLCO in %) gemessen sowie die forcierte Vitalkapazität (FVC in %) betrachtet. Als Parameter für eine mögliche kardiale Mitbeteiligung und/oder eine pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) wurde das N-terminale pro-Brain Natriuretic Peptide (NTproBNP) betrachtet. Als Entzündungsparameter wurden das C-reaktive Protein (CRP) in mg/dl sowie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in mm nach Weber (n. W.) betrachtet. Zusätzlich

wurden die anti-ETAR-AK in U/ml betrachtet. Diese Daten wurden anschließend mit der ETAR/ETBR-Expressionsratio auf CD15⁺ PMN durch Spearman- oder Pearson-Test korreliert.

*Tabelle 8: Klinische Charakterisierung von Systemische Sklerose-Patient*innen*

Charakterisierung	Mittelwert ± SEM (Spannweite d. Werte)
Geschlecht (m : w)	10 : 29
Alter, Jahre	57,38 ± 2,09 (30 - 80)
Klinische Daten	
mRSS	10,5 ± 1,2 (0 - 28)
Digitale Ulzera (ja/gesamt)	12/40
DLCO (%)	67,5 ± 3,77 (24 - 107)
FVC (%)	83,64 ± 3,1 (47 - 119)
NTproBNP	340,24 ± 88,21 (7,9 - 1749)
BSG (mm n. W.)	24,8 ± 6,91 (2 - 110)
CRP (mg/dl)	4,5 ± 1,03 (0,3 - 37,2)
Anti-ETAR-AK (U/ml)	11,38 ± 2,09 (58,14 - 0,74)
Immunsuppressiva aktuell (ja/gesamt)	28/40
ETAR-Antagonisten (ja/gesamt)	10/40, davon 1 Patientin mit Macitentan und 9 Patient*innen mit Bosentan

mRSS: modified Rodnan Skin, DLCO: diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide, FVC: forcierte Vitalkapazität, NT-proBNP: N-terminale pro-Brain Natriuretic Peptide, CRP: C-reaktives Protein, BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit, anti-ETAR-AK: Anti-Endothelinrezeptor Typ A-Antikörper

Tabelle 9: Charakterisierung der Gesunden Kontrollen

Charakterisierung	Mittelwert ± SEM (Spannweite d. Werte)
Geschlecht (m : w)	4 : 11
Alter, Jahre	32,34 ± 2,13 (23 - 51)

2.2.4 Einfluss von Sitaxentan und Ambrisentan auf Vitalität und Funktionalität von PMN und Colo357-Zellen

In der vorliegenden Studie lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Migration von PMN und verschiedenen Tumorzelllinien. Um zu zeigen, dass die verwendeten ETAR-Antagonisten gezielt die Migration beeinflussen und diese nicht etwa durch toxische Effekte der ETAR-Antagonisten auf die Zelle beeinflusst wurde, wurde die Vitalität der Zellen als Abwesenheit von Apoptose und Nekrose gemessen. Außerdem wurde die Funktionalität für PMN als *oxidative burst* quantifiziert und die Proliferation zweier Tumorzelllinien unter dem Einfluss der ETAR-Antagonisten analysiert.

2.2.4.1 Vitalität von PMN und Colo357-Zellen nach Inkubation mit ETAR-Antagonisten

Zunächst wurde untersucht, ob die ETAR-Antagonisten Sitaxentan und Ambrisentan Apoptose und/oder Nekrose von humanen PMN oder Colo357-Zellen induzieren. Hierzu wurde ein *Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit* der Firma Promocell genutzt.

Apoptose, als programmierter Zelltod wird u. a. durch das Präsentieren von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran angezeigt. Dies wird durch Binden von Annexin V (FITC-gekoppelt) an Phosphatidylserin detektiert und kann im Durchflusszytometer als grünes Signal gemessen werden. Annexin V gilt hier als Apoptosemarker. Nekrose, als unkontrolliertes Zugrundegehen von Zellen geht mit dem vollständigen Verlust der Integrität von Zellorganellen und Zellkern einher. Ethidium Homodimer III bindet mit hoher Affinität an offenliegende DNA nekrotischer Zellen und färbt diese im Durchflusszytometer rot (PE-Cy5) ohne die Zellmembran gesunder Zellen zu penetrieren. Zum Nachweis intakter Zellen wurde der Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. Dieser ist membrangängig und färbt so DNA im Zellkern blau an (Pacific Blue), gesunde Zellen sind ausschließlich blau gefärbt (133).

Isolierten PMN wurden 1 h lang mit Ambrisentan in einer Konzentration von 100 µM inkubiert. Anschließend wurden sie gemäß Herstellerangaben gefärbt. Zusammengefasst wurden 2×10^6 Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS in 1 ml Bindungspuffer des Kits aufgenommen. Zur Färbung wurden jeweils 100 µl pro Ansatz mit Annexin-V, Ethidium Homodimer III und Hoechst 33342 (jeweils 2 µl) für 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Bindungspuffer hinzugegeben und die Messung am Durchflusszytometer binnen 1 h durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten durch Hitze abgetötete Zellen, als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Zellen in

Medium mitgeführt. Die entsprechende Versuchsreihe für PMN mit Sitaxentan in einer Konzentration von 100 μ M wurde von Otavio Cabral-Marques bereits veröffentlicht (92) und wurde daher nicht erneut durchgeführt. Der Vollständigkeit halber sind diese Sitaxentan-Daten für PMN unter Ergebnisse (vgl. 3.2.1) mitaufgeführt. Es wurde je ein Versuch pro Zelltyp in Triplets durchgeführt. Die Gatingstrategie für PMN ist in Abbildung 9 dargestellt.

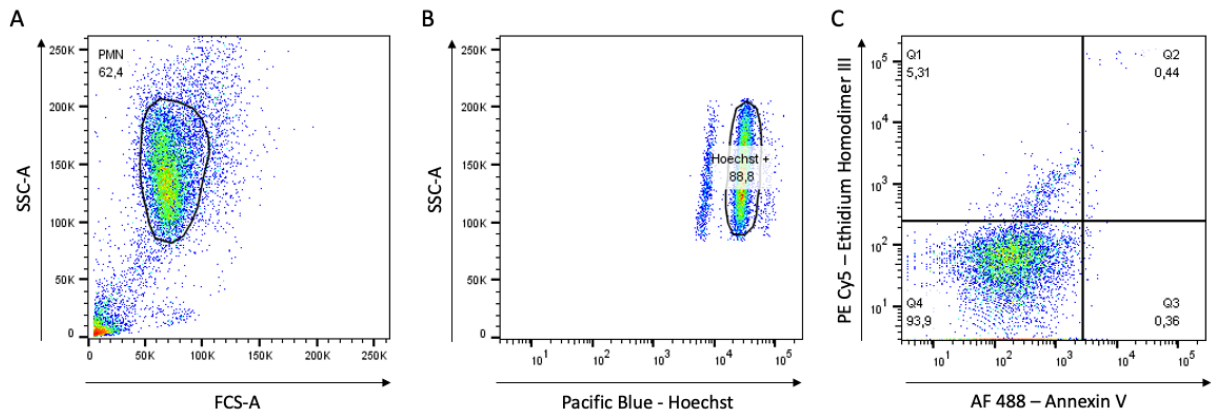


Abbildung 9: Gating von PMN unter Ambristentan für Apoptose/Nekrose/Healthy Cells Assay. (A) Dot plot nach Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht zur Identifizierung der Zellpopulation PMN. (B) Selektion der Hoechst-Positiven (Hoechst+). (C) Auftrag von Annexin V gegen Ethidium Homodimer III zur Identifikation von nekrotischen (Q1), schwergeschädigten Zellen (Q2) apoptotischen (Q3) und gesunden (Q4) Zellen.

Colo357-Zellen wurden analog zum oben beschriebenen Procedere mit Ambristentan oder Sitaxentan in einer Konzentration von 100 μ M für die Dauer von 1 h inkubiert. Die Gatingstrategie ist in Abbildung 10 für Colo357-Zellen dargestellt.

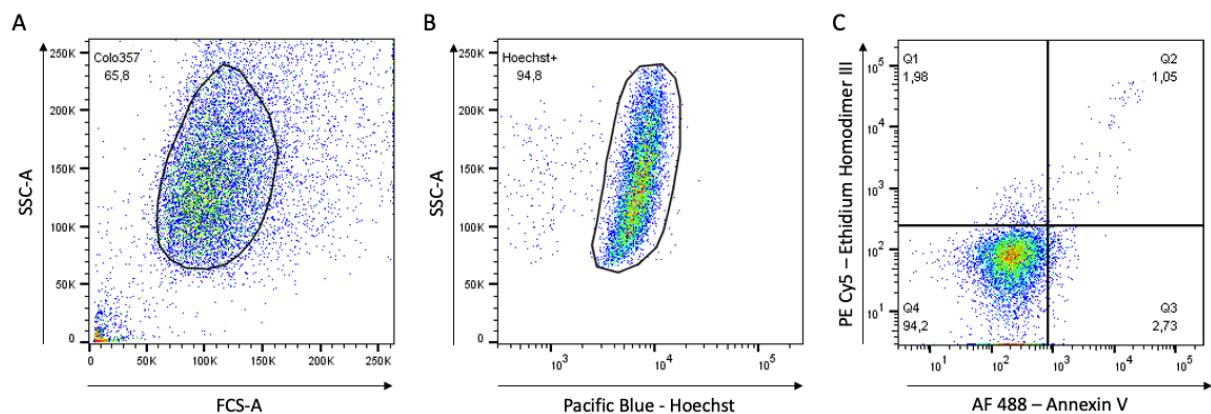


Abbildung 10: Gating von Colo357 für Apoptose/Nekrose/Healthy Cells Assay. Exemplarisch Medium-Kontrolle dargestellt. (A) Dot plot nach Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht zur Identifizierung der Zellpopulation Colo357. (B) Selektion der Hoechst-positiven Zellen (Hoechst+). (C) Auftrag von Annexin V gegen Ethidium Homodimer III zur Identifikation von nekrotischen (Q1), schwergeschädigten Zellen (Q2) apoptotischen (Q3) und gesunden Zellen (Q4).

2.2.4.2 Effekt von ETAR-Antagonisten auf die Funktionalität von humanen PMN: *Reaktive Sauerstoffspezies*

Um Mikroorganismen in Phagolysosomen abzutöten, ist ein wichtiger Mechanismus von PMN die Herstellung toxischer reaktiver Sauerstoffradikale (Reaktive Sauerstoffspezies, ROS). Dies geschieht durch die NADPH-Oxidase, die Superoxiddismutase und die Myeloperoxidase. *In vitro* ist Phorbol-12-Myristate-13-Azetat (PMA) als Proteinkinase-C-Aktivator ein zuverlässiges Stimulanz für respiratorischen Burst, Dihydrorhodamin (DHR) fungiert als Indikator für reaktive Sauerstoffspezies in dem es mit diesen zu fluoreszierendem 123-Rhodamin reagiert (134).

Um den Einfluss von Ambrisentan und Sitaxentan auf *oxidative burst* von PMN zu untersuchen, wurden die Zellen wie oben beschrieben isoliert und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml gebracht. 200 μ l Zellsuspension mit/ohne Ambrisentan bzw. Sitaxentan in einer Konzentration von jew. 100 μ M wurden 1 h inkubiert und anschließend zum respiratorischen Burst mittels PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit/ohne PMA in einer Konzentration von 300 ng/ml 55 Minuten lang bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DHR in einer Konzentration von 400 ng/ml als Indikator für ROS inkubiert. Es erfolgte einmaliges Waschen mit 500 μ l PBS und die Messung im Durchflusszytometer nach Gating für Größe (FSC) und Granularität (SSC). Es wurden mindestens zwei Versuche pro Aufbau jeweils in Triplets durchgeführt.

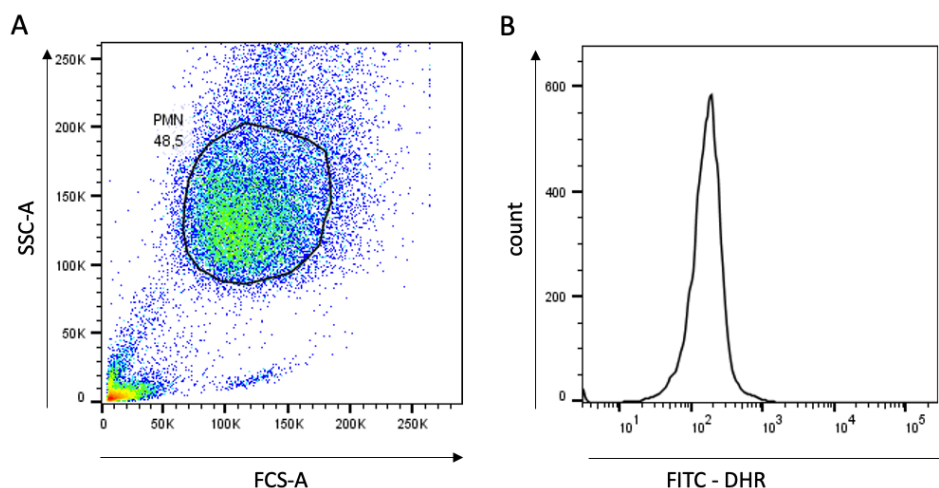


Abbildung 11: Gating von PMN für ROS-Release-Assay im dot plot für FSC und SSC. (A) sowie Histogramm der selektierten Population für DHR (B).

2.2.4.3 Messung der Phagozytosekapazität in Abhängigkeit von ETAR-Antagonisten

Als Teil der angeborenen Immunantwort sind polymorphkernige, insbesondere neutrophile Granulozyten ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr. Eine tragende Aufgabe besteht in der Phagozytose von Mikroorganismen mit dem Zweck der Eliminierung.

Um zu prüfen, ob diese Funktion durch Ambrisentan und Sitaxentan unbeeinträchtigt blieb, wurden 7,5 ml Vollblut von gesunden Proband*innen mit/ohne Sitaxentan bzw. Ambrisentan jeweils in einer Konzentration von 100 μM 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde BioParticles® Staphylococcus aureus (Staph. aureus), FITC-gekoppelt gemäß Herstellerangaben verwendet. Nach Lysierung des Agens in PBS mit einer Zielkonzentration von 20 mg/ml wurden die Partikel gemäß Herstellerangaben auf eine Zahl von 6×10^6 Partikel auf 5×10^5 Zellen normiert und zur Vollblutprobe hinzugefügt. Zur anschließenden Identifizierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurde zudem mit CD14 und CD15 wie oben bereits beschrieben, gefärbt.

Bei Verwendung von Vollblut wurde auf ein zusätzliches opsonierendes Agens verzichtet. Dann wurden durch RBC Lysierungslösung die Erythrozyten auf der Probe entfernt und die Probe mittels achtprozentiger Formaldehydlösung fixiert. Zur Kontrolle wurden eine ungefärbte Probe sowie eine FMO Probe mitgeführt. Die Anzahl der FITC-positiven, sprich phagozytierenden Granulozyten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie qualitativ sowie quantitativ durch Durchflusszytometrie bestimmt. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten und in Triplets durchgeföhrt.

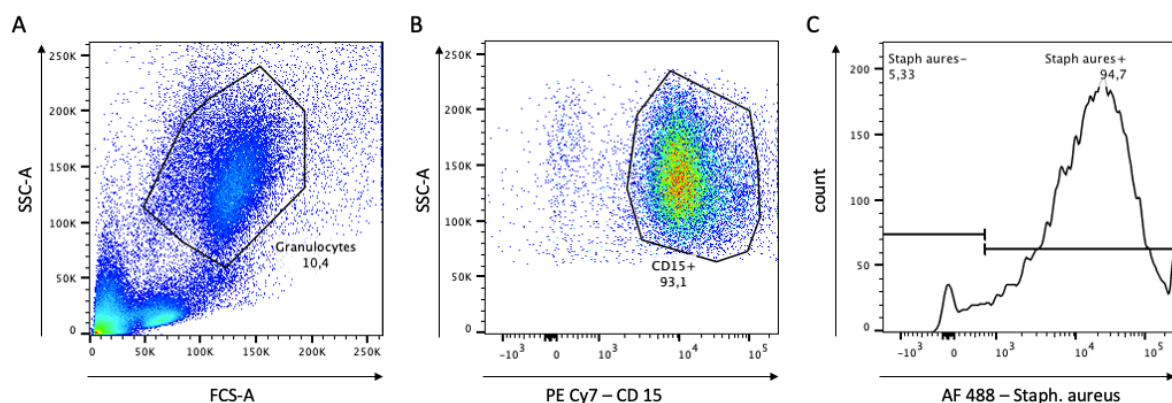


Abbildung 12: Gatingstrategie zur Messung der Phagozytosekapazität bei PMN. (A) dot plot aus lysiertem Vollblut, Auftrag nach Größe (FCS) und Granularität (SSC), markiertes Gate der Granulozytenpopulation. (B) Granulozytenpopulation mit zusätzlichem Gate nach CD15⁺. (C) CD15⁺ Granulozyten (PMN) im Histogramm mit Gate für Staph. aureus-Positive (+) und Negative (-).

2.2.4.4 Einfluss von ETAR-Antagonisten auf die Proliferation von Colo357- und MDA-MB-231-Zelllinie

Um die Wirkung der ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan auf die Proliferation der Tumorzelllinien Colo357 und MDA-MB-231 zu untersuchen, wurden diese mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) inkubiert. CFSE lagert sich an freie Amine extra- und intrazellulär an und verteilt sich bei Zellteilung gleichmäßig auf die Tochtergenerationen. Mehr als 8 Generationen können so über Farbstoffverdünnungen im Durchflusszytometer verfolgt werden (135). Die Verdopplungszeit der Colo-357-Zelllinien beträgt 21 h (136), die der MDA-MB 231-Zelllinie beträgt 1,3 Tage, entsprechend ca. 32 h (137) sodass eine experimentelle Dauer von 5 Tagen gewählt wurde. Es wurde das CellTrace CFSE Proliferation Kit benutzt und nach Herstellerangaben angewandt. Zusammenfassend wurden 1×10^6 Zellen für 5 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ in Kulturmedium mit und ohne Sitaxentan (100 µM) bzw. Ambrisentan (100 µM) in T75 Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden qualitativ fotografiert und quantitativ im Durchflusszytometer analysiert, wie in Abbildung 13 schematisch beschrieben. Der Bereich von 488 nm ist laut Hersteller der optimale Anregungsbereich um CFSE darzustellen. Es wurde anschließend die *Median Fluorescence Intensity* (MFI) bestimmt und verglichen. Drei unabhängige Versuche wurden in Triplets durchgeführt.

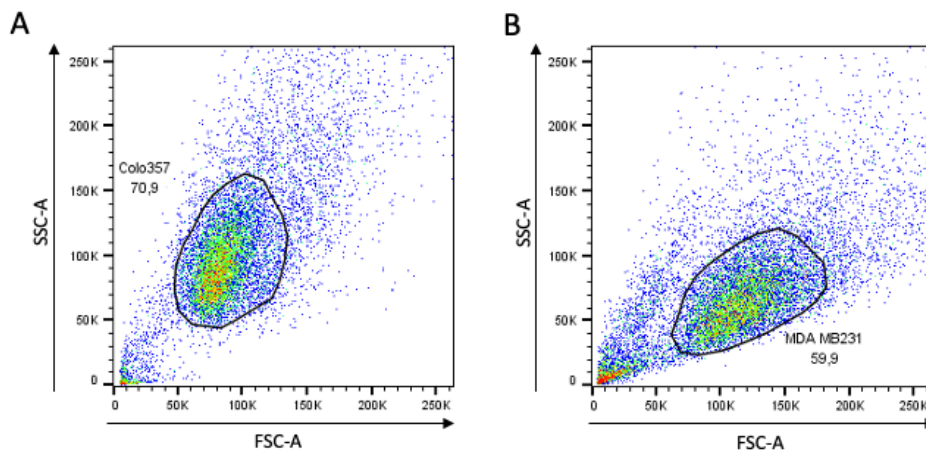


Abbildung 13: Proliferationsassay mit CFSE, Gating und Analyse. (A) Gating der Colo357-Zellpopulation im dot plot, SSC gegen FSC. (B) Gating der MDA-MB231-Zellpopulation im Dot Plot, SSC gegen FSC.

2.2.5 Messung der *in vitro* Migration humaner PMN und Tumorzelllinien unter Einfluss von ETAR-Antagonisten

2.2.5.1 Transwell Assay

Der Transwell Assay ist ein Migrationsassay, in dem die verwendeten Zellen von einer oberen Kammer in eine untere Kammer migrieren. Die beiden Kammern sind durch eine Polycarbonatmembran, die Poren enthält, getrennt. Diese muss durch die Zellen überwunden werden. Die Zellzahl im unteren *well* wird anschließend bestimmt. Dieser Versuch wurde für isolierte PMN sowie HL60 Zellen, beides nicht-adhärenente Zelllinien durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt.

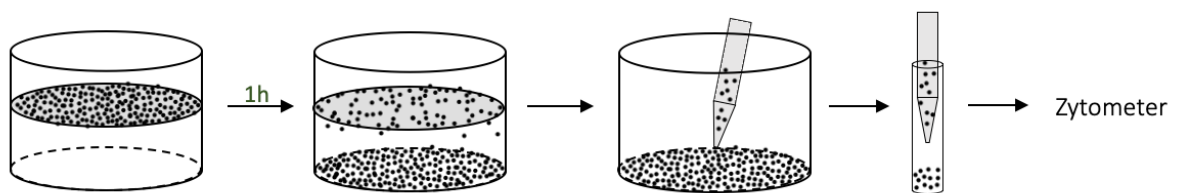


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Transwell Assay

Zur Untersuchung des Einflusses der verwendeten ETAR-Antagonisten auf Migration wurden die Zellen zunächst 1 h in RPMI (Medium) mit/ohne Sitaxentan bzw. Ambrisentan, jeweils in einer Konzentration von 100 μM im Brutschrank inkubiert. Für PMN wurde außerdem für Sitaxentan und Ambrisentan eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Hierzu wurden PMN jeweils in Endkonzentrationen von 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM mit den Medikamenten inkubiert. Anschließend wurde der Transwell Assay durchgeführt. Hierfür wurde wie bereits beschrieben (92) eine Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen in 200 μl RPMI 1640 in die obere Kammer eingesät. Die untere Kammer enthielt 500 μl RPMI 1640. Die Versuche wurden sowohl mit stimulierten Ansätzen als auch unstimulierten Ansätzen durchgeführt, d. h. in die untere Kammer erfolgte zusätzlich die Zugabe des Tripeptids fMLP in einer Konzentration von 10 ng/ml als Migrationsstimulus. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte stets 1 h bei 37 °C, 5 % CO_2 . Zum Migrationsstopp wurde die obere Kammer aus dem Well entfernt. Anschließend erfolgten qualitative Photographien der unteren Wells mittels eines EVOS-Mikroskops sowie quantitativ die Zählung der Zellen mittels Cytoflex Zytometer nach Gating der entsprechenden Zellpopulation in *events/ μl* (vgl. Abbildung 15). Zur Auswertung wurde neben der absoluten Zellzahl die relative Migration bestimmt, hierzu wurde die Negativkontrolle (Medium) als 100 % migriert angesehen und die Messwerte der restlichen Ansätze dazu in Verhältnis gesetzt.

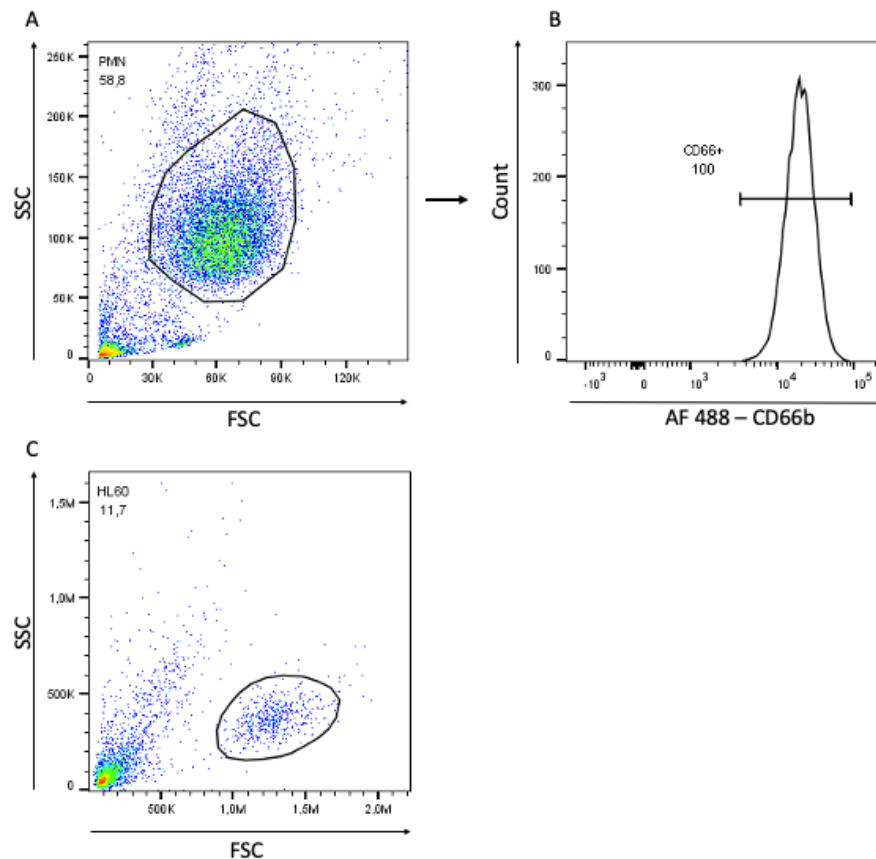


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung des Gatings für PMN (A) und HL60-Zelllinie (C) nach Migration im Transwell Assay. In (B) CD66b-Färbung zur spezifischen Granulozytenidentifizierung nach Vorselektion der PMN-Population anhand von SSC und FSC aus (A).

Um zu zeigen, dass es sich bei der selektierten PMN-Population aus Abbildung 15 (A) tatsächlich um Granulozyten handelt, soll an dieser Stelle die Oberflächenexpression von CD66b als spezifischer Granulozytenmarker gezeigt werden (138). Aus Abbildung 15 (B) geht hervor, dass 100 % der vorselektierten Population CD66b exprimieren und es sich somit eindeutig um Granulozyten handelt.

2.2.5.2 Oris Pro Cell Assay

Der Oris Migrationsassay ist ein Assay für adhärent wachsende Zellen. Initial befindet sich in der Mitte jedes *well*s ein Stempel, der als Platzhalter dient. Zellen werden in die, den Stempel umgebende Fläche eingesät und migrieren in die zentrale freie Fläche. Diese wird nach Ende des Versuchs lichtmikroskopisch fotografiert und per Software analysiert. Es wurden für diesen Assay die Colo357- sowie die OvCar3- Zelllinie genutzt. Eine schematische Darstellung des Versuchs ist in Abbildung 16 dargestellt.

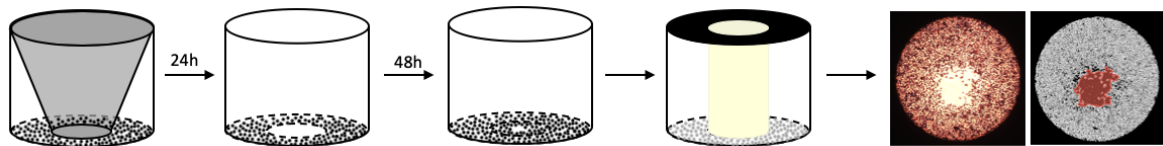


Abbildung 16: Schematische Darstellung Oris Migrationassay. Zug des Stempels nach 24 h, Migration für 48 h, dann Färbung und Lichtmikroskopaufnahmen, anschließende Transformation in Schwarzweiß-Werte und Analyse der zellfreien Fläche.

Nach Anleitung des Herstellers und wie bereits beschrieben (139) wurden 3×10^4 Zellen pro *well* eingesät. Danach wurden diese für 24 h in 100 μ l o. g. Medium ruhen gelassen, damit sich eine zusammenhängende und adhärente Zellschicht (*monolayer*) bilden kann. Nach 24 h wird der Stempel vorsichtig entfernt, das alte Medium entfernt und 200 μ l frisches Medium mit bzw. ohne ETAR-Antagonisten hinzugefügt. Die Konzentration von Sitaxentan und Ambrisentan für beide Zelllinien betrug 100 μ M. Auch dieser Migrationsversuch wurde stimuliert und unstimuliert durchgeführt, hier wurde als Migrationsstimulus ein *Proteinase activated receptor 2 agonistic peptide* (Par2-Agonist) in einer Konzentration von 100 μ M hinzugefügt. Beide Zelllinien exprimieren nachgewiesenermaßen den Par2-Rezeptor (140,141). Nach 24 h wurden 100 μ l frisches Zellkulturmedium ohne Stimuli/ETAR-Antagonisten jedem *well* hinzugefügt.

Nach 48 h im Brutschrank wurde die Migration durch Entfernung des Mediums und Färbung und Fixierung mittels des *Diff/Quick*-Zellfärbungskits nach Herstellerangaben gestoppt. Zur Auswertung wurde die Oris Detektionsmaske auf die Unterseite der Platte geklickt, die nur die initial vom Stempel bedeckte Fläche frei lässt. Fotos wurden mittels Blackfly Kamera am Axioskop HBO50 Mikroskop gemacht. Die Fotos wurden mit der Fiji Software von Image J analysiert. Die freie Fläche (Mittelwert aus Quadriplets) der Negativkontrolle (nur Medium) wurde als Ausgangswert gesetzt, hiervon wurde die freie Fläche der Migrationsansätze subtrahiert. Es resultiert die durch migrierte Zellen reduzierte freie Fläche in pixel^2 , wie zuvor beschrieben (139).

2.2.6 Messung des Einflusses von Ambrisentan auf das Transkriptom von Colo357-Zellen

Zur Analyse des Transkriptoms der Colo357-Zelllinie nach Behandlung des ETAR-Antagonisten Ambrisentan wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Diese wurde, wie zuvor beschrieben durchgeführt (142). 10×10^6 Colo357-Zellen wurden 24 Stunden mit einem Par2-Agonisten (100 μ M) und/oder Ambrisentan (100 μ M) kultiviert. Eine

Mediumkontrolle diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Colo357-Zellen mit dem Agens TRIzol gemäß der Anweisungen des Herstellers gewonnen. Die RNA-Integrität und -Konzentration wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser RNA Nano Chip gemessen und durch Visualisierung der Integrität der 28S- und 18S-Bande auf einem Agarosegel validiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die RNA der Einzelexperimente gepoolt. Es wurden cDNA-Bibliotheken mit der Illumina CBot-Station und HiScanSQ unter Verwendung des NEBNext Ultra Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, USA) gemäß den jeweiligen Herstelleranweisungen gewonnen. Die Sequenzierung wurde mit der Illumina HiSeq 4000-Plattform durchgeführt (150-Nukleotide Paired-End-Reads). Otavio Cabral Marques hat in Zusammenarbeit mit Professor Hauke Busch der Arbeitsgruppe Systembiologie der Universität zu Lübeck sowie mit unserer Arbeitsgruppe die weitere bioinformatische Analyse der gewonnenen Daten wie zuvor beschrieben (143,144) durchgeführt.

2.2.7 Statistik

Alle statistischen Tests wurden mit Microsoft Excel oder GraphPad Prism Version 5.01 (August 2007) durchgeführt. Es wurde am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik eine biometrische Beratung im Umfang von ca. 6 Stunden in Anspruch genommen. Zur Signifikanzprüfung wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt unter der Annahme, dass keine parametrische Normalverteilung vorliegt. Bei einer n-Zahl von $n < 3$ wurde auf eine Signifikanzprüfung verzichtet. Die Aussagekraft auch nach statistischer Prüfung bei $n \leq 5$ ist als limitiert anzusehen. Es wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant (*) angesehen, $p \leq 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p \leq 0,001$ hoch signifikant (***). Dargestellt ist stets der Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) als Fehlerbalken.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Endothelinrezeptoren Typ A und B

3.1.1 ETR-mRNA-Expression von Colo357-, MDA-MB-231-, OvCar3- und HL60-Zelllinien

Zunächst erfolgte der Nachweis der ETR-Expression auf Genexpressionsebene. Hierzu führte Anja Kerstein-Stähle aus unserer Arbeitsgruppe der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie eine quantitative *real-time* PCR (qPCR) zur Detektion der mRNA von ETAR bzw. ETBR bei der Colo357-, der MDA-MB-231-, der OvCar3- und der HL60-Zelllinie durch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Auf der X-Achse sind die einzelnen Zelllinien dargestellt, die relative Expression der ETAR-mRNA ist als weiße Balken, die der ETBR-mRNA als graue Balken zu sehen. Der Delta *cycle threshold* (ΔCT)-Wert ist die Differenz zwischen dem Mittelwert der CT-Werte der Zielgene (ETAR- bzw. ETBR-mRNA) und dem Mittelwert der CT-Werte zweier *housekeeping*-Gene (18S rRNA und GAPDH). Dieser wurde auf der Y-Achse als $2^{-\Delta CT}$ ausgedrückt wie bereits beschrieben (145). Die exponentielle Darstellung wurde gewählt, da es sich bei der qPCR um eine Reaktion mit exponentieller Dynamik handelt.

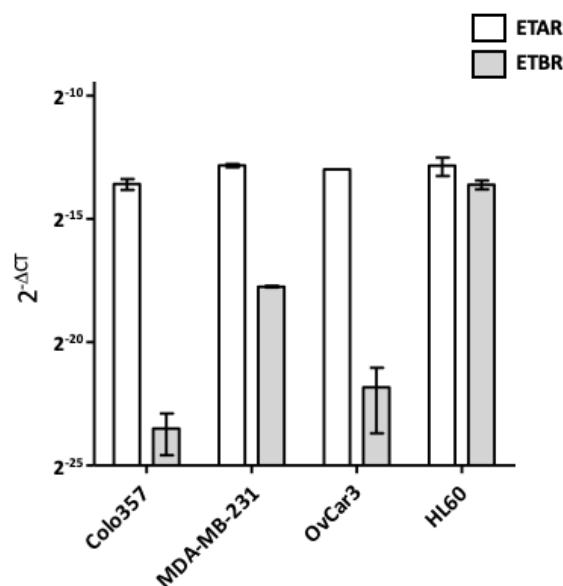


Abbildung 17: Balkendiagramm zur ETR-Expression der Colo357-, MDA MB 231-, OvCar3- und HL60-Zelllinie durch qPCR. ETAR-mRNA als $2^{-\Delta CT}$ ist weiß hinterlegt, ETBR-mRNA als $2^{-\Delta CT}$ ist grau hinterlegt. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass alle untersuchten Zelllinien ETAR und ETBR auf mRNA-Ebene exprimieren. ETAR wird durch Colo357-, MDA-MB-231- und OvCar3-Zellen stärker exprimiert als ETBR. HL60-Zellen exprimieren mRNA für beide Rezeptoren in ca. gleicher Quantität. Die Mittelwerte $\pm$ SEM für ΔCT der ETR mRNA gehen aus Tabelle 10 hervor.

Tabelle 10: Überblick über die ΔCT -Mittelwerte $\pm$ SEM für ETAR- bzw. ETBR-mRNA mittels qPCR.

Zelllinie	Rezeptor	ΔCT Mittelwert $\pm$ SEM
Colo357	ETAR	13,60 $\pm$ 0,22
	ETBR	23,74 $\pm$ 0,85
MDA-MB-231	ETAR	12,84 $\pm$ 0,07
	ETBR	17,75 $\pm$ 0,03
OvCar3	ETAR	12,99 $\pm$ 0,003
	ETBR	22,37 $\pm$ 1,32
HL60	ETAR	12,89 $\pm$ 0,38
	ETBR	13,63 $\pm$ 0,18

3.1.2 Oberflächenexpression von ETR bei Colo357- und HL60-Zelllinien sowie PMN

Neben dem Nachweis der ETR-Expression auf Genebene bei den Tumorzelllinien wurden die Colo357-Zelllinie sowie die HL60-Zelllinie und humane PMN durchflusszytometrisch auf ihre ETR-Proteinexpression untersucht.

3.1.2.1 Colo357-Zellen exprimieren ETAR und ETBR

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von ETR bei der Colo357-Zelllinie erfolgte durchflusszytometrisch. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, erkennt man auf der X-Achse eine nahezu unimodale Verteilung der Population anhand der Fluoreszenzintensität von BV 421-gekoppeltem anti-ETAR-AK. Auf der Y-Achse sind die Zellen nach Granularität im SSC bzw. nach der Anzahl aufgetragen. Je heller die Fluoreszenz erscheint, desto höher ist die Dichte des gebundenen Antikörpers, die der Rezeptordichte entspricht.

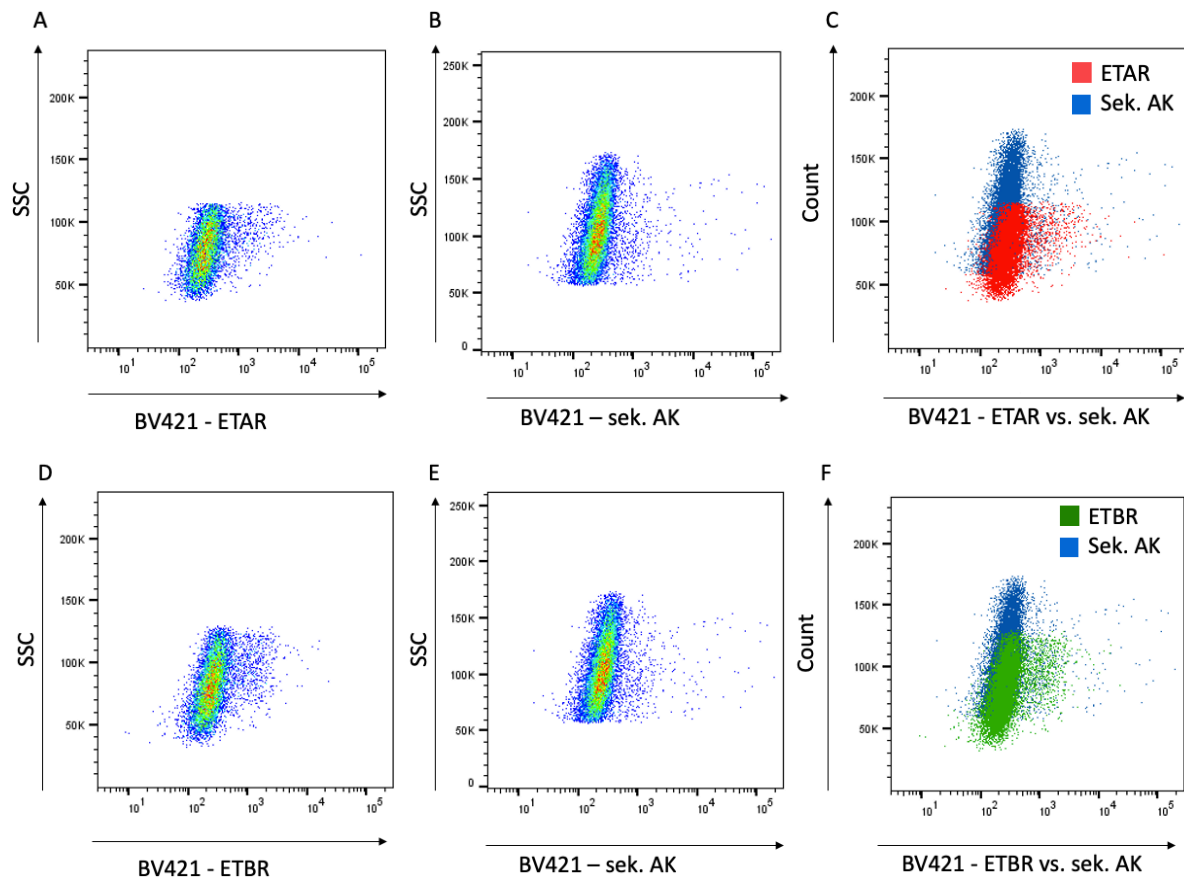


Abbildung 18: Oberflächenexpression von ETAR und ETBR bei der Colo357-Zelllinie. Darstellung des ETAR-Fluoreszenzmusters in (A) und des ETBR-Fluoreszenzmusters in (D) sowie der Kontrollfärbung mit sek. Antikörper in (B) und (E). Überlagerung der Fluoreszenzmuster von ETAR und der Kontrolle in (C) bzw. ETBR und der Kontrolle in (F).

Die Darstellung der Rezeptorexpression erfolgte als Δ MFI, d. h. als Differenz der MFI der Probe und der des sekundären Antikörpers. In Abbildung 18C und -F ist die Überlagerung der Fluoreszenzmuster der ETAR- bzw. ETBR-Färbung und der Kontroll-Färbung zu sehen. Der überlappende Bereich wurde durch die Verwendung von Δ MFI herausgerechnet. Diese Δ MFI für ETAR und ETBR wurde anschließend in Abbildung 19 aufgetragen und einander gegenübergestellt. Auf der X-Achse sind die Daten für ETAR und ETBR abgebildet, auf der Y-Achse kann die entsprechende Rezeptorexpression abgelesen werden.

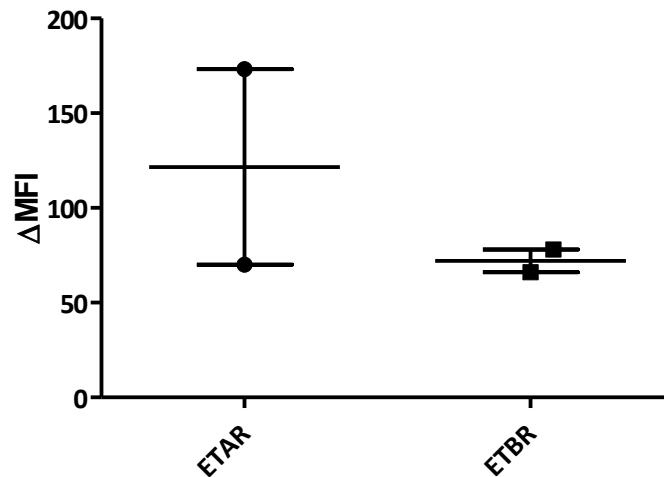


Abbildung 19: ETAR- und ETBR-Expression der Colo357-Zelllinie. Dargestellt ist die Δ MFI für ETAR und ETBR ($n = 2$).

Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für Δ MFI. Die mittlere ETAR-Oberflächenexpression auf Colo357-Zellen ergab einen Wert von $121,7 \pm 51,67$ SEM. Die mittlere ETBR-Oberflächenexpression ergab einen Wert von 72 ± 6 SEM. Eine statistische Analyse wurde bei $n = 2$ nicht durchgeführt.

3.1.2.2 HL 60-Zellen exprimieren ETAR und ETBR

Die Messung der Oberflächenexpression von ETAR und ETBR für die HL60-Zelllinie erfolgte ebenso mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 20) nach Differenzierung der Zellen durch DMSO wie oben beschrieben. Auf der X-Achse ist hier die Fluoreszenz der Brilliant Violet 421-markierten anti-ETAR-AK, anti-ETBR-AK bzw. der Färbung mit sekundärem Antikörper dargestellt. Auf der Y-Achse sind die Zellen nach Granularität im SSC bzw. nach der Anzahl aufgetragen. Es ist eine bimodale Verteilung der Rezeptorexpression von ETAR bzw. ETBR zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die Färbung mit sekundärem Antikörper eine unimodale Verteilung, zudem zeigt sich wenig Hintergrundrauschen. Je heller die Fluoreszenz erscheint, desto höher ist die Dichte des gebundenen Antikörpers, die der Rezeptordichte entspricht. Die Darstellung der Rezeptorexpression erfolgte ebenfalls als Δ MFI. Außerdem wird in Abbildung 20C und -F erneut die Überlagerung der Fluoreszenzmuster der ETAR- bzw. ETBR-Färbung und der Färbung mit sekundärem Antikörper dargestellt, der überlappende Bereich wurde durch die Verwendung von Δ MFI herausgerechnet.

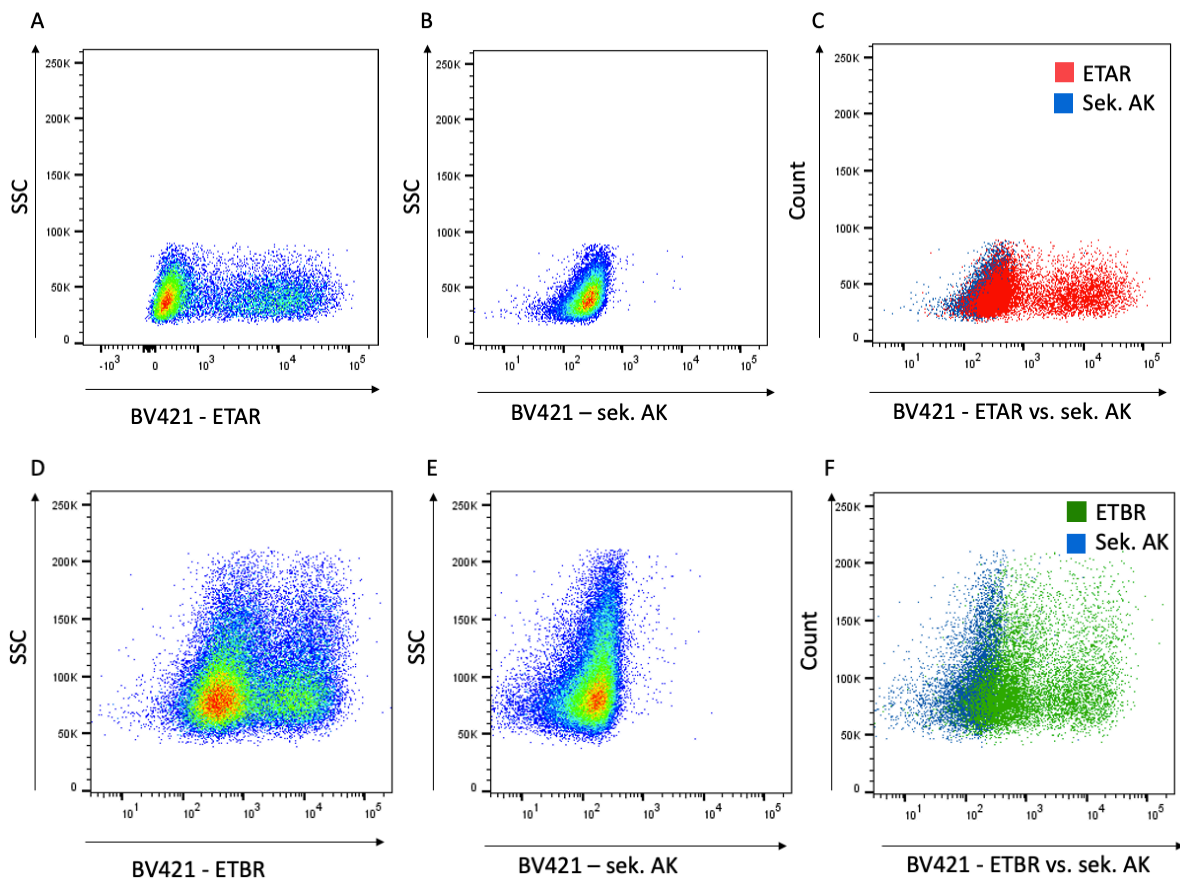


Abbildung 20: Verteilung der ETAR- bzw. ETBR-Expression in einer HL60-Zellpopulation. Darstellung der ETAR-Färbung in (A) und ETBR-Färbung in (D) vs. Kontrolle mit sekundärem Antikörper in (B) und (E). Überlagerung der Fluoreszenzmuster von ETAR und der Kontrolle in (C) bzw. ETBR und der Kontrolle in (F).

Zur Beurteilung der Rezeptorexpression wurde die ΔMFI errechnet. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM (Abbildung 21).

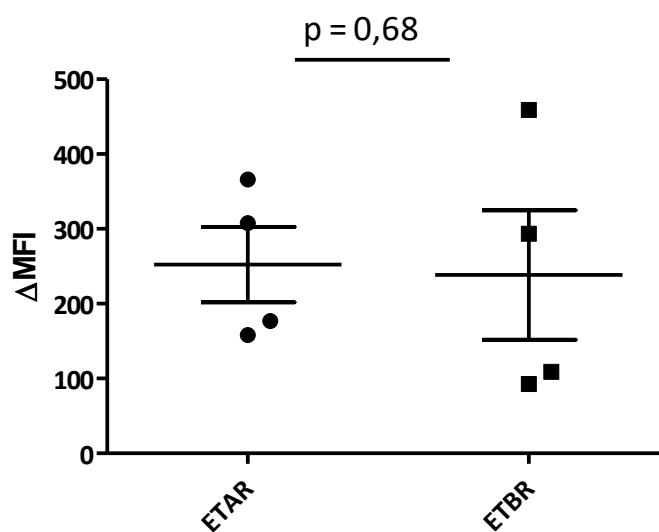


Abbildung 21: ETAR- und ETBR-Expression einer HL60-Zellpopulation. Gezeigt ist die ΔMFI . $n = 4$. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Die mittlere ETAR-Oberflächenexpression auf differenzierten HL60-Zellen ergab einen Wert von $252,1 \pm 50,5$. Für die mittlere ETBR-Oberflächenexpression auf differenzierten HL60-Zellen betrug der Wert $238,5 \pm 86,5$. Die mittlere ETAR- und der ETBR-Oberflächenexpression auf differenzierten HL60-Zellen unterscheidet sich somit nicht.

3.1.2.3 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten bei SSc und bei HC exprimieren ETAR und ETBR

Darüber hinaus wurde die Oberflächenexpression der Endothelinrezeptoren Typen A und B auf humanen PMN durchflusszytometrisch gemessen (vgl. Abbildung 22). Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität des BV 421-markierten anti-ETAR-AK bzw. des Kontrollansatzes dargestellt. Auf der Y-Achse sind in Abbildung 22 die Zellen nach Granularität im SSC aufgetragen. Wie bereits oben beschrieben erfolgte die Darstellung der Rezeptorexpression als Δ MFI. In Abbildung 22C ist die Überlagerung der Fluoreszenzmuster der ETAR-Färbung und der Kontroll-Färbung zu sehen, der überlappende Bereich wurde durch die Verwendung von Δ MFI herausgerechnet.

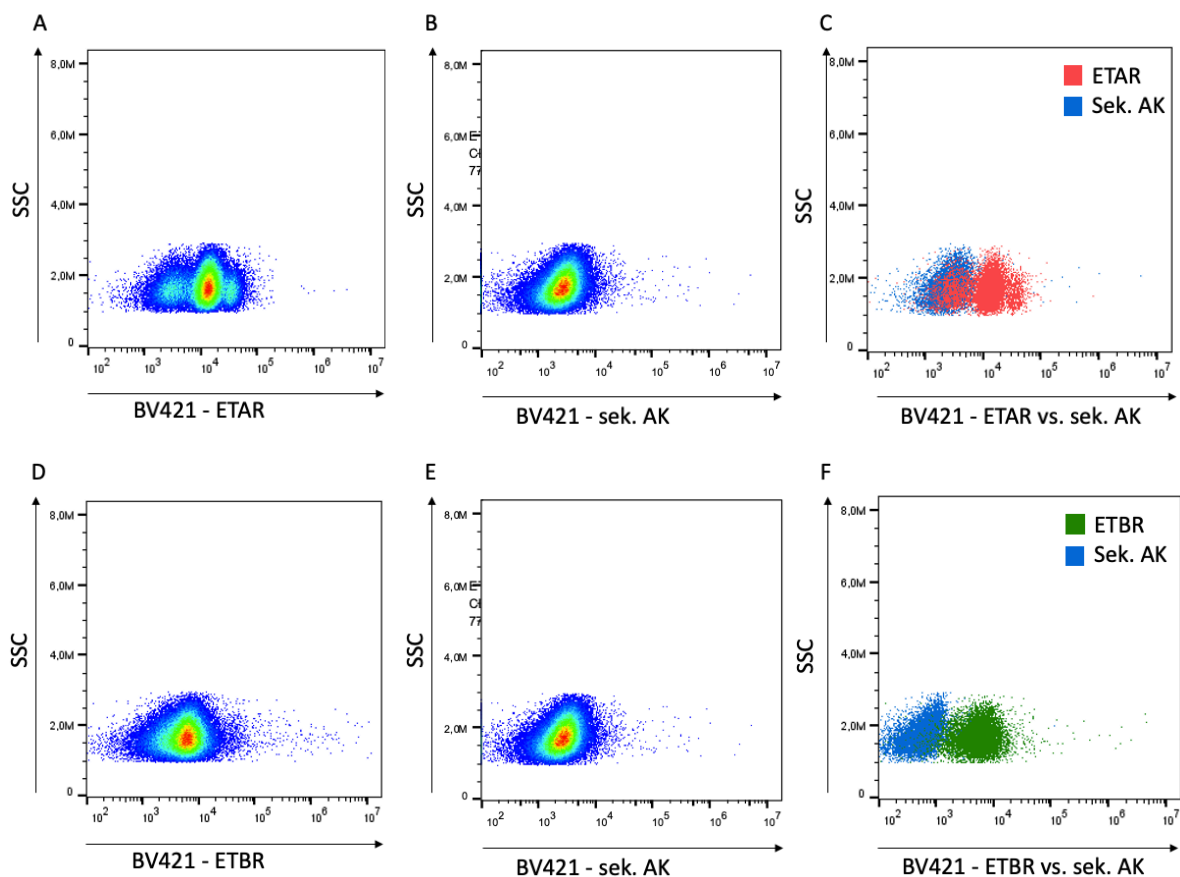


Abbildung 22: Repräsentative Darstellung der ETR-Expression von PMN bei SSc. (A) Verteilung der PMN-Population nach Färbung auf ETAR, (D) Verteilung der PMN-Population nach Färbung auf ETBR, (B) und (E)

Kontrollansatz mit sekundärem Antikörper (C) und (F) Überlagerung der Fluoreszenzmuster von ETAR bzw. ETBR und der Kontrolle.

Es erfolgte nun die Analyse der Oberflächenexpression von ETAR und ETBR auf PMN bei der SSc in Gegenüberstellung zu Gesunden. Die Ergebnisse gehen aus Abbildung 23 hervor.

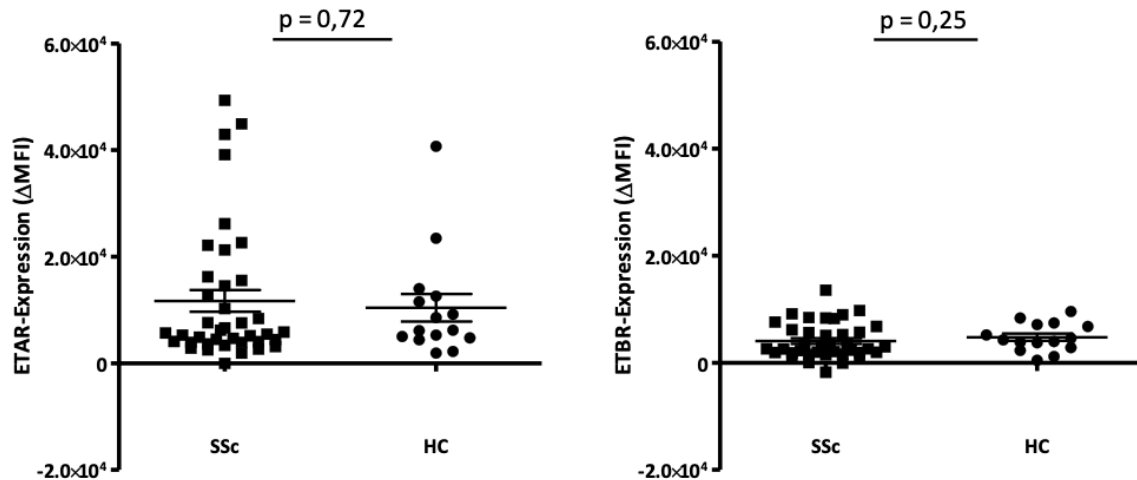


Abbildung 23: ETR-Expression von PMN bei Systemische Sklerose-Patient*innen und Gesunden. Dargestellt ist jeweils die ΔMFI von ETAR in (A) und ΔMFI von ETBR in (B). Darstellung des Mittelwerts sowie des SEM bei der SSc (n = 38) und HC (n = 15). p-Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Die ΔMFI für die Expression beider Endothelinrezeptoren auf humanen PMN ist bei SSc-Patient*innen und den gesunden Kontrollen nahezu identisch. Bei der SSc wurde die mittlere ETAR-Expression auf PMN mit einem Wert von $11\,700 \pm 205$ und bei Gesunden mit einem Wert von $10\,402 \pm 2591$ bestimmt. Im Hinblick auf die mittlere ETBR-Expression auf PMN betrug der Wert $4\,060 \pm 537,4$ bei der SSc. Bei Gesunden betrug die mittlere ETBR-Expression auf PMN $4\,780 \pm 679,9$. Insgesamt ist die Oberflächenexpression von ETAR auf PMN sowohl bei SSc-Patient*innen ($p = 0,0006$) als auch bei Gesunden ($p = 0,017$) signifikant höher als die von ETBR.

3.1.2.3.1 Die ETAR/ETBR-Oberflächenexpressionsratio auf humanen PMN zeigt keinen Unterschied zwischen SSc-Patient*innen und gesunden Proband*innen

Im nächsten Schritt dieser Analyse wurden die aus Abbildung 23 ersichtlichen ETAR-Werte zu den ETBR-Werten in Relation gesetzt (Abbildung 24). Auf der X-Achse sind die SSc-Gruppe (n = 38) und die gesunde Kontrollgruppe (n = 15) dargestellt. Auf der Y-Achse sind die zugehörigen Quotienten aus ETAR-/ETBR-Expression abgebildet.

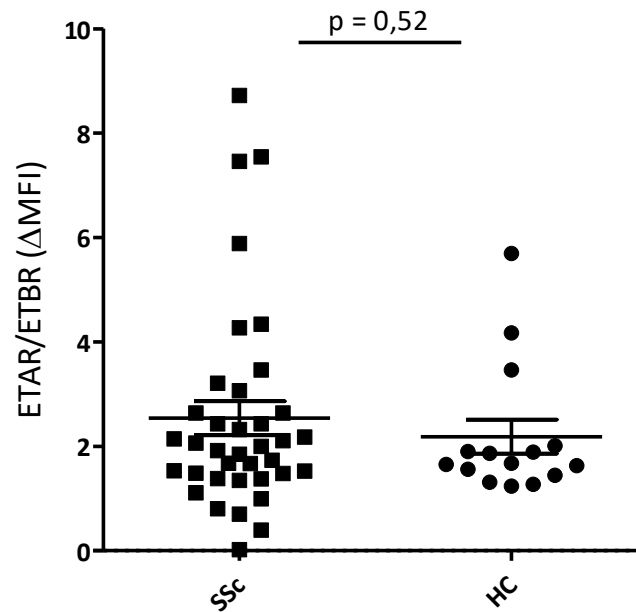


Abbildung 24: Expressionsratio von ETAR- Δ MFI/ETBR- Δ MFI bei SSc-Patient*innen in Gegenüberstellung zu gesunden Kontrollen. Darstellung des Mittelwerts $\pm$ SEM der Einzelwerte. SSc: $n = 38$, HC: $n = 15$. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Der Mittelwert bei SSc-Patient*innen betrug $2,54 \pm 0,33$ SEM. Bei gesunden Kontrollen betrug der Mittelwert $2,18 \pm 0,33$ SEM. Hinsichtlich der ETAR/ETBR-Expressionsratio zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Proband*innen und SSc-Patient*innen.

3.1.2.3.2 Die ETAR/ETBR-Oberflächenexpressionsratio auf humanen PMN korreliert mit dem klinischen Entzündungsparameter CRP bei der SSc

Um die klinische Relevanz der ETAR-Expression auf CD15⁺ polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) bei der SSc darzustellen, erfolgte die Korrelation diverser klinischer Parameter (dargestellt auf der X-Achse) mit der ETAR/ETBR-Expressionsratio (dargestellt auf der Y-Achse). Es fand sich eine statistisch signifikante schwache negative Korrelation des Entzündungsparameters CRP mit dem Quotienten aus ETAR- und ETBR-Oberflächenexpression auf humanen PMN (Abbildung 25). Mit steigendem CRP-Wert sinkt der Quotient für die ETAR/ETBR-Oberflächenexpression auf humanen PMN.

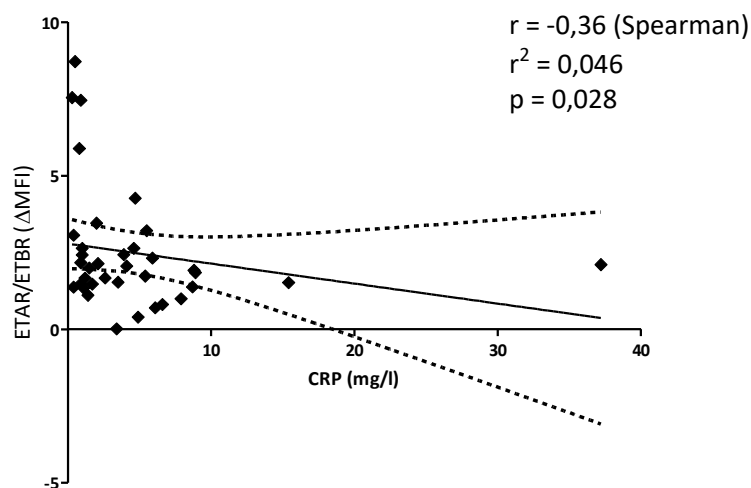


Abbildung 25: Korrelation von CRP-Werten bei SSc mit der ETAR/ETBR-Expressionsratio auf humanen PMN. Korrelation nach Spearman-Testung bei fehlender Normalverteilung der Werte.

Im Hinblick auf Assoziationen zwischen der ETR-Expression humaner PMN und der Diffusionskapazität der Lunge (DLCO), der forcierten Vitalkapazität (FCV), dem Tiffenau-Index (FVC/DLCO), dem Hautscore mRSS und der Höhe der anti-ETAR-AK (Abbildung 26) ergaben sich keine statistisch signifikanten Werte.

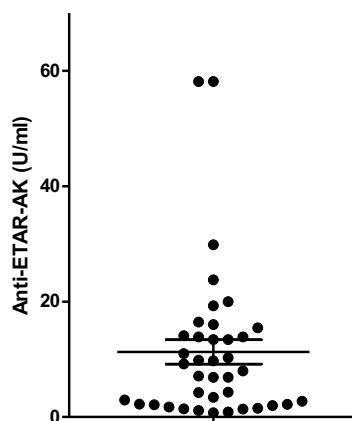


Abbildung 26: Höhe der anti-ETAR-Antikörper-Titer (ETAR ab) in U/ml der untersuchten Kohorte von SSc-Patient*innen. Die Messung ist erfolgt durch Dr. Harald Heidecke, CellTrend GmbH, Luckenwalde, Brandenburg, Germany.

3.2 Einfluss von Endothelinrezeptor-Antagonisten auf Vitalität und Funktionalität von PMN und Colo357-Zellen

3.2.1 Die Vitalität von Colo357-Zellen und humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten nicht gemindert

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob bzw. inwieweit Sitaxentan oder Ambrisentan humane PMN und Colo357-Zellen durch Induktion von Apoptose oder Nekrose schädigen. Die Färbung mit Hoechst markierte den Zellkern, Annexin V wurde als Apoptosemarker gewertet und Ethidium Homodimer III als Nekrosemarker. Eine doppelte Positivität für Annexin V und Ethidium Homodimer III spricht für schweren Zellschaden. Die „gating“-Strategie wurde, wie bereits in Abbildung 9 bzw. Abbildung 10 beschrieben, wie folgt ausgeführt: Gating zuerst nach Zellpopulation und dann nach Hoechst-positiven Zellen, anschließend wurden diese im *dot plot* nach Annexin V und Ethidium Homodimer III aufgetragen. In Abbildung 27 sind die einzelnen Proben gezeigt. Die Quadranten zeigen in Q1: nekrotische Zellen (Ethidium Homodimer positiv, Annexin V negativ), in Q2: schwergeschädigte Zellen (Ethidium Homodimer positiv, Annexin V positiv), in Q3: apoptotische Zellen (Ethidium Homodimer negativ, Annexin V positiv) und in Q4: vitale Zellen (Ethidium Homodimer negativ, Annexin V negativ).

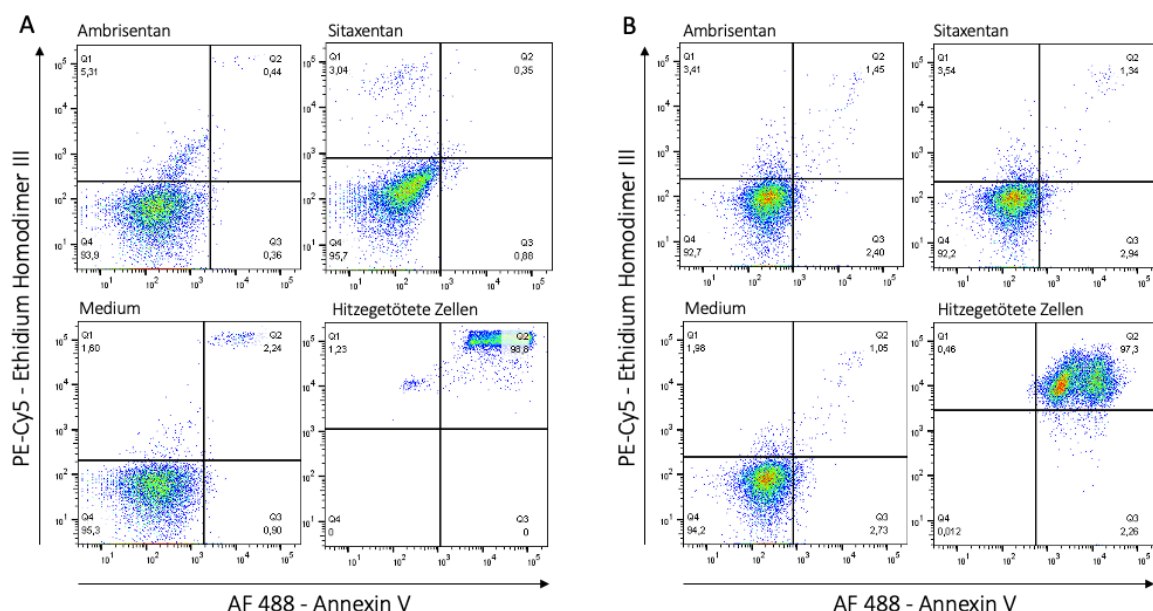


Abbildung 27: Vitalität nach Inkubation mit ETAR-Antagonisten. Dot plots für humane PMN (A) und Colo357 (B). Auftrag von Annexin V gegen Ethidium Homodimer III zur Identifikation von nekrotischen (Q1), schwergeschädigten Zellen (Q2) apoptotischen (Q3) und vitale (Q4) Zellen.

Die Histogramme für die jeweiligen Zellen und Ansätze (Ambrisentan, Sitaxentan, Medium als Negativkontrolle und hitzegetötete PMN bzw. Colo357-Zellen als Positivkontrolle) wurden nach den o. g. Markern aufgetragen und verglichen (hierzu vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29).

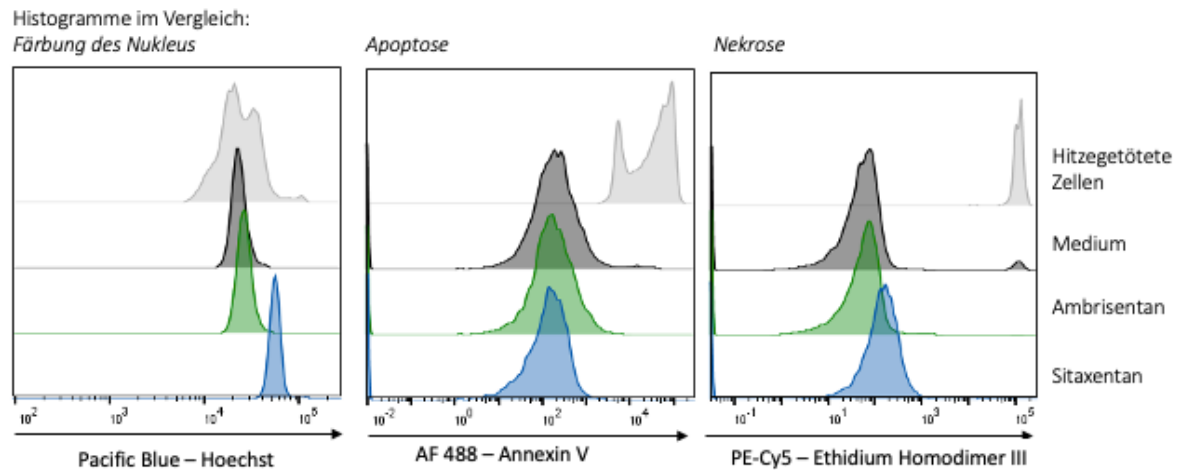


Abbildung 28: Einfluss von Ambrisentan und Sitaxentan auf die Vitalität von PMN. Histogramm der Nukleusfärbung (Hoechst), der Apoptose (Annexin V) und der Nekrose (Ethidium Homodimer III). Hitzegetötete Zellen dienen als Positivkontrolle, der Mediumansatz dient als Negativkontrolle.

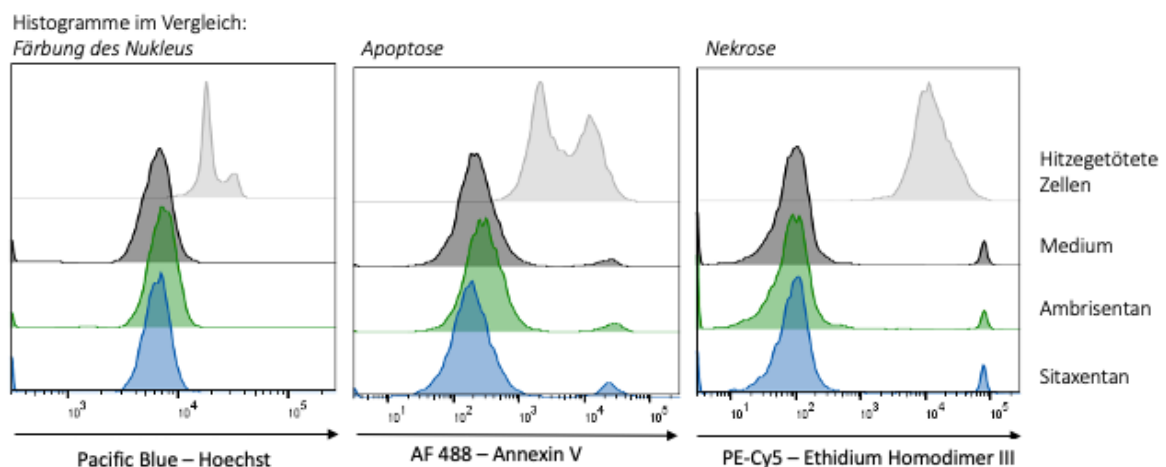


Abbildung 29: Einfluss von Ambrisentan und Sitaxentan auf die Vitalität von Colo357-Zellen. Histogramm der Nukleusfärbung (Hoechst), der Apoptose (Annexin V) und der Nekrose (Ethidium Homodimer III). Hitzegetötete Zellen dienen als Positivkontrolle, der Mediumansatz dient als Negativkontrolle.

Wie aus Abbildung 28 und Abbildung 29 ersichtlich, wurde sowohl bei PMN als auch bei der Colo357-Zelllinie das Fluoreszenzfärbemuster von Annexin V und Ethidium Homodimer III durch die ETAR-Antagonisten nicht relevant beeinflusst. Hingegen weist das Fluoreszenzmuster der hitzegetöteten Zellen für Annexin V als Indikator für Apoptose und Ethidium Homodimer III als Indikator für Nekrose eine deutliche Verschiebung auf. Die

Daten über Einfluss von Sitaxentan auf PMN wurden, wie oben bereits erwähnt, von Otavio Cabral-Marques erhoben.

Die Prozentsätze der Ursprungspopulation (*frequency of parent*) sind in Abbildung 30 dargestellt. Hier ist abzulesen, dass sowohl PMN als auch Colo357-Zellen in etwa gleichen Prozentsätzen Hoechst positiv und gleichzeitig doppelt-negativ für Annexin V und Ethidium Homodimer III sind, ungeachtet dessen ob sie lediglich in Medium oder mit Ambrisentan bzw. Sitaxentan inkubiert wurden (jew. > 90% vitale Zellen). Durch die ETAR-Antagonisten wurden im Vergleich zur Negativkontrolle weder Apoptose noch Nekrose ausgelöst. Gleichzeitig blieb die Integrität des Nukleus intakt. Die Positivkontrolle der hitzegetöteten Zellen hingegen zeigt eine Überrepräsentation einer doppelt-positiven Population für Annexin V und Ethidium Homodimer III als Zeichen für schweren Zellschaden.

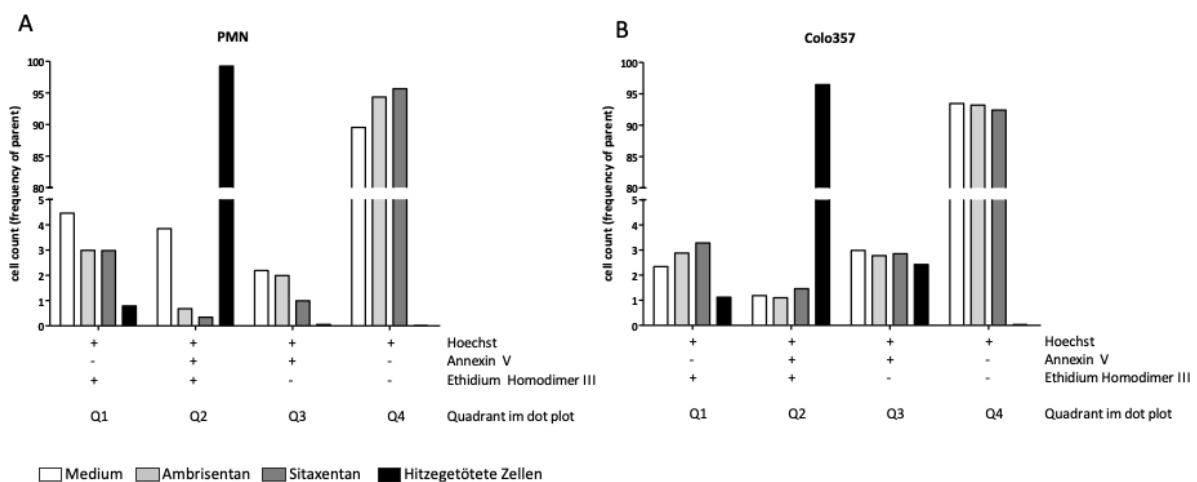


Abbildung 30: Vitalität für PMN (A) und Colo357-Zellen (B). Balkendiagramme: Zellzahl (cell count in frequency of parent) in % für Medium, Ambrisentan, Sitaxentan und Hitze-getötete Zellen. $n = 1$.

3.2.2 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten nicht beeinflusst

Im nächsten Versuch wurde der Einfluss der Endothelinrezeptor Typ A-Antagonisten auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als wichtigem Verteidigungsmechanismus der PMN untersucht. Hierfür wurde nach Stimulation mit PMA der Nachweis der gebildeten ROS durch Dihydrorhodamin (DHR) bzw. durch fluoreszierendes 123-Rhodamin erbracht. In Abbildung 31 ist die Fluoreszenzintensität für 123-Rhodamin nach Stimulation durch PMA bzw. ohne Stimulation im Mediumansatz (Negativkontrolle) im Histogramm zu sehen. Der Versuch wurde jeweils in An- und Abwesenheit der Endothelinrezeptor Typ A-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan

durchgeführt. Auf der X-Achse ist hierbei die Fluoreszenzintensität (MFI) von 123-Rhodamin dargestellt.

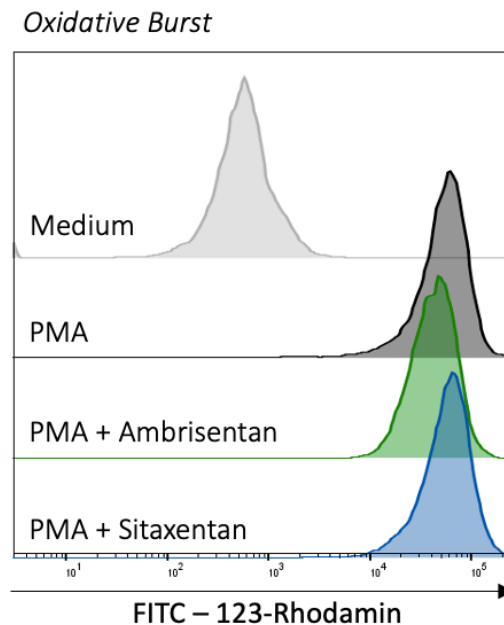


Abbildung 31: Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch humane PMN. Es sind die Histogramme der Fluoreszenzintensität von 123-Rhodamin (ROS-Indikator) für die Ansätze Medium (Negativkontrolle), PMA (Positivkontrolle) und PMA + Ambrisentan bzw. Sitaxentan dargestellt. Die Fluoreszenzintensität von 123-Rhodamin wurde durch die ETAR-Antagonisten nicht reduziert.

In Abbildung 32 ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Ansätze PMA sowie PMA + Sitaxentan bzw. Ambrisentan dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SEM aus jeweils Dreifachbestimmungen von zwei bzw. drei Versuchen. Die Stimulation mit PMA ergab jeweils eine mittlere MFI von $40\,199 \pm 2\,391$ bzw. $54\,798 \pm 685$, während die mittlere MFI bei PMA + Ambrisentan $45\,206 \pm 3\,370$ und bei PMA + Sitaxentan $56\,140 \pm 2\,027$ betrug.

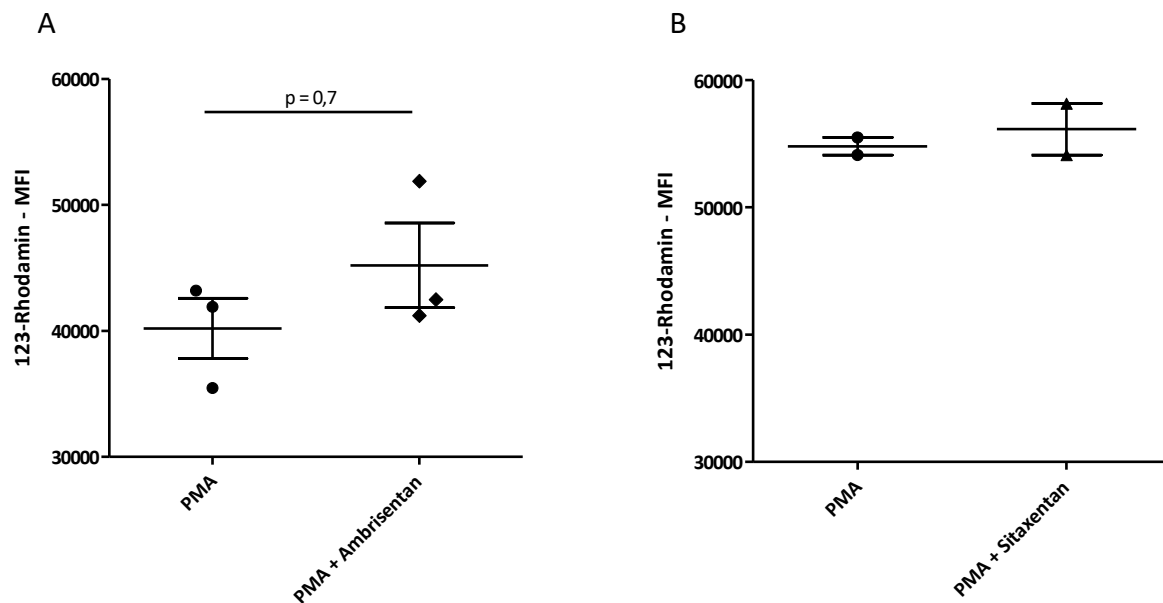


Abbildung 32: Nachweis von Reaktiven Sauerstoffspezies produziert durch humane PMN nach Inkubation mit ETAR-Antagonisten. MFI von 123-Rhodamin nach Stimulation mit PMA mit bzw. ohne ETAR-Antagonisten, in (A) für Ambrisentan, in (B) für Sitaxentan dargestellt. $n = 3$ für Ambrisentan, $n = 2$ für Sitaxentan. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Die Versuche fanden in zwei Reihen statt. Daher wurden auch zwei verschiedene PMA-Experimente zum Vergleich gemessen und zur Analyse herangezogen. Obwohl die Zugabe der ETAR-Antagonisten im Mittel jeweils zu einer leichten Zunahme der ROS-Bildung führte, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit PMA. Somit kann man davon ausgehen, dass der Zusatz von Ambrisentan oder Sitaxentan unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Produktion von ROS durch humane PMN nicht substantiell beeinflusst.

3.2.3 Die Phagozytosekapazität von humanen PMN bleibt durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten unbeeinflusst

Die Phagozytosekapazität von humanen PMN wurde durchflusszytometrisch im Vollblut bzw. *ex vivo* anhand der Aufnahme von FITC-markierten *Staphylococcus aureus*-Partikeln gemessen (Abbildung 33). Hier dargestellt sind die Populationen der *Staph. aureus*-positiven PMN (*frequency of parent, %*) nach oben beschriebener Gating-Strategie (Abbildung 12). Auf der X-Achse sind die Ansätze *Resting* (Mediumansatz, Kontrolle) und PMN nach Inkubation mit Sitaxentan bzw. Ambrisentan dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Phagozytosekapazität (%) angegeben. Im Mediumansatz beträgt die mittlere Phagozytosekapazität der humanen PMN $93,9 \pm 2,4$ SEM. Nach Inkubation der PMN mit

Ambrisentan ($93 \pm 2,3$) und Sitaxentan ($93,4 \pm 2,3$) verändert sich die mittlere Phagozytosekapazität nur marginal.

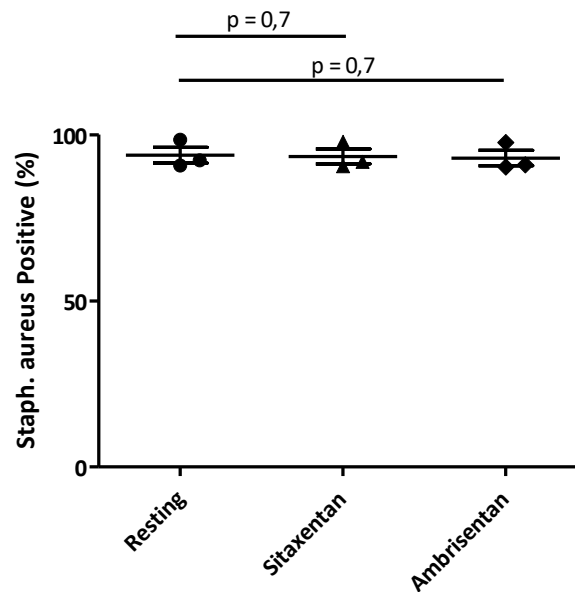


Abbildung 33: Zellpopulation von humanen PMN für *Staph. aureus*-Positive (%). Darstellung der Einzelexperimente sowie Mittelwert $\pm$ SEM. $n = 3$. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Zwischen den Ansätzen fanden sich keine Unterschiede. Somit kann man davon ausgehen, dass die verwendeten ETAR-Antagonisten unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Phagozytosekapazität von humanen PMN haben. Abbildung 34 bestätigt diese Beobachtung. Zu sehen sind jeweils humane PMN mit blau gefärbtem Zellkern (Hoechst) und grünen, phagozytierten *Staph. aureus*-Partikeln im Zytoplasma.

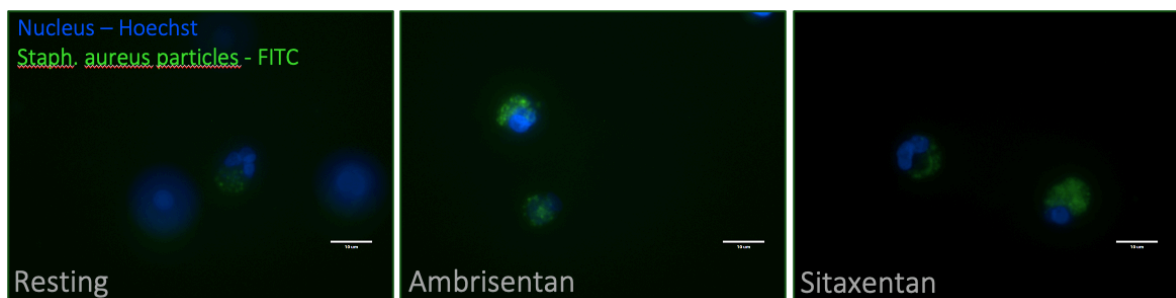


Abbildung 34: Phagozytose von PMN nach Inkubation mit/ohne ETAR-Antagonisten als Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung nach Phagozytose-Assay von humanen PMN. Im Vergleich Resting-Ansatz, Sitaxentan- und Ambrisentan-Ansatz.

3.2.4 Die Behandlung von Colo357- und MDA-MB-231-Zellen mit Sitaxentan und Ambrisentan deuten auf proliferationshemmende Eigenschaften hin

Zur Untersuchung des Einflusses der zwei Endothelinrezeptor Typ A-Antagonisten auf die Proliferation der Pankreaskarzinom-Zelllinie Colo357 sowie der Mammakarzinom-Zelllinie

MDA-MB-231 wurden diese wie oben beschrieben mit CFSE angefärbt (vgl. 2.2.4.4). In Abbildung 35 sind die Histogramme der verschiedenen Ansätze im Proliferationsversuch gegenübergestellt. Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität (MFI) von CFSE als Proliferationsmarker zu sehen. Die Fluoreszenz verhält sich umgekehrt proportional zur Generationszahl. Es ist jeweils der Medium-Ansatz als Kontrolle an Tag 0 bzw. Tag 5 dargestellt sowie die Ansätze, die mit Ambrisentan oder Sitaxentan inkubiert wurden.

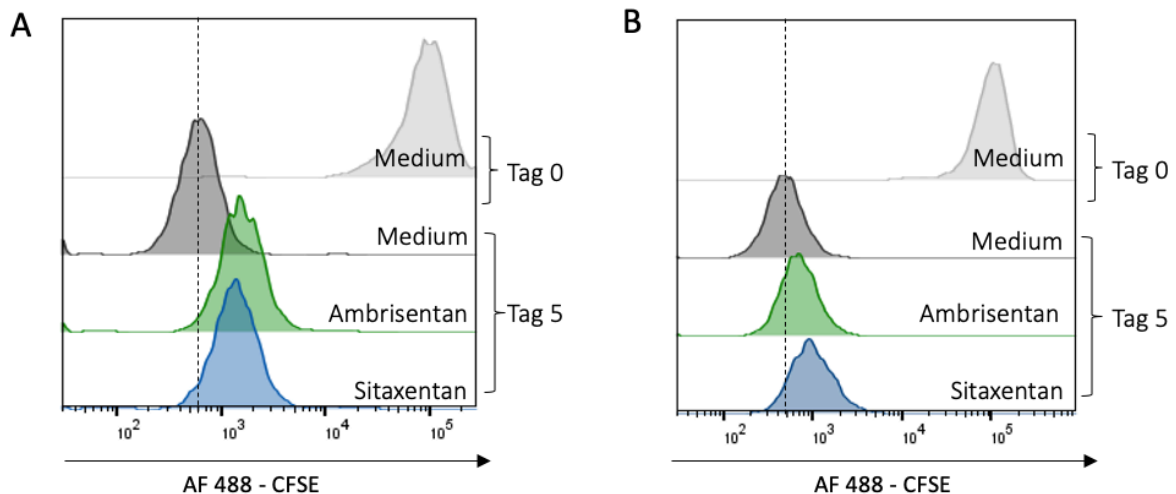


Abbildung 35: Histogramme im Vergleich nach 0 bzw. 5 Tagen Proliferation mit und ohne ETAR-Antagonisten. (A) Colo357-Zelllinie. (B) MDA-MB-231-Zelllinie. Das Fluoreszenzmaximum der Mediumkontrolle ist durch die gestrichelte Linie markiert.

Zu sehen ist, dass nach fünf Tagen die Fluoreszenz des Medium-Ansatzes eine stärkere Abnahme im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit ETAR-Antagonisten zeigt. Dies würde einer teilweisen Hemmung der Zellproliferation durch die verwendeten ETAR-Antagonisten entsprechen. In Abbildung 36 ist die mittlere Proliferation (MFI von CFSE) der einzelnen Ansätze jeweils gegenübergestellt. Die jeweiligen Zahlenwerte sind Tabelle 11 zu entnehmen.

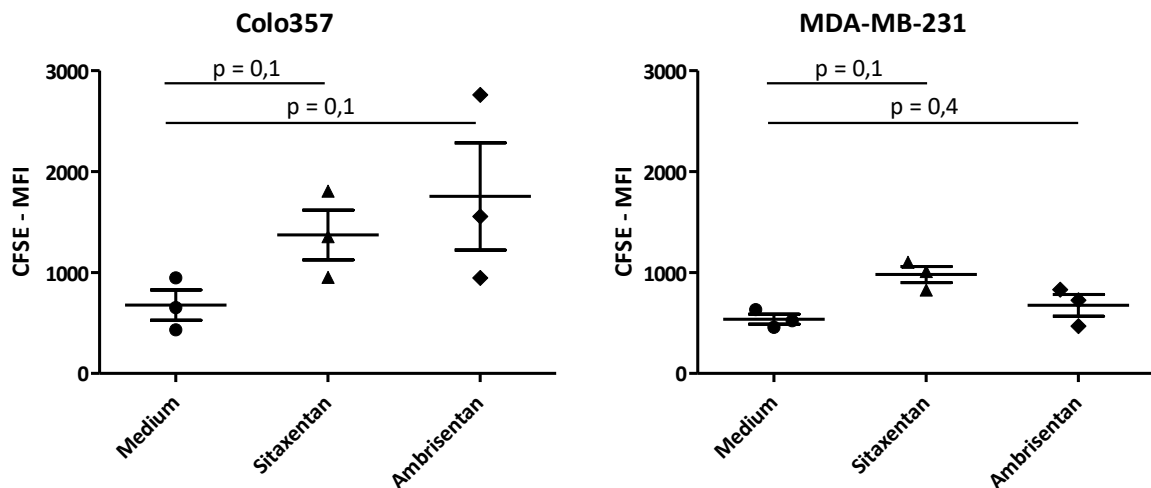


Abbildung 36: MFI von CFSE für Colo357- und MDA-MB-231-Zellen im Proliferations-Versuch nach 5 Tagen Proliferation mit/ohne ETAR-Antagonisten. Jew. $n = 3$. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik. (A) MFI für Medium vs. Sitaxentan bzw. Ambrisentan bei Colo357. (B) MFI für Medium vs. Sitaxentan bzw. Ambrisentan bei MDA-MB-231.

Tabelle 11: Mittelwerte $\pm$ SEM bei Colo357- und MDA-MB-231-Zellen im Proliferationsversuch.

Tumorzelllinie	Behandlung	Mittlere Proliferation (MFI) $\pm$ SEM
Colo357-Zellen	Medium	679 $\pm$ 149,2
	Sitaxentan	1 373 $\pm$ 246,8
	Ambrisentan	1 755 $\pm$ 532,1
MDA-MB-231-Zellen	Medium	538,7 $\pm$ 50,74
	Sitaxentan	981,4 $\pm$ 1,03
	Ambrisentan	676,2 $\pm$ 106,6

Im Vergleich der MFI nach oben beschriebener Gating-Strategie ist die mittlere Proliferation im Mediumansatz sowohl für Colo357- als auch für MDA-MB231-Zellen niedriger als die der Zellen nach Inkubation mit Sitaxentan oder Ambrisentan. Obwohl dies auf eine Hemmung der Proliferation durch die Behandlung mit den beiden ETAR-Antagonisten hindeuten könnte, spricht die fehlende statistische Signifikanz dagegen. Die mikroskopische Analyse (Abbildung 37 und Abbildung 38) deutet – wie die MFI – auf eine Reduktion der Zellzahlen hin. Bei der Colo357-Zelllinie war die Zellzahl nach 5-tägiger Inkubation durch Sitaxentan leicht und durch Ambrisentan deutlich verringert. Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigt sowohl nach Inkubation mit Sitaxentan als auch mit Ambrisentan eine verringerte Zellzahl in den phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen.

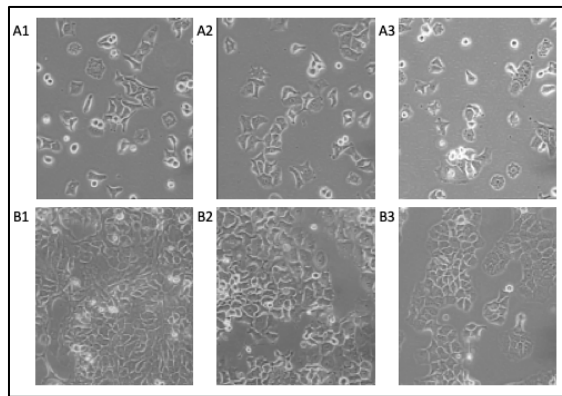


Abbildung 37: Colo357-Zellen im Phasenkontrastmikroskop vor und nach Proliferation (A) an Tag 0, (B) an Tag 5. (1) Medium-Ansatz (Negativkontrolle) (2) Ansatz mit Sitaxentan (3) Ansatz mit Ambrisentan.

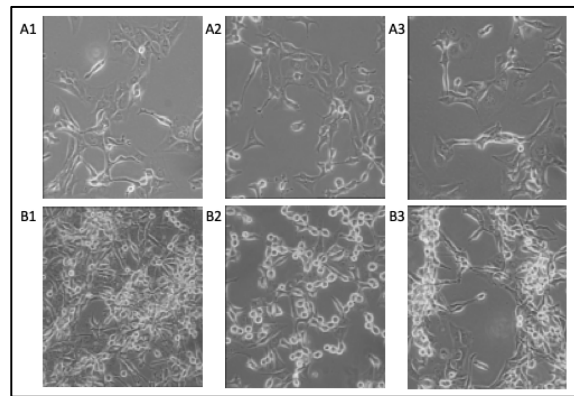


Abbildung 38: MDA-MB231-Zellen im Phasenkontrastmikroskop vor und nach Proliferation (A) an Tag 0, (B) an Tag 5. (1) Medium-Ansatz (Negativkontrolle) (2) Ansatz mit Sitaxentan (3) Ansatz mit Ambrisentan

3.3 Beeinflussung der *in vitro* Migration von humanen PMN und HL60 Zellen durch ETAR-Antagonisten

3.3.1 Die *in vitro* Migration von humanen PMN wird durch Behandlung mit ETAR-Antagonisten dosisabhängig gehemmt

Der Einfluss von ETAR-Antagonisten auf die Migration von humanen PMN wurde *in vitro* im Transwell Assay untersucht. Zunächst wurden verschiedene Dosierungen der ETAR-Antagonisten getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Auf der X-Achse ist die logarithmierte Konzentration der verwendeten ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Migration in *events/μl* nach automatisierter Zählung am Durchflusszytometer dargestellt. Die oberen beiden Graphen entsprechen Versuchsansätzen mit fMLP-Stimulierung, die unteren beiden Graphen zeigen die Spontanmigration der Zellen.

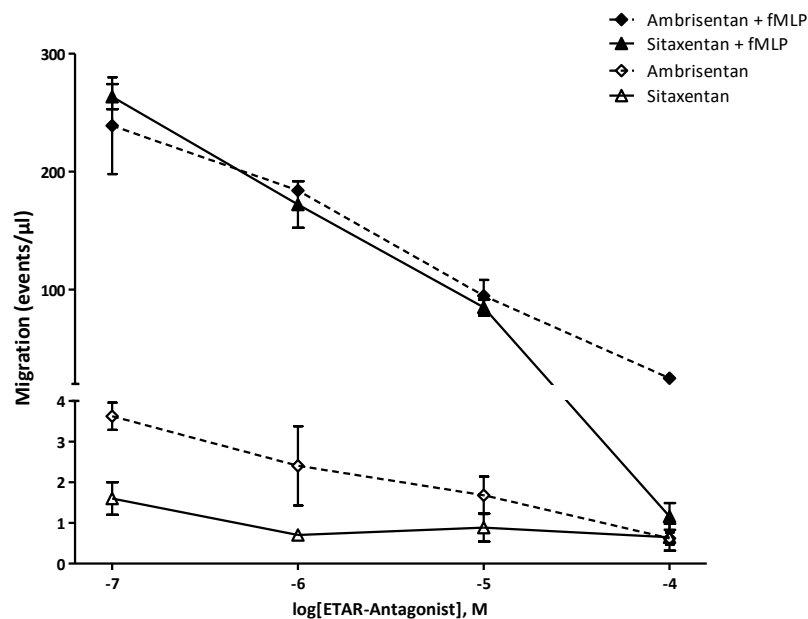


Abbildung 39: Dosis-Wirkungsbeziehung von Sitaxentan und Ambrisentan auf die Migration von PMN. $n = 1$ (Doppelbestimmungen).

Aus Abbildung 39 geht hervor: je höher die applizierte Dosis des verwendeten ETAR-Antagonisten war, desto niedriger fiel die gemessene Migration der humanen PMN aus. Dies galt insbesondere für die durch fMLP stimulierte Migration, wurde jedoch auch bei der unstimulierten Migration beobachtet. In dem vorliegenden Experiment findet sich daher eine Dosis-Wirkungsbeziehung der verwendeten ETAR-Antagonisten auf die Migration von humanen PMN. Eine Dosis von $100 \mu\text{M}$ für Sitaxentan und Ambrisentan wurde für die folgenden Experimente gewählt. Die dosisabhängige Inhibition der Migration von humanen PMN durch zwei ETAR-Antagonisten wurde detaillierter untersucht. Die Ergebnisse dessen sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt. In Abbildung 40 sind auf der X-Achse die einzelnen Versuchsansätze gegenübergestellt. Auf der Y-Achse ist die Migration in $\text{events}/\mu\text{l}$ (A) bzw. prozentual in Relation zur Spontanmigration (B) dargestellt. Es sind die Einzelwerte sowie der jeweilige Mittelwert $\pm$ SEM abgebildet. In Abbildung 41 sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen PMN nach Durchführung des Transwell Assays gezeigt.

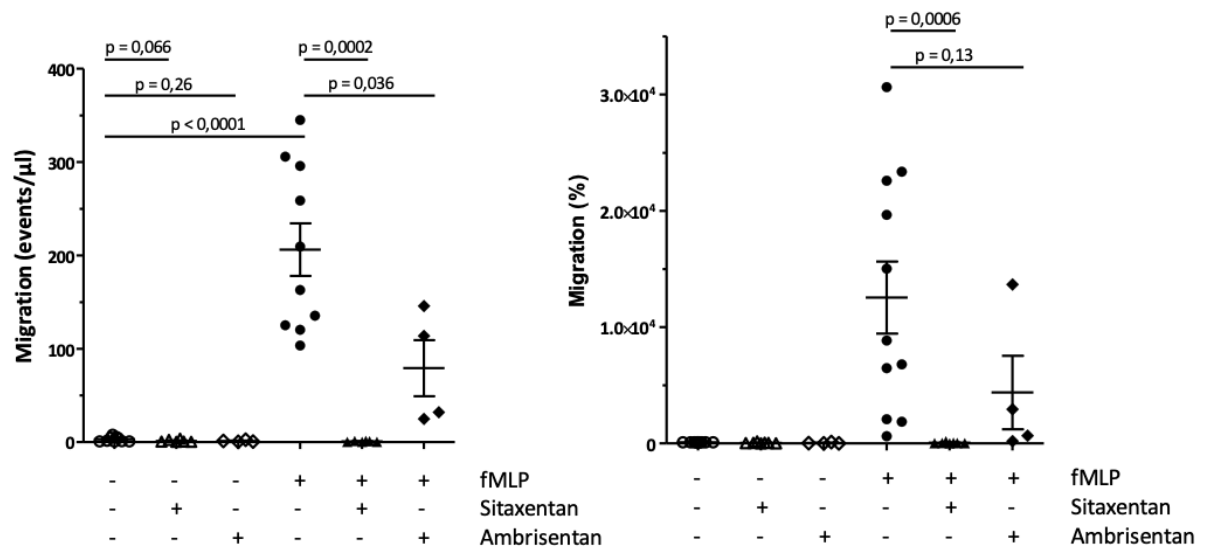
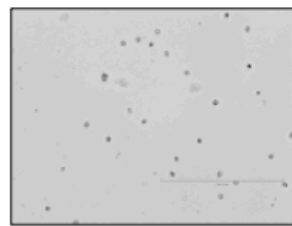
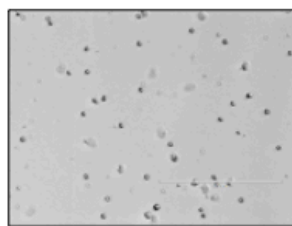


Abbildung 40: Migration von humanen PMN im Transwell Assay. Stimuliert/unstimuliert durch fMLP mit bzw. ohne Sitaxentan bzw. Ambrisentan (100 μM), Medium als Negativkontrolle. $n \geq 4$. p-Werte siehe Graphik (A) Anzahl der migrierten Zellen (events/μl). (B) Anzahl der migrierten Zellen (%) in Relation zur Spontanmigration (Negativkontrolle).

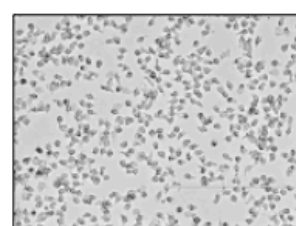
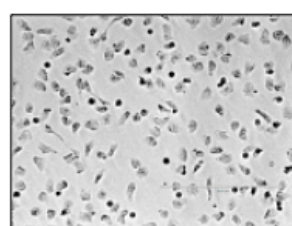
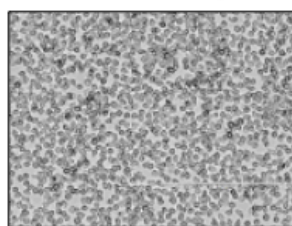
Unstimulierte Migration



Sitaxentan

Ambrisentan

Stimulierte Migration durch fMLP



fMLP

fMLP +
Sitaxentan

fMLP +
Ambrisentan

Abbildung 41: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von PMN im Transwell Assay.

In diesem *in vitro* Experiment wurde gezeigt, dass die fMLP-stimulierte Migration von humanen PMN durch Ambrisentan und vor allem durch Sitaxentan signifikant gehemmt wird. (p-Werte siehe Abbildungsunterschrift). Ebenso wurde die Spontanmigration durch Sitaxentan gemindert, statistisch war jedoch nur ein Trend zu beobachten. Als

Positivkontrolle wurde der Mediumansatz mit fMLP stimuliert, hier fand sich erwartungsgemäß eine signifikante Zunahme der Migration (Abbildung 40 A). Bei der Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit zur Spontanmigration (Abbildung 40 B) zeigte sich bei Sitaxentan und Ambrisentan eine Reduktion der Migration im stimulierten Versuch, allerdings erreichte nur die Behandlung mit Sitaxentan eine statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse werden durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 41 gestützt. Die Mittelwerte sowie der SEM sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Mittelwerte $\pm$ SEM bei humanen PMN im Migrationsversuch.

Ansatz	Behandlung	Mittlere Anzahl der migrierten PMN (<i>events/μl</i>) $\pm$ SEM	Mittelwert (%) $\pm$ SEM
Unstimuliert	Medium	3,0 $\pm$ 0,9	100 $\pm$ 0
	Sitaxentan	1,3 $\pm$ 0,6	53,7 $\pm$ 21,1
	Ambrisentan	1,6 $\pm$ 0,5	40,8 $\pm$ 24,9
Stimuliert (fMLP)	Medium	206,3 $\pm$ 28,2	12 539 $\pm$ 3 091
	Sitaxentan	0,8 $\pm$ 0,2	57,3 $\pm$ 23,2
	Ambrisentan	79,2 $\pm$ 30,0	4 375 $\pm$ 3 156

3.3.2 Die fMLP-stimulierte *in vitro* Migration von HL60-Zellen wird durch Behandlung mit Sitaxentan gehemmt

Die *in vitro* Migrationskapazität der promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 wurde im Transwell Assay untersucht. Die Daten hierzu sind in Abbildung 42 zu sehen, ausgedrückt jeweils auf der Y-Achse in Absolutwerten (*events/ μ l*) in (A) und prozentual in Relation zur Negativkontrolle in (B). Auf der X-Achse sind die verschiedenen Ansätze des Versuches dargestellt. Es sind die Einzelwerte und der jeweilige Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. In Abbildung 43 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von HL60-Zellen zu sehen, die nach Durchführung des Transwell Assays in An- bzw. Abwesenheit der verwendeten ETAR-Antagonisten aufgenommen wurden.

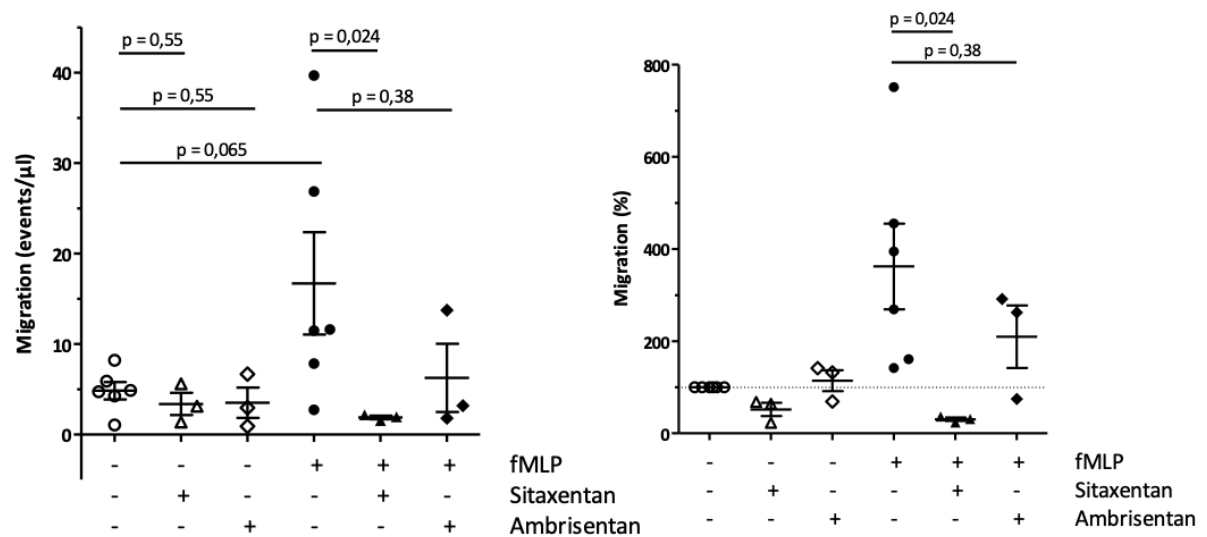
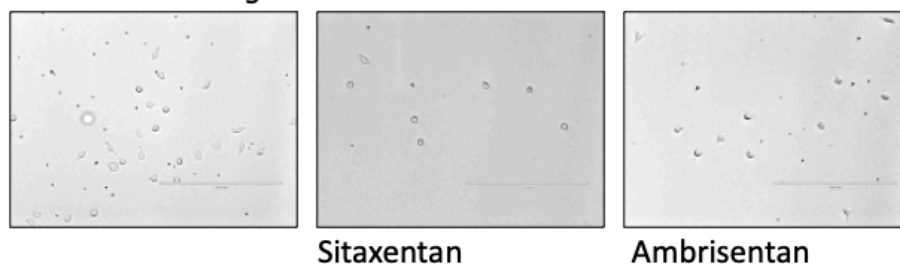


Abbildung 42: Migration von HL60-Zellen im Transwell Assay. Stimuliert/unstimuliert durch fMLP mit/ohne Sitaxentan bzw. Ambrisentan, Medium als Negativkontrolle. $n \geq 3$. p -Werte siehe Graphik (A) Anzahl der migrierten Zellen (events/μl). (B) Anzahl der migrierten Zellen (%) in Relation zur Spontanmigration (Negativkontrolle).

Unstimulierte Migration



Stimulierte Migration durch fMLP

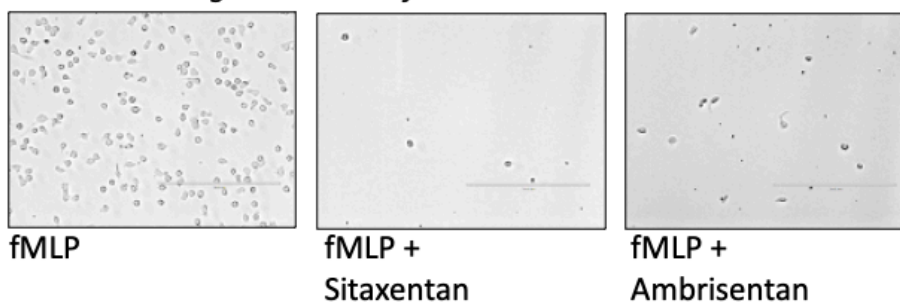


Abbildung 43: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Effekts von Sitaxentan und Ambrisentan auf HL60-Zellen im Transwell Assay.

Die Stimulation von HL60-Zellen durch fMLP als Positivkontrolle bewirkte eine Zunahme der Migration. Allerdings liegt hier lediglich ein statistischer Trend vor. Im unstimulierten Ansatz haben die hinzugegebenen ETAR-Antagonisten keinen Einfluss auf die Migration. Im stimulierten Versuchsteil wurde eine signifikante Hemmung der Migration durch Sitaxentan beobachtet, während die Reduktion der Migration durch Ambrisentan nicht signifikant war. Diese Ergebnisse werden durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen in

Abbildung 43 gestützt. Die mittlere Anzahl der migrierten HL60-Zellen sowie der SEM sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Mittelwerte $\pm$ SEM bei HL60-Zellen im Migrationsversuch.

Ansatz	Behandlung	Mittlere Anzahl der migrierten HL60-Zellen (<i>events/μl</i>) $\pm$ SEM	Mittelwert (%) $\pm$ SEM
Unstimuliert	Medium	4,8 $\pm$ 1,0	100 $\pm$ 0
	Sitaxentan	3,4 $\pm$ 1,2	51,8 $\pm$ 14,4
	Ambrisentan	3,5 $\pm$ 1,7	114,1 $\pm$ 22,7
Stimuliert (fMLP)	Medium	16,7 $\pm$ 5,7	362 $\pm$ 93
	Sitaxentan	1,9 $\pm$ 0,2	30,5 $\pm$ 3,7
	Ambrisentan	6,3 $\pm$ 3,8	209,6 $\pm$ 68,0

3.4 Migration im Krebsmodell unter dem Einfluss von ETAR-Antagonisten

3.4.1 Die *in vitro* Migration von Colo357-Zellen wird durch die Behandlung mit Ambrisentan und Sitaxentan gehemmt

Wie oben beschrieben wurde die *in vitro* Migration der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Colo357 im Oris Migrationsassay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 sowie Abbildung 45 als repräsentative Aufnahmen nach o. g. Bearbeitung (vgl. Abschnitt 2.2.5.2) dargestellt. Auf der X-Achse in Abbildung 44 sind die verschiedenen Ansätze gegenübergestellt, auf der Y-Achse ist die migrierte Fläche in Pixel² dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert aus Vierfach-Ansätzen (an anderer Stelle bestimmt) $\pm$ deren SEM.

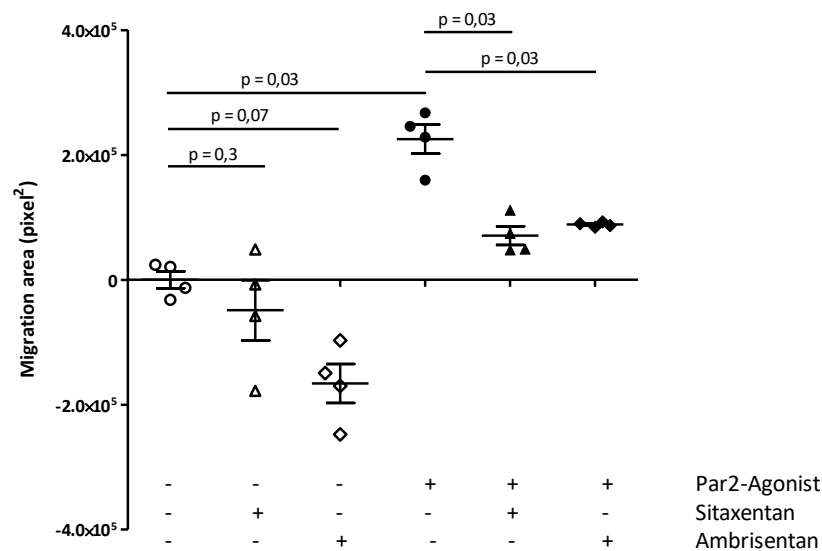


Abbildung 44: Migration der Colo357-Zelllinie im Oris Assay. Stimuliert (schwarze Symbole)/unstimuliert (weiße Symbole) unter Sitaxentan bzw. Ambrisentan; Angabe der Migrationsfläche in pixel² in Relation zur Negativkontrolle. Mittelwerte aus Quadriplets der Einzelerperimente bei $n = 4$. p -Werte (Mann-Whitney-Test) siehe Graphik.

Unstimulierte Migration



Stimulierte Migration durch Par2-Agonist



Abbildung 45: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von Colo357-Zelllinie im Oris Assay.

Es zeigte sich, dass die Stimulation der Colo357-Zellen durch den verwendeten Par2-Agonisten eine signifikante Steigerung der Migration bewirkte, wie bereits beschrieben (139,146). Unter unstimulierten Bedingungen wurde eine hemmende Wirkung von Sitaxentan und Ambrisentan auf die Migration von Colo357-Zellen beobachtet, jedoch

ohne statistische Signifikanz. Nach Stimulation mit dem Par2-Agonisten wurde sowohl mit Sitaxentan als auch mit Ambrisentan eine statistisch signifikante Hemmung der Migration beobachtet. Die Mittelwerte der Migrationsfläche sowie der SEM sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Migrationsfläche (Mittelwert $\pm$ SEM) von Colo357-Zellen im Migrationsversuch.

Ansatz	Behandlung	Mittlere Migrationsfläche (pixel ²) $\pm$ SEM
Unstimuliert	Medium	0 $\pm$ 13 567
	Sitaxentan	- 48 707 $\pm$ 48 272
	Ambrisentan	- 166 012 $\pm$ 31 229
Stimuliert (Par2-Agonist)	Medium	225 475 $\pm$ 23 317
	Sitaxentan	70 834 $\pm$ 14 947
	Ambrisentan	88 581 $\pm$ 1 910

3.4.2 Die *in vitro* Migration der OvCar3-Zellen wird durch Behandlung mit Sitaxentan gehemmt

Die Untersuchung der *in vitro* Migration der Ovarialkarzinom-Zelllinie OvCar3 erfolgte im Oris Migrationsassay, die Ergebnisse gehen aus Abbildung 46 sowie aus Abbildung 47 hervor. Wie bereits beschrieben sind die Werte für die Migrationsfläche in pixel² angegeben (Y-Achse) und in Relation zur Negativkontrolle (basale Migrationsfähigkeit, siehe erste Spalte) gesetzt. Zunächst wurde separat der Mittelwert aus den Vierfach-Ansätzen bestimmt. Diese sind für jedes Experiment in der Darstellung zu sehen, die Balken zeigen diese Mittelwerte $\pm$ deren SEM. Abbildung 47 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Ansätze.

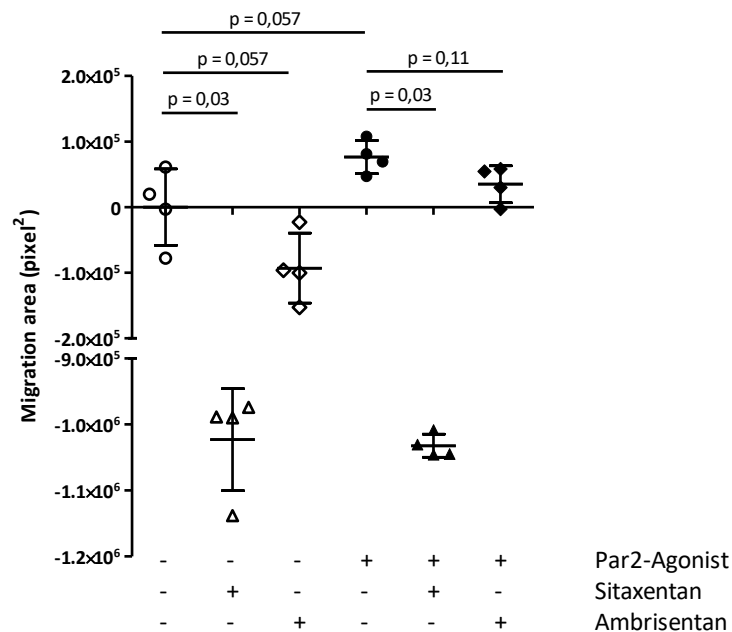


Abbildung 46: Migration der OvCar3-Zelllinie im Oris Assay. Stimuliert (schwarze Symbole)/unstimuliert (weiße Symbole) unter Sitaxentan bzw. Ambrisentan; Angabe der Migrationsfläche in pixel² und in Relation zur Negativkontrolle. Mittelwerte aus den Einzelexperimenten bei n = 4.

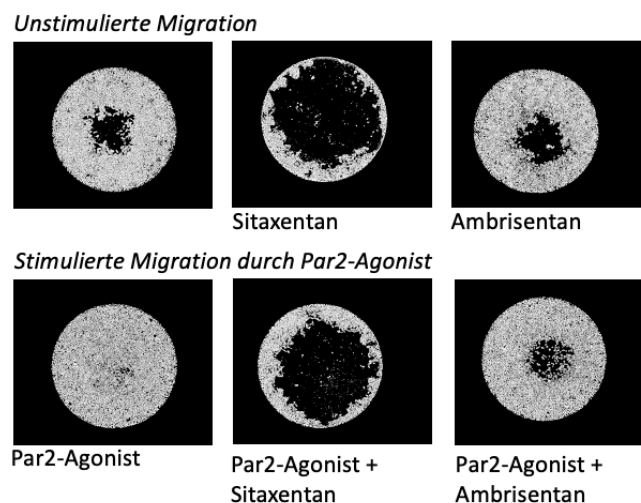


Abbildung 47: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von OvCar3-Zellen im Oris Assay.

Nach Stimulation mit dem Par2-Agonisten zeigte sich der Trend einer Zunahme der Migration. Unter unstimulierten aber auch unter stimulierten Bedingungen ergab die Inkubation der OvCar3-Zellen mit Sitaxentan eine statistisch signifikante Reduktion der Migration. Bezogen auf die basale Migrationsrate, zeigte sich nach Inkubation mit Ambrisentan der statistische Trend einer Reduktion der Migration. Die Behandlung mit Ambrisentan unter Stimulation mit dem Par2-Agonisten bewirkte zwar eine Reduktion der

Migration von OvCar3-Zellen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die mittlere Migrationsfläche sowie der SEM sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Mittelwerte $\pm$ Standardfehler von OvCar3-Zellen im Migrationsversuch.

Ansatz	Behandlung	Mittlere Migrationsfläche (pixel ²) $\pm$ SEM
Unstimuliert	Medium	0 $\pm$ 29 075
	Sitaxentan	- 1,023 $\times 10^6 \pm$ 38 662
	Ambrisentan	- 93 070 $\pm$ 26 686
Stimuliert (Par2-Agonist)	Medium	76 337 $\pm$ 12 673
	Sitaxentan	- 1,032 $\times 10^6 \pm$ 8 686
	Ambrisentan	34 988 $\pm$ 14 086

3.5 Die Behandlung mit Ambrisentan inhibiert die Aktivierung des Transkriptoms von Colo357-Zellen

Um die Wirkung der ETAR-Blockade durch Ambrisentan auf Genebene weiter zu untersuchen, führte Otavio Cabral-Marques in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe eine Transkriptomanalyse der Colo357-Zelllinie mittels RNA Sequenzierung durch. Das Transkriptom der Colo357-Zellen, die mit Ambrisentan und dem Par2-Agonisten behandelt wurden, zeigte bei der Analyse durch hierarchisches Clustering ein Muster, das unbehandelten Zellen ähnlicher war als Zellen, die nur mit dem Par2-Agonist behandelt wurden (144). In Übereinstimmung damit ergab die *Gene Set Variation Analysis* (GSVA), dass Ambrisentan allein in der Lage ist, die Aktivierung verschiedener Signalwege zu hemmen, die die Krebsinitiierung, -progression und -metastasierung fördern, wie z. B. die Caspase-vermittelte Spaltung von Zytoskelettproteinen und die Aktivierung der AP1-Familie von Transkriptionsfaktoren (Abbildung 48, rot markierte Bereiche). Ebenso verringerte Ambrisentan die Par2-induzierte Aktivierung von NF- κ B- und MAPK-Signalwegen sowie die Bildung von Tubulin-Faltungsintermediaten. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass eine ETAR-Blockade durch Ambrisentan multiple hemmende Wirkungen auf tumorfördernde Signalwege hat. Um diese Möglichkeit weiter zu prüfen, führten wir eine *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) durch, die eine hemmende Wirkung von Ambrisentan auf die Par2-Signalübertragung vorhersagte. Darüber hinaus deutete die IPA-Analyse auf einen möglichen Crosstalk zwischen ETAR und Wachstumsfaktorrezeptoren,

wie dem *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR), sowie auf Transaktivierungssignale mit anderen GPCR hin. Dies steht im Einklang mit früheren Studien (147–151).

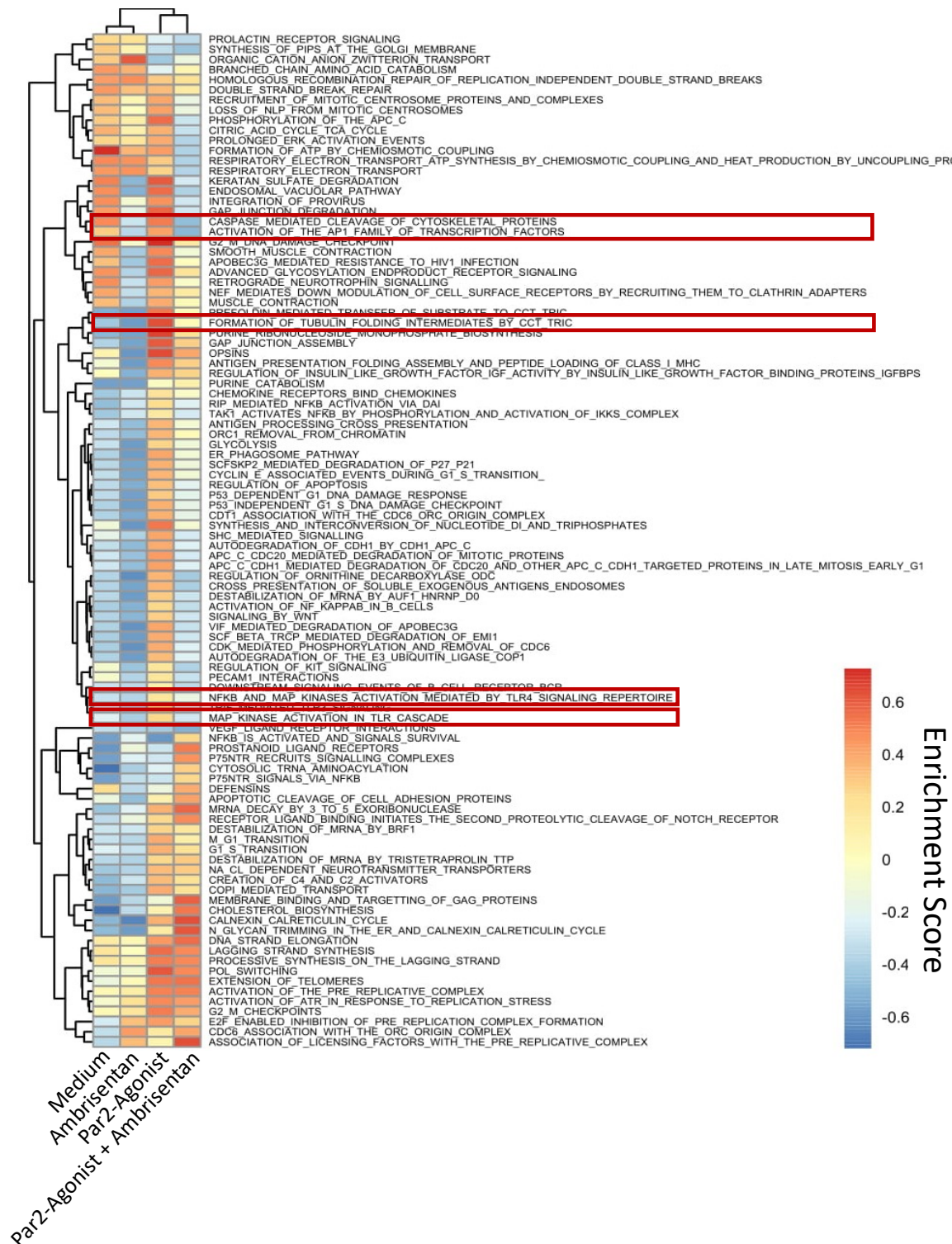


Abbildung 48: Wirkung von ETAR-Blockade auf das Transkriptom der Colo357-Zelllinie. Gene Set Variation Analysis (GSVA) stellt die auf- und abregulierten Signalwege nach Behandlung von Ambrisentan von Par2-stimulierten bzw. unstimulierten Colo357-Zellen dar. Die roten Markierungen zeigen die hemmende Wirkung auf tumorfördernde Signalwege.

4 Diskussion

ETAR-Antagonisten sind etablierte und gut verträgliche Medikamente in der Behandlung von PAH. Neben ihrer vasokonstriktorisches Schlüsselfunktion im Gefäßsystem wurden für die ET-Achse zahlreiche immunmodulatorische und v. a. tumorfördernde Funktionen nachgewiesen. Aufgrund dessen war und ist die Neuanwendung der Gruppe der medikamentösen ET(A)R-Antagonisten im Bereich der Tumorthherapie im Sinne eines *drug repurposings* eine lohnende Überlegung (113). Das Prinzip des *drug repurposings* beschreibt, dass bereits zugelassene Medikamente zur Behandlung anderer Krankheiten angewandt werden. Verschiedene ETAR-Antagonisten wie Zibotentan oder Atrasentan wurden bereits unter dem Gesichtspunkt der Neuanwendung als onkologische Therapeutika untersucht (46), Ambrisentan und Sitaxentan wurden unter diesem Aspekt jedoch noch nicht beleuchtet. Das sogenannte *drug repurposing* hat verschiedene Vorteile: Zum einen haben die Medikamente ein bereits bekanntes Sicherheitsprofil (113). Zum anderen sind sie, wie im Falle von Ambrisentan FDA- und EMA-zugelassen und die Anwendung somit mit geringerem finanziellen Aufwand verbunden als die Neuentwicklung eines Medikaments (113). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Wirkung von ETAR-Antagonisten auf die Migration von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Tumorzelllinien anhand von *ex vivo* und *in vitro* Experimenten beleuchtet.

4.1 Humane PMN und Tumorzelllinien exprimieren ETAR und ETBR

Im ersten Schritt dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der ETR-Expression auf Genebene bei den hier verwendeten Tumorzelllinien. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative *real-time* PCR bei der HL60-, Colo357-, OvCar3- und MDA-MB-231-Zelllinie durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinexpression von ETAR bzw. ETBR durchflusszytometrisch bei Colo357- und HL60-Zellen sowie humanen PMN untersucht. Die ETR-Expression der Zelllinien OvCar3 sowie MDA-MB-231 wurde im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrisch nicht untersucht. Bezüglich der o. g. mRNA-Expression konnte jedoch gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien ETAR- und ETBR-mRNA exprimieren (144). Der Nachweis der Expression auf mRNA und Proteinebene bildet die Grundlage für eine spezifische - rezeptorvermittelte - Wirkung der untersuchten ETAR-Antagonisten im Hinblick auf Migration, Funktionalität und Vitalität der Zellen (s. u.).

4.1.1 Die Tumorzelllinien Colo357, HL60, OvCar3 und MDA-MB-231 exprimieren mRNA für ETAR und ETBR

Alle in dieser Studie untersuchten Tumorzelllinien exprimieren sowohl ETAR- als auch ETBR-mRNA. Während die Colo357-, MDA-MB-231- und OvCar3-Zellen mehr ETAR mRNA als ETBR mRNA exprimieren, weisen HL60-Zellen eine etwa gleiche Menge an mRNA für beide Rezeptoren auf. Ein Vorteil der qPCR ist ihre hohe Sensitivität und hohe Spezifität. Allerdings bringt sie bezüglich der Rezeptorexpression einen indirekten Nachweis, da sie zwar die spezifische mRNA, nicht jedoch das exprimierte Ziel-Protein, hier ETAR bzw. ETBR, nachweist. Die Ergebnisse der mRNA-Expression der einzelnen Zellentitäten werden nun vor dem Hintergrund der Forschungsliteratur diskutiert. Die für die Colo357-Zelllinie gezeigte ETAR und ETBR mRNA Expression wird durch die Erkenntnisse aus der Literatur gestützt: Bereits für viele verschiedene Pankreasadenokarzinom-Zelllinien wurde eine ETAR mRNA Expression mittels PCR demonstriert (110,117). Die hier berichteten Ergebnisse für die ETAR und ETBR mRNA Expression durch Colo357-Zellen wurden nach aktuellem Stand der Forschung noch nicht anderweitig gezeigt. Des Weiteren ist eine ETAR mRNA Überexpression in Pankreas-Adenokarzinomen beschrieben, die mit einer verkürzten Überlebenszeit von Patient*innen einhergeht (117). Allerdings ist zu beachten, dass das Pankreaskarzinom von Patient*innen nur entfernt mit einer Tumorzelllinie zu vergleichen ist. Der derzeitige Wissensstand in der Literatur insbesondere bezüglich der ETAR und ETBR Expression der Colo357-Zelllinie ist noch unvollständig.

Für HL60-Zellen wurde gezeigt, dass sie sowohl ETAR als auch ETBR auf mRNA-Ebene exprimieren. Im Gegensatz dazu steht eine Arbeit von Ahmed et. al. (2000), die nur ETBR-mRNA nachweisen konnte (152). Eine mögliche Ursache liegt in der anderen Methodik der PCR. Das ETAR PCR-Produkt von Ahmed et al. wies 328 Basenpaare (bp) auf, das unserer Arbeitsgruppe 102 bp. Nach Auftrennung der PCR-Produkte sahen Ahmed et al. multiple Produkte, die auf verschiedene splice-Varianten hinweisen könnten und eine ETAR-Expression nicht notwendigerweise ausschließen. Die von Ahmed et al. verwendeten Primer sind unbekannt. Anja Kerstein-Stähle designte die in dieser Studie verwendeten Primer mit Primer-Blast (153). Diese - mutmaßlich verschiedenen - Primer könnten ebenso eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse darstellen. Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass HL60-Zellen sowohl ETAR als auch ETBR mRNA exprimieren

Des Weiteren wurde für die Tumorzelllinie OvCar3 ein Nachweis der mRNA-Expression für ETAR und ETBR erbracht. Aus der Literatur ist bekannt, dass diverse Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie humane Ovarialtumoren ET-1 sowie ETAR auf Genexpressionsebene sowie auf Proteinebene exprimieren (119,154). Weitere Nachweise, dass speziell die OvCar3-Zelllinie ETAR bzw. ETBR exprimieren, stehen jedoch noch aus. Insbesondere der Nachweis z. B. mittels *western blot* oder Durchflusszytometrie von ETAR- bzw. ETBR-Expression auf Proteinebene, wäre hier von Interesse.

Anhand der oben beschriebenen qPCR ist die Expression von ETAR- bzw. ETBR-mRNA bei MDA-MB231 Zellen nachgewiesen worden. Dies wird durch die Erkenntnisse aus der Literatur gestützt, so wurden für diese Zelllinie bereits PCR- und *western blot* Nachweise für eine ETAR-Expression erbracht (155).

Ein ETAR- bzw. ETBR-mRNA-Nachweis für humane PMN mittels qPCR ist in dieser Studie nicht erfolgt. Es wurde darauf verzichtet, da bereits zahlreiche Nachweise einer mRNA und Protein- Expression von ETR mittels Immunfluoreszenzfärbungen, qPCR und *western blot* vorliegen (99). Dennoch würde ein eigens erbrachter Nachweis der ETR-Expression von humanen PMN auf Genexpressionsebene die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse vervollständigen.

4.1.2 Humane PMN sowie die Tumorzelllinien HL60 und Colo357 exprimieren die Endothelinrezeptoren Typ A und Typ B auf ihrer Oberfläche

Im nächsten Schritt erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der ETR-Proteinexpression auf der Zelloberfläche. Aufgrund der strukturellen Komplexität von GPCR und der Regulation ihrer Expression gestaltete sich dieser Nachweis als störanfällig und schwierig. Die gewählte Methodik innerhalb der Durchflusszytometrie ermöglicht hier lediglich eine Momentaufnahme für den auf der Zelloberfläche präsentierten N-terminalen Teil der ETR, nicht jedoch die Gesamtheit der exprimierten Rezeptoren. Eine weitere Methode zum Nachweis von ETR auf Proteinebene wie z. B. *western blot* würde die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ggf. unterstützen.

4.1.2.1 Colo357-Zellen weisen eine schwache Oberflächenexpression von ETAR und ETBR auf

Um eine spezifische Wirkung der ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan auf die Colo357-Zelllinie nachzuweisen, wurde die oberflächliche Rezeptorexpression von ETAR

und ETBR auf Colo357-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die ETR-Expression wurde als ΔMFI ($\text{MFI}_{\text{Probe}} - \text{MFI}_{\text{sek. AK}}$) ausgedrückt. Vorteil dieser Methoden ist die Normierung der einzelnen Proben gegen eine konstante Kontrolle, die individuelle Eigenfluoreszenz verschiedener Proben fällt jedoch stärker ins Gewicht. Grundsätzlich wird die MFI z. B. durch Eigenfluoreszenz der Zellen oder Dichte der Rezeptoren beeinflusst. Hier wurde bewusst der Median gewählt, da dieser mathematisch deutlich stabiler gegenüber Ausreißern bleibt. Die ΔMFI von ETAR war höher als die von ETBR. Es wurde bei einer zweimaligen Experimentdurchführung auf weitere statistische Analyse verzichtet. Eine höhere Anzahl von Experimenten und anschließende statistische Auswertung ist für eine verlässliche Aussage der durchflusszytometrischen Ergebnisse unerlässlich. Auch bzgl. der breiten Streuweite der ETAR-Expression würde eine höhere n-Zahl möglicherweise mehr Klarheit bringen. Insgesamt ist die ΔMFI für beide Rezeptoren sehr niedrig im Vergleich, was möglicherweise ein Zeichen dafür ist, dass Colo357-Zellen nur wenig ETAR bzw. ETBR exprimieren. Dies wird durch die Betrachtung der *dot plots* unterstrichen: die *dot plots* von ETAR bzw. ETBR sind nur wenig stärker fluoreszierend als die *dot plots* der Kontrollmessung mit dem sekundären Antikörper. Geht man davon aus, dass es sich hier trotzdem um eine ETR-positive Population handelt, ist diese zahlenmäßig sehr klein. Außerdem ist die hier durchgeführte durchflusszytometrische Messung der ETR-Expression eine Momentaufnahme der Oberflächenexpression von ETAR bzw. ETBR. Für GPCR ist jedoch bekannt, dass diese nach Bindung agonistischer Liganden von der oberflächlichen Zellmembran internalisiert werden (156). Die gewählten ETR-Primärantikörper ETAR und ETBR erkennen jedoch jeweils Peptide in der extrazellulären N-terminalen Region von ETR, welche nach Internalisierung des Rezeptors nicht mehr zugänglich ist. Eine Messung nach Permeabilisierung der Zellmembran würde also die Gesamtheit der exprimierten ET-Rezeptoren zeigen.

4.1.2.2 HL60-Zellen exprimieren ETAR und ETBR in bimodaler Populationsverteilung

Auf HL60-Zellen wurde die ETAR- bzw. ETBR-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Diese Zelllinie wurde als Modell für Neutrophile Granulozyten ausgesucht, um die Aussagekraft der Experimente mit humanen PMN zu validieren (106). Im *dot plot* sind bimodale Verteilungen der ETAR⁺ und ETBR⁺ HL60-Populationen und ein deutlicher Unterschied zur Kontrollmessung zu sehen, d.h. ETR⁺ Populationen sind eindeutig abzugrenzen. Eine Rezeptor-positive Population ist eindeutig abzugrenzen. Die ΔMFI für

ETAR und ETBR unterscheiden sich kaum, d.h. HL60 Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche also in etwa gleich viel ETAR wie ETBR. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen für die mRNA Expression. Auch hier ist jedoch zu bemerken, dass wie bereits bei den Colo357-Zellen eine weite Streubreite der Werte vorliegt.

4.1.2.3 Humane PMN exprimieren ETAR und ETBR in bimodaler Populationsverteilung

Durchflusszytometrisch wurde für humane PMN bei der SSc und bei Gesunden der Nachweis einer Oberflächenexpression von Endothelinrezeptoren (Δ MFI) erbracht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der jeweiligen Rezeptorexpression zwischen Gesunden und SSc-Patient*innen. Sowohl Gesunde als auch SSc-Patient*innen exprimieren jedoch statistisch signifikant mehr ETAR als ETBR. Bei genauem Blick auf die durchflusszytometrischen Daten im *dot plot* fällt eine bimodale Verteilung der PMN-Population nach ETAR- bzw. ETBR-Färbung auf.

Grundsätzlich können humane PMN als störungsempfindliche Zellen durch den Vorgang der Isolierung manipuliert werden. Durch eine rasche Weiterverarbeitung der Proben (< 2 h) wurde eine artifizielle Aktivierung der PMN möglichst reduziert. Dass es sich nach Isolierung bei den untersuchten Zellpopulationen tatsächlich um PMN handelte, zeigt die 100%ige Oberflächenexpression von CD66b in Abbildung 15 (B). Methodisch stellt der Mangel einer passenden Isotypfärbung, die möglicherweise als Kontrolle geeigneter ist als das Weglassen des Primärantikörpers, eine potenzielle Fehlerquelle bei der Bestimmung der ETR-Expression von humanen PMN dar. Auch hier ist zu bedenken, dass lediglich die ETR-Expression auf der Zelloberfläche gemessen wurde. Die untersuchten SSc-Patient*innen sind zudem medikamentös behandelt, was ebenso einen Einfluss auf die ETR-Expression haben könnte, hier sind insbesondere selektive und unselektive ETR-Antagonisten zu nennen.

Ein zusätzlicher Störfaktor ist, dass die PMN selbst ET-1 produzieren, was ebenso wie Medikamente die Rezeptorexpression beeinflusst (100,101). Zum besseren Verständnis der Regulation wäre eine Messung des autokrin-sezernierten ET-1 von Nutzen.

4.1.2.3.1 Die ETAR/ETBR-Expressionsratio auf CD15⁺ PMN unterscheidet sich nicht zwischen SSc-Patient*innen und gesunden Kontrollen

Da es in der Literatur bereits Hinweise auf einen veränderten Rezeptorexpressionsquotienten von ETAR zu ETBR auf Immunzellen bei der SSc im

Vergleich zu Gesunden gibt (31), dieser jedoch noch nicht explizit bei PMN betrachtet wurde, wurde er in dieser Arbeit genauer untersucht. Absolut betrachtet ließen sich keine signifikanten Unterschiede für die ETR-Rezeptorexpression auf PMN zwischen Patient*innen mit SSc und Gesunden nachweisen. Auch die ETAR/ETBR-Expressionsratio von SSc-Patient*innen war im Vergleich zu der bei Gesunden ohne statistische Signifikanz. Da die gleichen durchflusszytometrischen Messdaten wie aus Abschnitt 3.1.2.3 verwendet wurden, liegen hier auch die gleichen Kritikpunkte vor, die bereits im letzten Abschnitt diskutiert wurden. Eine Dysbalance von ETAR zu ETBR wie bereits für fibrotisches Lungengewebe oder Monozyten in der Literatur beschrieben (82,131), liegt nach den Erkenntnissen dieser Studie für zirkulierende PMN also nicht vor.

4.1.2.3.2 Die ETAR/ETBR-Expressionsratio auf CD15⁺ PMN korreliert mit klinischem Entzündungsparameter CRP bei der SSc

Die ETAR/ETBR-Expressionsratio spielt u. a. auf Monozyten eine pathogenetische Rolle bei der SSc (131). Auch wenn in dieser Studie im Vergleich zwischen Gesunden und SSc-Erkrankten kein Unterschied bzgl. dieser Expressionsratio auf humanen PMN gesehen wurde, so ist es denkbar, dass die ETAR/ETBR-Expressionsratio auf humanen PMN mit klinischen Parametern der Patient*innen korreliert. Im Hinblick auf die demographischen Daten weist die gesunde Vergleichsgruppe ein statistisch signifikant geringeres Alter auf (32,4 Jahre vs. 57,38 Jahre, $p < 0,0001$). Bzgl. der Geschlechter gibt es keinen Unterschied zwischen den Vergleichsgruppe (1:2,75 bei den Gesunden vs. 1:2,9 bei den SSc-Patient*innen). In der vorliegenden Arbeit korreliert die ETAR/ETBR-Expressionsratio (Δ MFI) auf humanen PMN bei der SSc negativ mit dem Entzündungsparameter CRP. Je niedriger die ETAR/ETBR-Expressionsratio auf den PMN ist, desto höher ist der CRP-Wert. Ein höherer CRP-Wert spricht für eine höhere Krankheitsaktivität. CRP als Akute-Phase-Protein ist ein unspezifischer Marker für Entzündung, der neben rheumatologischen Erkrankungen auch durch Alter, Infekte und andere Faktoren beeinflusst werden kann. Deshalb ist die fehlende Berücksichtigung der genannten Einflussfaktoren auf den CRP-Wert für die Aussagekraft der Korrelation limitierend. Darüber hinaus wurden in dieser Studie die Zahlenwerte der laborchemischen Analyse des CRP-Wertes betrachtet. Klinisch gilt erst ein CRP-Wert von > 5 mg/l als positiver Befund. Welche klinische Bedeutung in diesem Zusammenhang ein Wert von < 5 mg/l hat, bleibt hier unklar und muss näher betrachtet werden. So weisen niedrige Werte von < 5 mg/l eine breite Streuung bzgl. der

ETAR/ETBR-Expressionsratio zugunsten von ETAR auf. Eine höhere Anzahl von Patient*innenproben könnte bzgl. dieser Verteilung mehr Klarheit bringen. Zusammenfassend zeigt sich, dass eine niedrige ETAR/ETBR-Expressionsratio auf zirkulierenden PMN mit höherer Entzündungsaktivität schwach korreliert. Wie bereits oben beschrieben, ist auch in anderen SSc-Studien eine niedrige ETAR/ETBR-Expressionsratio mit Lungenfibrose und vermehrter Sekretion profibrotischer Moleküle durch Monozyten vergesellschaftet (82,131). Dies erhärtet den Verdacht, dass eine erniedrigte ETAR/ETBR-Expressionsratio auf verschiedenen Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der SSc einnimmt. Es bedarf weiterer detaillierter Analysen, um eine potenzielle pathogenetische Relevanz des Verhältnisses von ETAR- zu ETBR-Expression auf Immunzellen z.B. als Biomarker bei der SSc zu validieren.

4.2 Wie beeinflussen Sitaxentan und Ambrisentan Vitalität und Funktionalität von Immunzellen und Tumorzelllinien?

4.2.1 Unter den hier gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen zeigen die ETAR-Antagonisten keinen Einfluss auf die Vitalität von humanen PMN und Colo357

Das Hauptziel dieser Arbeit ist zu eruieren, inwiefern ETAR-Antagonisten spezifisch den Effekt der Migration beeinflussen. Zunächst wurde die potenzielle Toxizität der verwendeten Medikamente Sitaxentan und Ambrisentan im Hinblick auf humane PMN und Colo357-Zellen ausgeschlossen, denn man kann davon ausgehen, dass die Induktion von Apoptose oder Nekrose eine unspezifische reduzierte Migration zur Folge hätte. Durch eine Inkubation mit Sitaxentan oder Ambrisentan wurden weder Apoptose noch Nekrose in humanen PMN induziert. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass der Nukleus intakt bleibt. Ebenso wenig zeigte die einstündige Inkubation mit diesen ETAR-Antagonisten eine Induktion von Apoptose oder Nekrose bei Colo357-Zellen. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch durch Nachweis von Phosphatidylserin als Hinweis auf Apoptose und Nachweis offener DNA als Nekrosemarker unter Hinzunahme einer Negativ- und einer Positivkontrolle. Die statistische Evaluierung der Ergebnisse war bei jeweils $n = 1$ nicht möglich, somit ist die Aussagekraft dieser Resultate begrenzt. Eine mindestens dreifache Wiederholung des Experiments wäre für beide untersuchten Zellarten notwendig, um die Aussage zu validieren. Durch die Negativkontrolle wurde gezeigt, dass Zellen, die nur in Medium inkubiert wurden und somit erwartungsgemäß unbeeinträchtigt in ihrer Vitalität

blieben, durch die gewählte Methode als vital erkannt wurden. In der Positivkontrolle wurden hitzegeschädigte Zellen zu > 95 % als schwergeschädigte, apoptotische oder nekrotische Zellen erkannt. Somit konnte durch Kontrollen die Eignung der gewählten Methoden gezeigt werden. Die Colo357-Zellen und die humanen PMN wurden 1 h mit den o. g. Medikamenten inkubiert. In den Migrations- und Proliferationsversuchen war die Kontaktzeit der Zellen zum jeweiligen Medikament jedoch deutlich länger mit 48 h bzw. 120 h, eine toxische Wirkung der Medikamente nach dieser längeren Zeitspanne ist also nicht ausgeschlossen bzw. sollte auch validiert werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Basel K. al-Ramadi et al. zeigte für die MDA-MB-231-Zelllinie ebenso, dass eine 24-stündige Inkubation mit Ambrisentan (100 µM) die Vitalität der Zellen nicht beeinflusst (144). Diese wurde durch Detektion von ATP als Hinweis auf Zellen mit aktivem Metabolismus mit dem *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* gemessen (157). Inwiefern Sitaxentan eine Wirkung auf die Vitalität dieser Zelllinie hat, ist jedoch noch ungeklärt. Außerdem muss die toxische Wirkung der ETAR-Antagonisten auf die Zelllinien OvCar3 und HL60 in weiteren Experimenten untersucht werden.

Endothelin-1 wirkt über ETAR sowohl auf Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen als auch auf verschiedenen malignen Zellen, u. a. Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinom antiapoptotisch (30,40,54,158). Bei Colon- und Prostatakarzinomen wurde eine gesteigerte Apoptose durch ETAR- bzw. ETR-Antagonisten gefunden (40,158,159). Diese Erkenntnisse sind jedoch nur sehr begrenzt vergleichbar mit den hier erhobenen Daten, da es sich um andere Tumorarten bzw. Zellentitäten handelt. Für die hier untersuchten Zellentitäten bzw. Tumorarten gibt es darüber hinaus keine Daten in der Forschungsliteratur. Weiterführend ist eine mögliche Erklärung warum bei den o. g. malignen Zellen eine proapoptotische Wirkung durch ETAR- bzw. ETR-Antagonisten gesehen wurde, die unterschiedlich lange experimentelle Dauer. Die oben beschriebenen Experimente dauerten 12 – 48 h, die hier gezeigten Daten waren bereits nach 1 h Inkubation erhoben wurden (158,159). Darüber hinaus wurde in diesem Experiment die Apoptose nicht explizit induziert, wie in oben genannten Studien geschehen z. B. durch einen Fas-Liganden (158). Über die Wirkung der Endothelin-Achse auf Apoptose oder Nekrose kann anhand dieses Versuchsaufbaus keine Aussage getroffen werden, da weder die Endothelin-1-Sekretion durch die Zellen selbst gemessen wurde noch die Rolle von ET-1 in diesem Rahmen gesondert untersucht wurde. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass nach einstündiger *in vitro* Inkubation von humanen PMN und Tumorzelllinien

mit Sitaxentan oder Ambrisentan kein Zelltod (Nekrose oder Apoptose) durch die Medikamente induziert wurde. Detailliertere Aussagen bzgl. Apoptose- oder Nekrose-Induktion durch ETAR-Antagonisten lassen sich hieraus aber nicht ableiten.

4.2.2 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von humanen PMN wird unter den hier gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen nicht durch ETAR-Antagonisten verändert

Als Teilaspekt der Funktionalität von humanen PMN wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies genauer untersucht. Auch hier liegt der Gedanke zu Grunde, Wirkungen der ETAR-Antagonisten über den Einfluss auf Migration hinaus zu zeigen bzw. auszuschließen. Daneben ist oxidativer Stress durch PMN auch an der Pathogenese von SSc beteiligt, sodass sich hier ein genauerer Blick auf die Rolle der ETAR-Antagonisten als potenziell antiinflammatorische Medikamentengruppe lohnt (s.u.). Humane PMN wurden mit PMA zur Stimulation von ROS angeregt. Anschließend wurden die ROS-Freisetzung unter Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR), das mit ROS zu fluoreszierendem 123-Rhodamin reagiert, nachgewiesen (134). Nach einstündiger Inkubation von humanen PMN mit Ambrisentan blieb die Produktionskapazität für ROS nach Stimulation durch PMA unbeeinflusst. Der Vergleich zwischen fMLP-stimuliertem Ansatz und fMLP-stimuliertem Ansatz mit Ambrisentan ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, wenn auch einen höheren Mittelwert für den Ansatz mit Ambrisentan, was auf eine erhöhte Produktion von ROS sprechen könnte. Ebenso wenig zeigte die Inkubation humaner PMN mit Sitaxentan einen Einfluss auf die Produktion von ROS nach Stimulation mit PMA, jedoch wurde ein höherer Mittelwert für den stimulierten Ansatz mit Sitaxentan beobachtet. Bei $n = 2$ wurde nicht weiter statistisch analysiert, eine mindestens dreifache Wiederholung dieses Experiments ist nötig, um eine valide und statistische Aussage über die Produktion von ROS unter Einfluss von Sitaxentan zu treffen. Grundsätzlich ist zu beachten, dass es sich bei dem Stimulus PMA um ein nicht-physiologisches Molekül handelt. Inwiefern die ROS-Produktion in Abhängigkeit physiologischer Reize durch die ETAR-Antagonisten bei humanen PMN beeinflusst wird, bleibt offen. In Abwesenheit von PMA wurde keine ROS-Produktion nachgewiesen.

In diesem Versuchsaufbau wurde lediglich PMA-stimulierte ROS gemessen. Insbesondere im Hinblick auf den – nicht signifikanten – jedoch höheren Mittelwert des stimulierten Ansatzes mit den ETAR-Antagonisten wäre eine Untersuchung der humanen PMN nach

Inkubation mit ETAR-Antagonisten allein interessant gewesen, um zu sehen ob diese PMN alleine zur ROS-Produktion anregen. Auch hier wurde die MFI als Auswertungsparameter herangezogen mit den bereits oben diskutierten möglichen Einfluss- und Störfaktoren. Die Hinzunahme einer Negativkontrolle (Medium) und einer Positivkontrolle (PMA) belegt die Eignung des experimentellen Ansatzes. Im Histogramm (Abbildung 31) ist zu sehen, dass durch Aktivierung mit PMA die Fluoreszenzintensität von 123-Rhodamin einen deutlichen *shift* nach rechts macht. Es wurde somit demonstriert, dass PMA ROS induziert und diese hier durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass ET-1 oxidativen Stress z. B. in Endothelzellen induziert, zum einen als Folge starker Vasokonstriktion und Hypoxie (77,93) zum anderen über ETAR direkt vermittelt (160,161). Dieser oxidative Stress spielt auch in der Pathogenese der Systemischen Sklerose eine Rolle. So wurde gezeigt, dass Auto-AK von SSc-Patient*innen die ROS-Produktion von humanen PMN signifikant steigern (87). Auch produzierten PMN von SSc-Patient*innen nach Stimulation signifikant mehr ROS als PMN von Gesunden (97). Es gibt jedoch auch Studien, die, passend zu den hier erlangten Ergebnissen, keinen Einfluss auf die stimulierte Produktion von ROS durch ETAR-Blockade sahen (77,162). Interessanterweise scheint die Art des Stimulus für ROS eine wichtige Rolle zu spielen, so konnte die fMLP-induzierte Produktion von ROS durch ET-1 gesteigert werden, nach Stimulation durch Zymosan zeigte ET-1 jedoch keinen Effekt (77,162). Zusammenfassend geht aus den vorliegenden Daten hervor, dass die untersuchten ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan unter den gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen keinen Einfluss auf die PMA-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von humanen PMN haben. Offen bleibt, ob ein anderer Stimulus wie fMLP eine andere Wirkung zeigen würde und welche Rolle der natürliche Ligand ET-1 hierbei spielt.

4.2.3 Unter den hier gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen bleibt die Phagozytosekapazität von humanen PMN durch ETAR-Antagonisten unbeeinflusst

Als dritter Aspekt der PMN-Funktionalität wurde deren Phagozytosekapazität untersucht. Phagozytose ist ein wichtiger Verteidigungsmechanismus von PMN gegen Pathogene. Insbesondere für immunmodulatorische Medikamente ist eine spezifische Wirkung auf

eine gezielte Zellfunktion (hier die untersuchte Migration) wünschenswert, um die essenzielle schützende Eigenschaft des Immunsystems weitestgehend zu erhalten. Insgesamt zeigte die Inkubation mit den verwendeten ETAR-Antagonisten Sitaxentan und Ambrisentan keinen Einfluss auf die Phagozytosekapazität von humanen PMN. Die Messung der Phagozytosekapazität von humanen PMN erfolgte durchflusszytometrisch in Vollblut nach Hinzugabe von fluoreszenzmarkierten *Staphylococcus aureus*-Partikeln. Ein Vorteil in der Benutzung von Vollblut im Gegensatz zur vorherigen Isolierung von humanen PMN ist die besonders kurze Bearbeitungsdauer der Proben mit weniger Manipulationsmöglichkeiten. Damit werden experimentell bedingte Einflüsse auf die Funktionalität der humanen PMN möglichst gering gehalten. Wichtig ist die Unterscheidung zwischen internalisierten also tatsächlich phagozytierten Partikeln und Partikeln, die an der Zelloberfläche heften. In diesem Experiment diente das Agens, das zur Lysierung der Erythrozyten verwendet wurde, zeitgleich als sogenannter *quencher* (163). Durch die Lyse wurde das Fluoreszenzsignal aller adhären, nicht phagozytierten Partikel ausgelöscht. Im aziden Milieu, wie auch im Phagosom vorherrschend, wird der Farbstoff jedoch teilweise ebenfalls ausgelöscht. Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, dass alle untersuchten Ansätze gleichermaßen betrifft. Dieser systemische Fehler hebt sich also durch Vergleich der Gruppen auf. Im Versuchsaufbau wurde eine Negativkontrolle (Medium) mitgeführt als Vergleichsprobe zu den Medikamentenansätzen. Eine Positivkontrolle, in der die Phagozytose durch PMN nachgewiesenermaßen gehemmt oder gesteigert wird, fehlt an dieser Stelle. Diese würde zeigen, ob eine reduzierte oder gesteigerte Phagozytose durch die gewählte Methode zuverlässig erkannt würde.

Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde im Tierexperiment kein Einfluss von ET-1 auf die Phagozytosekapazität von leporinen PMN gesehen (164). Im Gegensatz dazu steht eine veterinärmedizinische Studie, die nachgewiesen hat, dass Inkubation mit ET-1 die Phagozytosekapazität von bovinen PMN reduziert, dies allerdings wahrscheinlich ETBR-vermittelt ist, da die Blockade von ETBR, nicht aber von ETAR eine Reduktion auf die Phagozytosekapazität bewirkte (165). Auch bzgl. der SSc zeigten PMN von Patient*innen keinen signifikanten Unterschied zur Phagozytosekapazität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (166). Zusammenfassend ist wenig bekannt über den Einfluss von ETAR-Antagonisten auf die Phagozytose. Die hier erhobenen sowie die aktuelle Datenlage sprechen gegen einen Einfluss der ET-Achse auf die Phagozytosekapazität von PMN. Aus dieser Arbeit geht hervor, dass humane PMN nach Inkubation mit den ETAR-Antagonisten

Sitaxentan und Ambrisentan eine intakte Phagozytose aufweisen und somit unter den gewählten Bedingungen in diesem Bereich nicht in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

4.2.4 ETAR-Antagonisten wirken unter den hier gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen möglicherweise proliferationshemmend auf Tumorzelllinien

Für das Fortschreiten von Neoplasien ist die Proliferation von malignen Zellen unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von ETAR-Antagonisten auf die Zellproliferation der Colo357-Zelllinie sowie der MDA-MB-231-Zelllinie untersucht, um zu prüfen, ob die Medikamentengruppe möglicherweise eine antiproliferative und somit potenziell antineoplastische Wirkung innehat.

Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch nach fünftägiger Inkubation mit Sitaxentan oder Ambrisentan und CFSE-Färbung. Die ETAR-Antagonisten zeigten weder auf die Zellproliferation von Colo357-Zelllinie noch auf die von MDA-MB-231-Zelllinie einen statistisch signifikanten Einfluss. Nichtsdestotrotz waren die Mittelwerte beider ETAR-Antagonisten-Proben in beiden untersuchten Zellreihen höher als die Medium-Vergleichsprobe. Dies würde für eine gehemmte Proliferation durch die o. g. Medikamente sprechen. Mögliche Ursache für die fehlende statistische Signifikanz ist die große Streuung der Werte. Die Anzahl der Experimente müsste gesteigert werden, um ggf. signifikante Ergebnisse zu erhalten. In diesem Versuchsaufbau wurde lediglich die Proliferationsrate betrachtet. Die bloße Betrachtung der MFI, wie hier geschehen, zeigt nur, dass die überlebenden Zellen aus den Medikamentenansätzen die gleiche Generationenanzahl wie in der Vergleichsprobe erreicht haben. Nach der langen Inkubationszeit mit den Medikamenten wäre eine vergleichende Lebendfärbung z. B. mit Trypanblau zur Differenzierung der Anzahl toter und vitaler Zellen wünschenswert, denn es wäre denkbar, dass durch Inkubation eine signifikante Anzahl der Zellen zugrunde geht (vgl. Abschnitt 4.2.1.). Zusätzlich würde ggf. eine weitere Methode beispielsweise ein Thymidin-Inkorporationsassay weitere Erkenntnisse über die tatsächliche Wirkung der ETAR-Antagonisten auf die o. g. Zelllinien bringen. Prinzipiell ist anzumerken, dass z. B. in Pankreaskarzinomen ein hypoxisches Milieu herrscht. Bhargava et al. konnten eine deutlich effektivere Reduktion der Zellproliferation durch einen ETAR-Antagonisten unter hypoxischen Bedingungen zeigen (110). In diesem Versuchsaufbau wurden normoxische Versuchsbedingungen gewählt. Eine hypoxische Umgebung würde die physiologischen

Gegebenheiten besser darstellen und auf diese Weise möglicherweise andere Ergebnisse liefern.

Für verschiedene maligne Tumoren wie das Prostatakarzinom, Zervixkarzinom und das Ovarialkarzinom konnte bereits eine hemmende Wirkung von ETAR-Antagonisten auf Zellproliferation gezeigt werden (30). Bei verschiedenen Ovarialkarzinom-Zelllinien war Endothelin-1 ein dosisabhängiger, potenter Stimulus für Proliferation, die durch Hinzugabe eines ETAR-Antagonisten gehemmt wurde (154,167). Da Ovarialkarzinome hinsichtlich der mitogenen Wirkung der ET-Achse bereits ausführlich erforscht wurden, wurde in dieser Arbeit auf das Pankreas- und das Mammakarzinom zur Untersuchung der Wirkung von ETAR-Antagonisten auf Zellproliferation fokussiert. Passend zu den hier erlangten Ergebnissen, konnte für Mammakarzinom-Zelllinien, u. a. auch für die hier untersuchte MDA-MB-231-Zelllinie bisher kein Einfluss von ETAR-Antagonisten auf Proliferation gezeigt werden (123). Auch im Tiermodell für das Mammakarzinom zeigte sich unter Ambrisentan-Behandlung kein Einfluss auf das lokale Tumorwachstum (144). Für verschiedene Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde eine moderate Hemmung der Zellproliferation durch ETAR-Antagonisten berichtet, die bei Wechsel zu hypoxischen Bedingungen deutlich zunahm, wie oben beschrieben (110). Dies steht im Gegensatz zu den hier erlangten Ergebnissen. Zum einen wurde eine andere Zelllinie, zum anderen ein anderer ETAR-Antagonist untersucht, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Darüber hinaus könnten die normoxische Bedingungen einen Einfluss auf die Wirkung der ETAR-Antagonisten auf die Zellproliferation haben.

Für die Endothelin-Achse sind mehrere Schnittstellen, d. h. ein sogenannter ***crosstalk***, mit mitogenen Signalkaskaden beschrieben (30). So kann ET-1 ETAR-vermittelt diverse Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie EGFR über verschiedene Zwischenschritte transaktivieren und die Proliferation aktivieren (30,40). Dafür spricht auch, dass die mitogene ET-1-Aktivität durch Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- β weiter potenziert wird, wiederum antagonisierbar durch Blockade von ETAR und EGFR (30,168). Insgesamt spricht die Studienlage bei vielen Tumoren eher für eine mitogene Wirkung der ET-Achse bzw. eine antiproliferative Wirkung von ETAR-Antagonisten. Ein möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit gefundenen und davon abweichenden Ergebnisse, ist, dass in diesem Versuch ET-1 als autokriner wachstumsfördernder Faktor nicht mit gemessen wurde. Die Höhe von ET-1 bestimmt jedoch maßgeblich die basale Wachstumsrate der Zellen (154). Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit kein Einfluss der ETAR-Antagonisten auf die

Proliferation von Colo357- und MDA-MB-231-Zellen beobachtet. Die vorliegenden Ergebnisse sind jedoch limitiert durch fehlende Überprüfung der Vitalität der Zellen zu Versuchsende, normoxische Bedingungen und unklare ET-1 Spiegel. Die Datenlage spricht eher für einen Einfluss von ETAR-Antagonisten auf Zellproliferation. Speziell Ambrisentan und Sitaxentan wurden in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht in anderen Arbeiten untersucht.

4.3 Die Migration von humanen PMN und HL60-Zellen wird durch ETAR-Antagonisten gehemmt

Eine der zentralen Fragen in dieser Arbeit ist, inwieweit Ambrisentan und Sitaxentan als ETAR-Antagonisten die Migration von PMN beeinflussen bzw. hemmen. Da Neutrophile nachdem sie ins Gewebe ausgewandert sind, diverse proinflammatorische Signale setzen können (vgl. Kapitel 1.1.4.2) und so den Verlauf von Autoimmunerkrankungen negativ beeinflussen (98), ist die Inhibition dieses Auswanderns im Rahmen einer Entzündungshemmung von Interesse.

Die Migration isolierter humaner PMN und der HL60-Zelllinie als PMN-Modell wurde im Transwell Assay in An- und Abwesenheit von fMLP als Migrationsstimulus gemessen. In dieser Arbeit wurde eine dosisabhängige Hemmung der Migration von humanen PMN durch Sitaxentan und Ambrisentan gezeigt. Die stimulierte Migration von humanen PMN wurde durch die untersuchten ETAR-Antagonisten signifikant gehemmt. Auf die basale Migrationsrate hatte Ambrisentan keinen Einfluss, für Sitaxentan war ein Trend zur Migrationsinhibition zu beobachten. Wurde die beobachtete Migration in Relation zur basalen Migration gesetzt, so wurde für Sitaxentan eine signifikante Reduktion der Migration erreicht. Dies liegt möglicherweise an einer breiteren Streuung der relativen Migrationswerte für Ambrisentan. Auf die unstimulierte Migration von HL60-Zellen haben Sitaxentan und Ambrisentan keinen Einfluss. Die stimulierte Migration von HL60-Zellen wurde signifikant durch Sitaxentan gehemmt. Auch für die Inkubation mit Ambrisentan wurde ein niedrigerer Mittelwert der Migration beobachtet, jedoch ohne statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse lassen sich sowohl bei Betrachtung der absoluten Migration als auch bei Betrachtung der relativen Migration ablesen. Als Positivkontrolle bewirkte fMLP eine signifikante Zunahme der Migration für PMN, für HL60-Zellen wurde der Trend einer Zunahme beobachtet. Somit wurde gezeigt, dass PMN auch nach dem Isolationsvorgang zur Migration in der Lage waren. Für eine statistisch signifikante

Zunahme der Migration von HL60-Zellen durch fMLP wäre eine höhere Anzahl von Experimenten nötig.

Ambrisentan und Sitaxentan sind beide selektive ETAR-Antagonisten, wobei die Selektivität von Sitaxentan für ETAR die von Ambrisentan übertrifft (169). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass Sitaxentan bei humanen PMN eine potentere Migrationsinhibition bewirkte als Ambrisentan bzw. für HL60-Zellen einen signifikanten Einfluss aufwies im Gegensatz zu Ambrisentan. Für die Migrationsversuche wurde, wie zuvor beschrieben, eine Konzentration von 100 μ M Ambrisentan bzw. Sitaxentan gewählt (92,170). Beschrieben wurden im Gegensatz dazu Affinitäten von Ambrisentan und Sitaxentan gegenüber dem humanen Endothelinrezeptor Typ A im nM-Bereich (63,66). Bei höheren Konzentrationen, wie hier vorliegend kann es für Ambrisentan auch zum ETBR-Antagonismus kommen (144,169). Darin könnte eine weitere Ursache für den beobachteten Unterschied zwischen den Medikamenten liegen. Prinzipiell ist die Selektivität und Affinität von Ambrisentan in hohem Maße vom gewählten Modell und Spezies-abhängig (171), sodass eine differenzierte Bestimmung der einzelnen Affinitäten je nach Zelltyp gegenüber ETAR sinnvoll wäre. Zusätzliche Anknüpfungspunkte weiterer Forschung wären vergleichende Experimente mit einem selektiven ETBR-Antagonisten, wobei sich diese Substanzen bisher auf die experimentelle Anwendung beschränken, Ambrisentan in niedrigerer Konzentration und ggf. einem dualen ETR-Antagonisten wie Bosentan oder Macitentan. Weiterführend ist diese Arbeit limitiert dadurch, dass lediglich fMLP als Migrationsstimulus, nicht jedoch der natürliche Ligand ET-1 eingesetzt wurde. Da PMN außerdem in der Lage sind, selber ET-1 zu sezernieren (31,82,92,99–101), beeinflusst dieses möglicherweise zusätzlich ihre Migration. Eine zeitgleiche Bestimmung des ET-1-Spiegels wäre hier von Interesse. Durch die automatisierte durchflussszytometrische Zellzählung nach Gating der Granulozyten-Population konnte eine sehr hohe Reinheit dieser Zellentität erreicht werden. Außerdem wurden mögliche Zählfehler minimiert. Somit ist die beobachtete Inhibition der Migration streng auf Granulozyten und hier v. a. Neutrophile zurückzuführen. Eine weitere Einschränkung des Versuchs ist die Zweidimensionalität des Aufbaus im Transwell Assays. In 3D-Modellen wurde gesehen, dass andere Signalkaskaden und andere Modi der Migration zum Tragen kommen. In 3D-Modellen könnten die physiologischen Bedingungen für Migration durch Beschaffenheit

der EZM, Porengröße und Interaktion im Zellverband deutlich besser beobachtet werden (172). Daraus ergibt sich ein weiterer Anknüpfungspunkt für zukünftige Forschung.

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, dass die untersuchten ETAR-Antagonisten zu Migrationsinhibition bei humanen PMN führen, passen zur aktuellen Studienlage. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ET-1 *in vitro* und *in vivo* die Neutrophilenmigration induziert (102,173). Darüber hinaus wurde im Tierexperiment nach intraarterieller ET-1 Injektion eine verstärkte Akkumulation von PMN in der Dünndarmwand demonstriert, was ebenso auf einen promigratorischen Einfluss von ET-1 hinweist (174). ETAR-Antagonisten hemmten Migration von Neutrophilen nach Stimulation durch Ovalbumin, LPS, ET-1 und IgG von SSc-Patient*innen signifikant (87,103–105). Bei letzterem lag zusätzlich eine Korrelation der Migrationskapazität mit dem Titer der anti-ETAR-AK vor (87). Insgesamt ist jedoch zu bedenken, dass sich die Anwendung von ETAR-Antagonisten zur Migrationsinhibition bisher in erster Linie auf *in vitro* Daten stützt. *In vivo* konnte Prof. Basel al-Ramadi im Mammakarzinom-Mausmodell zeigen, dass unter Ambrisentanbehandlung signifikant weniger Granulozyten in die Lunge von tumor erkrankten Mäusen einwanderten (144). Welchen Einfluss diese Observation jedoch auf das Krankheitsgeschehen beim Menschen hat, bleibt noch offen.

Die neue Erkenntnis aus dieser Studie ist, dass nicht nur experimentell-etablierte ETAR-Antagonisten wie BQ-123 die Migration von PMN inhibieren, sondern auch die ETAR-Antagonisten Sitaxentan und das, auf dem Markt bereits zugelassene, Ambrisentan. Diese Migrationsinhibition ist weitestgehend Stimulus unabhängig. Eine mögliche Erklärung dafür, kann Rezeptor *crossstalk* sein. Dabei handelt es sich um ein komplexes Netzwerk aus Chemokinen, GPCR wie ETAR, deren Liganden, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie EGFR und die folgenden *second* und *third messengern* der Signalkaskaden (30). Diese stehen in Kontakt zueinander und beeinflussen gegenseitig ihre Funktionalität. Im Folgenden (s. Abschnitt 4.4.1.1) werden grundlegende Prinzipien für Tumorzellen näher beleuchtet. Doch auch bei Immunzellen wie PMN interagieren verschiedene GPCR, darunter ETAR und der Formyl-Peptid-Rezeptor (FPR) als Rezeptor für fMLP und beeinflussen so Konformationsänderungen des Zytoskeletts sowie Zell-EZM-Kontakte (175). Auch in PMN werden durch Bindung von ET o. g. Signalkaskaden wie z. B. MAPK oder ERK1/2 aktiviert (175). Diese Aktivierung spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Migration. Ein weiteres Argument für einen Rezeptor *crossstalk* zwischen ET-Rezeptoren und FPR ist die

Beobachtung, dass die fMLP-induzierte Produktion von ROS durch ET-1 gesteigert werden konnte (77,162).

Zusammenfassend hemmt sowohl Sitaxentan als auch Ambrisentan die Migration von humanen PMN unter den hier gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen. Diese Wirkung könnte eine neue antiinflammatorische Komponente der bereits in der PAH-Behandlung eingesetzten Medikamente darstellen. Weitere Versuche bzgl. der beteiligten Signalmoleküle, Versuche in 3D-Modellen *in vitro* sowie Daten aus Tiermodellen *in vivo* sind für die detailliertere Aufklärung der Rolle von ETAR in Migration bei PMN jedoch unerlässlich.

4.4 Migration im Krebsmodell wird durch ETAR-Antagonisten gehemmt

Neben der Migration von Immunzellen wurde in dieser Arbeit die Frage nach der Wirkung der ETAR-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan auf die Migration verschiedener Tumorzelllinien adressiert. Für den invasiven Fortschritt und insbesondere die Metastasierung maligner Neoplasien ist der Prozess der Migration essenziell (120). Wie bereits in Abschnitt 1.1.5 dargelegt, spielt die ET-Achse eine tumorfördernde Rolle bei verschiedenen Karzinomen. In dieser Studie wurde die Migration der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Colo357 sowie der Ovarialkarzinom-Zelllinie OvCar3 in An- und Abwesenheit von Sitaxentan bzw. Ambrisentan im Oris Assay untersucht. Als Migrationsstimulus wurde ein Par2-Agonist genutzt.

Für die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, deren Proliferationsverhalten nach Behandlung mit zwei ETAR-Antagonisten im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, zeigten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Basel K. al-Ramadi, dass Ambrisentan die Migration und -invasion signifikant hemmt (144). Die Analyse der Migration für dieses Modell in Anwesenheit von Sitaxentan muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.4.1 Ambrisentan reduziert die Migrationskapazität von Colo357-Zellen

Ambrisentan hemmt die basale Migrationsrate von Colo357-Zellen signifikant. Die Stimulation durch einen Par2-Agonisten als Positivkontrolle ergab eine statistisch signifikante Zunahme der Migration. Die stimulierte Migration unter Einfluss von Sitaxentan wie unter Einfluss von Ambrisentan bewirkte eine signifikante Reduktion der Migration von Colo357-Zellen. Limitierend ist zu bemerken, dass bei dieser Analyse der

jeweilige Mittelwert aus den Einzelexperimenten bereits im Vorfeld bestimmt wurde. Der angezeigte Standardfehler bezieht sich auf die angegebenen Mittelwerte, nicht jedoch auf die Einzelmessungen pro Experiment. Diese weisen eine breitere Streuung auf, was wohlmöglich zu nicht signifikanten Ergebnissen führen würde. Ferner gelten auch hier die gleichen Kritikpunkte bzgl. der gewählten Konzentration von Ambrisentan und Sitaxentan wie bereits in Abschnitt 4.3 erläutert. Die These, dass Ambrisentan auch in niedrigerer Konzentration in der Lage ist, Migration zu hemmen, wird durch die gemeinsamen Experimente mit der Arbeitsgruppe von Prof. Basel K. al-Ramadi gestärkt. Für die Auswirkung von Ambrisentan auf das Mammakarzinom im Tiermodell wurde die, für die PAH-Behandlung zugelassene, Dosis von 5 - 10 mg/kg Körpergewicht gewählt. Aufgrund eines anderen pharmakokinetischen Stoffwechsels benötigen Mäuse eigentlich höhere Dosen des Medikaments, um eine vergleichbare Aussage über eine Wirkung im humanen Organismus zu treffen. Bereits bei der – für Mäuse – niedrigen Dosis von 10 mg/kg wurde in den Mäusen eine signifikante Reduktion von der Anzahl der Metastasen und der Mortalität erreicht (144). Somit gilt der oben beschriebene migrationsinhibitorische Effekt von Ambrisentan möglicherweise auch *in vitro* bei niedrigerer Konzentration. Für Colo357-Zellen hemmte Ambrisentan die Migration signifikant unter den gewählten Bedingungen, Sitaxentan jedoch nicht. Eine ETBR-vermittelte Komponente durch die geringere Selektivität von Ambrisentan könnte eine Ursache dafür sein. Daten zu Migration unter dualer ETR-Blockade oder reiner ETBR-Blockade sind hier von Interesse. Für das Melanom wurde eine ETBR-Überexpression mit einer signifikant höheren Anzahl von Metastasen im zentralen Nervensystem in Verbindung gebracht (30). Dies könnte ein Hinweis auf die Rolle von ETBR im Rahmen von Migration sein. Außerdem ist die Studie limitiert dadurch, dass ausschließlich ein Par2-Agonist, nicht jedoch ET-1 als natürlicher Ligand eingesetzt wurde. Viele Pankreasadenokarzinom-Zelllinien exprimieren ET-1 (176), die ET-1-Expression der Colo357-Zelllinie wurde allerdings noch nicht untersucht, diese übt möglicherweise einen Effekt auf die Migrationskapazität aus. Als GPCR ist der Par2-Rezeptor am Fortschreiten von Neoplasien beteiligt. So fördert er Angiogenese und die Produktion immunmodulatorischer Zytokine (177) und vermittelt nach Änderungen der direkten Tumorumgebung (*microenvironment*) Tumormigration (178). Die hier erlangten Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise auch die tumorfördernde Wirkung über Par2 durch ETAR-Blockade, insbesondere Ambrisentan reduziert werden könnte. Trotz der Erkenntnis, dass Ambrisentan die basale Migration der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Colo357

hemmt und beide ETAR-Antagonisten die stimulierte Migration inhibieren, lässt sich ein Rückschluss auf Pankreastumoren *in situ* nur sehr begrenzt ziehen, da diese eine heterogenere Zellstruktur mit speziellem *microenvironment* bieten.

Der Oris Assay zur Messung der Migrationskapazität betrachtet ein deutlich längeres Zeitfenster (48 h) als der Transwell Assay. Somit kommt hier neben der direkten rezeptorvermittelten Wirkung auf Migration wie eine Konformitätsänderung des Zytoskeletts auch eine veränderte Transkription innerhalb des Genoms infrage. Dies hat unsere Arbeitsgruppe um Otavio Cabral-Marques im Rahmen einer Transkriptomanalyse von Colo357-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Ambrisentan (100 μ M) gesehen. Der ETAR-Antagonist Ambrisentan ist in der Lage, das Transkriptom von Colo357-Zellen zu modulieren. So inhibiert Ambrisentan auf mRNA-Ebene die Aktivierung verschiedener Signalwege, die für Initiation, Fortschreiten und Migration von Tumorzellen stehen (144).

4.4.1.1 Rezeptor crosstalk in Tumorzellen: ETAR in einem komplexen Netzwerk aus GPCR, anderen Rezeptoren, deren Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren

Wie ist es nun zu erklären, dass selektive ETAR-Antagonisten die Migration von Tumorzellen, stimuliert durch andere Liganden, inhibieren? Ein möglicher Erklärungsansatz ist sogenannter *crosstalk* zwischen verschiedenen Rezeptoren. Klassischerweise bindet bei GPCR wie ETAR der natürliche Ligand an den Rezeptor, was zur Aktivierung des G-Proteins führt. Daraufhin wird eine Signalkaskade mit *second* und *third messengern* in Gang gesetzt (150). In den letzten Jahren sind Erkenntnisse über alternative Aktivierungswege für GPCR hinzugekommen. Darunter fällt z. B. die β -Arrestin-vermittelte parallele Aktivierung zweier GPCR (150), die sogenannte *biased activation*. U. a. in Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde die β -Arrestin-vermittelte Transkription verschiedener Gene im Nukleus beobachtet, die als positiver *feedback*-Mechanismus die Endothelin-Aktivität verstärkt (30). Auch für den Par2-Rezeptor ist eine Signalkaskade über β -Arrestin beschrieben, die über Aktivierung von extracellular regulated kinases (ERK) zu erhöhter Tumorzellmotilität führt (177). Als weiteren Mechanismus können bestimmte GPCR auch andere Rezeptoren, so z. B. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie EGFR oder VEGFR3 transaktivieren (30,150). Für ETAR wurde eine Transaktivierung von EGFR beschrieben, EGFR kann dann den PAR-Rezeptor transaktivieren, was u. a. zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen führt (150). Damit Zellen migrieren können, sind sie auf Matrix-Metalloproteasen zur Degradation der

Extrazellulären Matrix (EZM) angewiesen, bestimmte Muster in der Integrin-Expression vermitteln den Kontakt zur EZM (30).

Beruhend auf der Analyse des Transkriptoms der Tumorzelllinie Colo357 wurde ein *crosstalk* zwischen ETAR und EGFR als Rezeptor für Wachstumsfaktoren und diversen GPCR mittels bioinformatischer Auswertung der Daten prognostiziert (144). Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, warum eine Par2-induzierte Migration durch ETAR-Blockade gehemmt werden kann: Für Par-Rezeptoren ist ebenso wie für ETAR solch ein Rezeptor *crosstalk* beschrieben (150). In der bereits erwähnten, von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Otavio Cabral-Marques und Hauke Busch durchgeführten Transkriptomanalyse von Colo357-Zellen zeigte sich eine durch Ambrisentan erwirkte Inhibition verschiedener durch Par2-aktivierte Moleküle wie NF- κ B, die Signalkaskaden der MAPK sowie Tubulin-Intermediate (144). NF- κ B stellt als Transkriptionsfaktor neben seiner Rolle in Vermittlung und Modulation von Entzündung und angeborener Immunantwort, auch ein Schlüsselmolekül bei der Initiation und dem Fortschreiten von malignen Neoplasien dar (179). Es wurde ein *crosstalk* z. B. mit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und der PKC, einem der Haupteffektormoleküle in der Signalkaskade von ETAR beschrieben (s. Abschnitt 1.1.1.1) (179). Dieser *crosstalk* zwischen der ET-Achse und NF- κ B ist auch reziprok beschrieben (30,40). Die MAPK-Signalwege kreuzt z. B. über ERK1/2 ihre Signalwege mit ETAR (30). Diese Signalkaskaden geben in malignen Neoplasien u. a. Überlebenssignale für Tumorzellen, vermitteln deren Ausbreitung und beeinflussen pharmakotherapeutische Resistenzen (180). Dass dieses komplexe Netzwerk auch das Migrationsverhalten beeinflusst, wird durch den Einfluss von Ambrisentan auf die o. g. Tubulin-Intermediate deutlich. Zur Migration und folgenden Metastasierung wird eine dynamische Konformationsänderung des Zytoskeletts aus Aktin und Tubulin benötigt, in diesem Fall stimuliert über Par2 und inhibiert durch den ETAR-Antagonisten Ambrisentan. Wie genau diese Konformationsänderung zustande kommt, muss weiter erforscht werden. Eine Möglichkeit ist, dass durch Homodimere und Heterodimere des Endothelin-Rezeptors Signalkaskaden *crosstalk* zustande kommt. Für ETAR wurde bereits beschrieben, dass dieser in besagten Homo- und Heterodimeren vorliegen kann und dies die Funktion nach Bindung von Antagonisten beeinflussen könnte (17,150). Um den Prozess der Rezeptordimerisierung näher zu verstehen, sollte dieser z. B. mittels Fluoreszenzmikroskopie genauer untersucht werden. Zum einen sollten die Rezeptoren der hier verwendeten Stimuli, zum anderen ETAR und ETBR dabei betrachtet werden.

4.4.2 Sitaxentan reduziert die Migrationskapazität von OvCar3-Zellen

Sitaxentan hemmte sowohl die basale also auch die Par2-vermittelte, stimulierte Migrationsfähigkeit von OvCar3-Zellen. Ambrisentan bewirkte eine Inhibition der basalen Migration als statistischen Trend, der Mittelwert im Ansatz der stimulierten Migration wurde durch Ambrisentan reduziert, blieb jedoch nicht statistisch signifikant. Der Par2-Agonist bewirkte eine Zunahme der Migration verglichen mit der basalen Migrationsrate, blieb jedoch nur als statistischer Trend zu beobachten. Einige limitierende Faktoren dieses Versuchsteils wurden bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert. Darunter fallen das Fehlen von ET-1 als agonistischer Migrationsstimulus, eine fehlende Bestimmung von autokrin-sezerniertem ET-1 im Zellüberstand der migrierten Zellen, denn OvCar3-Zellen sezernieren ET-1 (181) und die Wahl der Antagonistenkonzentration. Eine mögliche Ursache dafür, dass Sitaxentan die Migration von OvCar3-Zellen hemmt, nicht jedoch Ambrisentan könnte in der für ETAR höheren Selektivität von Sitaxentan gegenüber Ambrisentan liegen (169). Auch ein substanzspezifischer Effekt wäre denkbar, wobei Ambrisentan die basale Migrationsrate von der Ovarialkarzinom-Zelllinie als statistischen Trend hemmt, was eher für eine anti-ETAR-spezifische Wirkung spricht. Auch die Daten aus der Fachliteratur sprechen für einen durch ETAR-Antagonismus vermittelten Effekt, wonach eine ETAR-Überexpression über Aktivierung verschiedener Proteinasen zu erhöhter Tumorzellmotilität und -invasivität führt, die durch den ETAR-Antagonisten BQ-123 antagonisiert werden konnte (8,40). Auch wenn Sitaxentan die Migration auf vielversprechende Weise hemmen konnte, bleibt das Medikament aufgrund von Hepatotoxizität ohne Zulassung durch die FDA oder EMA. Um eine geeignete Behandlung zur ETAR-Blockade zu finden, müssen also weitere ETAR-Antagonisten außer Ambrisentan und Sitaxentan untersucht werden.

Das oben beschriebene komplexe Netzwerk aus verschiedenen GPCR, Signalmolekülen der jeweiligen Kaskaden und Chemokinen, die über *crosstalk* miteinander verbunden sind und so modulierend gegenseitig in die vermittelten Funktionen eingreifen, gilt prinzipiell für Tumorzellen und ist nicht auf eine Tumorentität beschränkt (120,182). Auch wenn unserer Arbeitsgruppe für die OvCar3-Zelllinie keine Daten aus einer Transkriptomanalyse vorliegen, wie für die Colo357-Zellen, ist davon auszugehen, dass auch hier ähnliche Rezeptorinteraktionen wie bereits in Abschnitt 4.4.1.1 aufgeführt stattfinden.

Obwohl es gute Hinweise dafür gibt, dass ETAR-Antagonisten die Migration inhibieren, bleiben noch einige Fragen offen. Zur genaueren Erforschung der ET-vermittelten Migration könnte zum einen ein Migrationsmodell als 3D-Matrix von Interesse sein, da für diese Modelle z. T. eine veränderte Signalkaskade beschrieben wurde (172). Zum anderen wäre ein nächster Anknüpfungspunkt Migration in Echtzeit zu beobachten, um über die Dynamik der Migration eine Aussage treffen zu können. Weiterhin bleibt unklar, welche Signalmoleküle genau inhibiert werden unter ETAR-Blockade, die in Folge Migration hemmen. Auch hier gibt es weiteren Forschungsbedarf. Außerdem wäre ein nächster Schritt in Richtung klinische Anwendung der ETAR-Antagonisten als antineoplastische Medikamente die Untersuchung der ETAR-Antagonisten innerhalb eines Mausmodells für Pankreasadenokarzinome bzw. Ovarialkarzinome. Dies sollte insbesondere in Hinblick auf frühe Metastasierungsinhibition analysiert werden, wie für das Mammakarzinom und Ambrisentan durch unsere Arbeitsgruppe bereits berichtet (144).

5 Ausblick: ETAR-Antagonisten, Chemotherapeutika der Zukunft?

An dieser Stelle wird ein Zukunftsszenario skizziert, falls sich die in dieser Arbeit erlangte Erkenntnis, dass ETAR-Antagonisten die Migration von Pankreasadenokarzinom- und Ovarialkarzinomzellen *in vitro* auch *in vivo* bestätigen sollte.

Speziell bei den hier untersuchten Karzinomen ist neben einer systemischen Gabe per os (p. o.) der ETAR-Antagonisten auch eine intraperitoneale (i. p.) Gabe intraoperativ mit direktem Kontakt zum Tumor und dem umliegenden Gewebe denkbar. Beide Administrationswege haben unterschiedliche Vor- und Nachteile. Dies soll hier insbesondere im Hinblick auf die ET-Achse und die hier genutzten Tumormodelle diskutiert werden. Wie bereits vielfach berichtet, spielt die ET-Achse sowohl für Proliferation, Invasivität, Metastasierung und Epithelial-Mesenchymal-Transition der Tumorzellen selbst, als auch im *microenvironment* des Tumors, wo umgebende Zellen Zytokine sezernieren, die das Fortschreiten der Neoplasie begünstigen, eine entscheidende Rolle (46,109,111,112).

Für Ovarialkarzinome wurden bereits multiple Studien zu intraperitonealer Gabe klassischer Chemotherapeutika durchgeführt (183), für Pankreaskarzinome gibt es insgesamt weniger Studien hierzu (184). Die intraperitoneale Chemotherapie hat sowohl für das Ovarialkarzinom als auch für das Pankreaskarzinom bisher keine ausreichende Evidenz um in der klinischen Therapie empfohlen und genutzt zu werden (116,118).

Erster Anlass zur Überlegung einer i. p. Gabe von ETAR-Antagonisten gab der Fakt, dass für das Ovarialkarzinom deutlich erhöhte ET-1-Spiegel in Aszites beobachtet wurden (185). Eine i. p.-Gabe würde im Gegensatz zu einer systemischen Gabe eher die in dieser Studie verwendete, höhere Konzentration direkt am Zielort erreichen, und so den antimigratorischen Effekt der ETAR-Antagonisten, der hier beobachtet wurde, vermitteln. Systemische unerwünschte Wirkungen könnten außerdem möglicherweise vermieden werden. Nach intraperitonealer Gabe ist ein anderes Spektrum unerwünschter Wirkungen zu erwarten. Für die Therapie des Ovarialkarzinoms sind nach Gabe klassischer Chemotherapeutika wie Platin-Derivate, Anthrazykline oder Cyclophosphamid u. a. Fieber, Fatigue, Schmerzen, Infektionen und gastrointestinale Beschwerden beschrieben (183). Bei der systemischen Gabe von ETAR-Antagonisten sind v. a. vasodilatatorisch-vermittelte unerwünschte Wirkungen wie Hepatotoxizität (58), Anämie und Wasserretention, aber auch Teratogenität und verschiedene Arzneimittelinteraktionen zu erwarten (54,59),

insbesondere die Wasserretention kann therapielimitierend sein (113). Diese unerwünschten Wirkungen lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Substanzen jedoch kaum miteinander vergleichen. Welches Profil an unerwünschten Arzneimittelwirkungen ETAR-Antagonisten nach i. p.-Gabe aufweisen, bleibt Zustand weiterer Forschung. I. p. verabreichte Medikamente durchdringen lediglich die äußersten 1-2 mm von Tumoren (183). Somit würden auch nur diese äußeren Zellen am Auswandern im Sinne von Metastasierung bzw. Tumordissemination gehindert werden. Gleichzeitig würde die direkte Tumorumgebung (*microenvironment*) auch in Kontakt mit dem ETAR-Antagonisten kommen, was möglicherweise die dortigen ET-/ETAR-vermittelten Effekte hemmen würde. Zu bedenken ist, dass die Migrationsexperimente der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie und der Ovarialkarzinom-Zelllinie 48 h in Kontakt mit dem Medikament waren. Eine i. p.-Gabe würde eine komplexere Kinetik durch intraperitoneale Resorption und Metabolisierung der ETAR-Antagonisten aufweisen. Inwieweit sich die beobachteten Effekte also auf die intraperitoneale Gabe von ETAR-Antagonisten anwenden lassen, bleibt unklar. Schließlich muss sich auch gefragt werden, welche Entitäten von Tumoren prinzipiell für eine i. p.-Gabe von antimigratorisch wirkenden Medikamenten wie ETAR-Antagonisten infrage kommen. Sowohl für das Pankreaskarzinom als auch für das Ovarialkarzinom steht die operative Therapie an erster Stelle (116,118), bei früher intraperitonealer Aussaat der Tumoren und häufig später Diagnosestellung jedoch mit schlechter Prognose für beide Tumoren. V. a. diese lokal intraperitoneal metastasierenden Tumore eignen sich für eine i. p.-Chemotherapie. Lymphatische und hämatologische Metastasierung bleibt durch eine intraperitoneale Installation der ETAR-Antagonisten unbeeinflusst (183). Diesbezüglich wäre eine systemische Gabe möglicherweise günstiger. In dieser Studie wurde keine Zytotoxizität der ETAR-Antagonisten auf Tumorzellen beobachtet, was eine weitere Limitation einer intraperitonealen Anwendung darstellen könnte, für das umliegende gesunde Gewebe jedoch von Vorteil sein könnte. Bisher werden vornehmlich zytotoxische Substanzen für eine i. p.-Chemotherapie eingesetzt bzw. erforscht, zytotoxische Substanzen sind antimigratorisch wirkenden Substanzen ggf. überlegen. Gleichzeitig wurden für die ET-Achse diverse o. g. pro-kanzerogene Einflüsse beschrieben, sodass die ETAR-Antagonisten trotz fehlender Zytotoxizität das Fortschreiten von Neoplasien unterbinden könnten.

Bei der systemischen ETAR-Blockade scheint die zeitliche Komponente eine essenzielle Rolle zu spielen. Die Fachliteratur und die hier erhobenen Daten sprechen insbesondere auf einen Einfluss auf das frühe Krankheitsgeschehen vor Metastasierung des Primärtumors (113), da ETAR-Antagonisten explizit eine antimigratorische Wirkung haben. Eine Wirkung auf Zellproliferation konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Auch wenn einige andere *in vitro* Studien zwar eine Wirkung der ET-Achse auf das Wachstum von Tumoren nachweisen konnten (30), so wurde dennoch in klinischen Studien gezeigt, dass ETAR-Antagonisten metastasierende Ausbreitung von Tumoren inhibieren, sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Größe bereits etablierter Metastasen (113). Auch im Mammakarzinom-Modell von Prof. Basel al-Ramadi wurde die Anzahl von Metastasen durch Ambrisentan signifikant reduziert und die Überlebensrate der Mäuse durch Ambrisentan verbessert, Ambrisentan bewirkte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorwachstum (144). Eine antineoplastische Wirkung durch ETAR-Blockade wird in Zusammenschau der Daten eher durch eine Reduktion von Migration und Invasion, und so folglich Reduktion der Metastasierung erreicht und *in vivo* nicht über eine geminderte Zellproliferation. Klinische Studien untersuchten bisher meistens bereits Patienten mit bereits metastasierten Tumorleiden. Mit o.g. Wissen sollte die systemische Therapie mit ETAR-Antagonisten jedoch in früherem Krankheitsstadium vor Metastasierung begonnen werden (113).

Darüber hinaus ist der chemotherapeutische Kombinationspartner von fundamentaler Bedeutung, um eine optimale antineoplastische Wirkung zu erzielen. Vor dem Hintergrund des Rezeptor *crossstalks* sollten ggf. weitere GPCR bzw. Mitglieder des beschriebenen Netzwerks als Ziele in Betracht gezogen werden, um die ET-Achse effektiv zu blocken (113). Rosano et al. haben an Ovarialkarzinom-Zelllinien und im Tiermodell bereits zeigen können, dass eine kombinierte Therapie von ETAR-Antagonisten mit EGFR-Antagonisten Tumorzellwachstum und -invasion hemmt und Apoptose induziert (168). Wie bereits oben beschrieben, weist auch die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Transkriptomanalyse der Tumorzelllinie Colo357 auf einen möglichen *crossstalk* von ETAR mit verschiedenen anderen Rezeptoren wie z. B. EGFR hin (144), sodass ein EGFR-Antagonist ein vielversprechender Kombinationspartner für ETAR-Antagonisten sein könnte.

6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund von chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der systemischen Sklerose (SSc) und verschiedenen Neoplasien befasst sich diese Arbeit mit der Interaktion zwischen dem Endothelinrezeptor Typ A (ETAR) und zwei ETAR-Antagonisten im Hinblick auf die Modulation der Migration von Immun- und Tumorzellen. Basierend auf publizierten STRING-Datenbank- und *gene ontology*-Analysen wurden in einem Netzwerk von G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren ETAR als zentraler Mediator sowie die Regulation von zellulärer Migration durch ETAR als zentraler Mechanismus identifiziert. Demzufolge wurde hier anhand von *ex vivo* und *in vitro* Versuchen die Hypothese adressiert, ob die spezifischen ETAR-Antagonisten Ambrisentan (FDA- und EMA-zugelassen) und Sitaxentan die Migration von humanen Immunzellen und Tumorzellen inhibieren können.

Es wurde ermittelt, dass die Tumorzelllinien HL60, Colo357, OvCar3 und MDA-MB-231 ETAR und ETBR mRNA exprimieren. Zudem wiesen humane PMN, HL60- und Colo357-Zellen eine Oberflächenexpression der ETAR- und ETBR-Proteine auf. Während zwischen SSc-Patient*innen und gesunden Kontrollen kein Unterschied in der ETAR- bzw. ETBR-Expression oder der ETAR/ETBR-Expressionsratio von PMN gefunden wurde, korrelierte die ETAR/ETBR-Expressionsratio von PMN schwach mit CRP bei der SSc. Dies deutet darauf hin, dass ein niedriges ETAR/ETBR-Verhältnis von PMN mit einer höheren Krankheitsaktivität einhergeht. Unter den gewählten Zellkulturbedingungen blieb die Vitalität, die Phagozytosekapazität und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von PMN nach Behandlung mit Ambrisentan bzw. Sitaxentan unverändert. Des Gleichen blieb die Vitalität von Colo357-Zellen erhalten. Hingegen reduzierte die Behandlung mit Ambrisentan oder Sitaxentan die Proliferation von Colo357-Zellen und MDA-MB231-Zellen, jedoch statistisch nicht signifikant. Während unter den gewählten Bedingungen Sitaxentan eine Hemmung der fMLP-stimulierten Migration von PMN und HL-60-Zellen bewirkte, war ein Effekt von Ambrisentan nur bei den PMN zu beobachten. Die Par2-Agonist-stimulierte Migration von Colo357-Zellen wurde durch Ambrisentan und Sitaxentan gehemmt. Zudem hemmte Sitaxentan sowohl die unstimulierte als auch die Par2-Agonist-stimulierte Migration von OvCar3-Zellen. Zusammengefasst scheint Sitaxentan ein höheres Potenzial zur Inhibierung der Migration aufzuweisen, was an der höheren Selektivität für ETAR liegen könnte. Die Inhibierung der fMLP- oder Par2-Agonist-stimulierten Zellmigration durch die ETAR-Antagonisten, deutet auf einen Rezeptor *crosstalk* zwischen ETAR, dem Formyl-Peptid-

Rezeptor und dem Par2-Rezeptor hin. Solche Wechselwirkungen könnten sich auch in dem nach Behandlung mit Ambrisentan veränderten bzw. im Vergleich zur Behandlung mit dem Par2-Agonisten partiell normalisierten Transkriptom von Colo357-Zellen widerspiegeln. In einem sich an die hier vorgelegte Arbeit anschliessenden Tierexperiment zu metastasierendem Brustkrebs hat Ambrisentan die Metastasierung in die Lunge reduziert. Um potentielle antiinflammatorische Effekte von ETAR-Antagonisten wie z. B. die Hemmung der Migration von PMN *in vivo* zu validieren, steht die Etablierung eines entsprechenden Mausmodells der SSc an nächster Stelle.

7 Literaturverzeichnis

1. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2863–7.
2. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1985;17(3).
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411–5.
4. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*. 1999;126(2):391–8.
5. Nunez DJR, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest [Internet]*. 1990;85(5):1537–41. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI114601>
6. Resink TJ, Hahn AWA, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Bühler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168(3):1303–10.
7. Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis*. 1997;29(1):2–26.
8. Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol*. 2011;163(2):220–33.
9. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333(6):356–63.
10. Haynes WG, Webb DJ. The endothelin family of peptides: Local hormone with diverse roles in health and disease? *Clin Sci*. 1993;84(5):485–500.
11. EDN1 endothelin 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2021 Jan 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1906>
12. Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 2003;48(5):1190–9.
13. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev*. 2016;95499:357–418.
14. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(1):41–52.
15. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET(c) receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*. 1993;268(25):19126–33.
16. Maguire APDJJ, Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin. In: Moncada S, Higgs A, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg; 2006. p. 295–329.

17. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 30 years from discovery to therapy. *Hypertension*. 2019;74(6):1232–65.
18. Janes RW, Wallace BA. Modelling the structures of the isoforms of human endothelins based on the crystal structure of human endothelin-1. 1994;263(March). Available from: <https://doi.org/10.1042/bst0221037>
19. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga SI, et al. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*. 1992;267(26):18797–804.
20. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990;348(6303):730–2.
21. Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsøe K, Hauser AS, et al. GPCRdb in 2018: Adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D440–6.
22. D'Orléans-Juste P, Davenport AP, Godfraind T, Maguire JJ, Ohlstein EH, Ruffolo RR. Endothelin receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid to Pharmacol CITE*. 2019;2019(4):1–8.
23. Dagamajalu S, Rex DAB, Gopalakrishnan L, Karthikkeyan G, Gurtoo S, Modi PK, et al. A network map of endothelin mediated signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. 2021;15(2):277–82.
24. Miyauchi T, Sakai S. Endothelin and the heart in health and diseases. *Peptides* [Internet]. 2019;111:77–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.10.002>
25. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60(c-src). *J Biol Chem*. 1993;268(13):9347–57.
26. Henry PJ, Rigby PJ, Self GJ, Preuss JM, Goldie RG. Relationship between endothelin-1 binding site densities and constrictor activities in human and animal smooth muscle. 1990;1:786–92.
27. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 1995;92(3):357–63.
28. Davenport AP, Russell FD. Endothelin Converting Enzymes and Endothelin Receptor Localisation in Human Tissues. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 152. Springer, Berlin, Heidelberg; 2001. p. 209–37.
29. Cook N, Brais R, Qian W, Chan Wah Hak C, Corrie PG. Endothelin-1 and endothelin B receptor expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2015;68(4):309–13.
30. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013;13(9):1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23884378>
31. Tinazzi E, Puccetti A, Patuzzo G, Barbieri A, Argentino G, Confente F, et al. Endothelin Receptors Expressed by Immune Cells Are Involved in Modulation of Inflammation and in Fibrosis: Relevance to the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *J Immunol Res*

- [Internet]. 2015;2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/147616>
32. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell*. 2008;135(3):561–71.
 33. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998;125(5):813–24.
 34. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 1994;368(6473):703–10.
 35. Li MW, Mian MOR, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, et al. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2306–15.
 36. Dhaun N, Webb DJ. Endothelins in cardiovascular biology and therapeutics. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2019;16(8):491–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-019-0176-3>
 37. Granger JP, Spradley FT, Bakrania BA. The Endothelin System: A Critical Player in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* [Internet]. 2018;20(4)(32). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6064647/>
 38. Cheng YW, Li WJ, Dou XJ, Jia R, Yang H, Liu XG, et al. Role of endothelin-1 and its receptors in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Mol Med Rep*. 2018;18(6):5229–36.
 39. Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Abe K, et al. Production of Endothelin in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1990;50(11):3257–61.
 40. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: Emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):110–6.
 41. Yeager ME, Belchenko DD, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: Role of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(1):14–22.
 42. Vonk Noordegraaf A, Groeneveldt JA, Bogaard HJ. Pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* [Internet]. 2016;25(139):4–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0096-2015>
 43. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2016;37(1):67–119.
 44. Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(12 SUPPL.):S5–12.
 45. Vachiéry JL, Davenport A. The endothelin system in pulmonary and renal vasculopathy: Les liaisons dangereuses. *Eur Respir Rev*. 2009;18(114):260–71.
 46. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med*. 2020;9(3):824.

47. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET A receptor. *Life Sci.* 1992;50(9):247–55.
48. Davenport AP, Battistini B. Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development. *Clin Sci.* 2002;103(SUPPL. 48):5–7.
49. Dhillon S. Bosentan - A Review of its Use in the Management of Digital Ulcers Associated with Systemic Sclerosis. *Drugs.* 2009;69(14):2005–24.
50. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh AM, et al. Bosentan Therapy For Pulmonary Arterial Hypertension. *New Engl J Med.* 2002;346(12):896–903.
51. Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2005;46(3):529–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.050>
52. Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, et al. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: Results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-Blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation.* 2008;117(23):3010–9.
53. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani H-A, et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med.* 2013;369(9):809–18.
54. Aubert JD, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin-Receptor Antagonists beyond Pulmonary Arterial Hypertension: Cancer and Fibrosis. *J Med Chem.* 2016;59(18):8168–88.
55. Tilton RG, Munsch CL, Sherwood SJ, Chen SJ, Chen YF, Wu C, et al. Attenuation of pulmonary vascular hypertension and cardiac hypertrophy with sitaxsentan sodium, an orally active ET(A) receptor antagonist. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(2):87–97.
56. Clozel M, Maresta A, Humbert M. Endothelin receptor antagonists. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag, Berlin Heidelberg; 2013. p. 199–227.
57. Raghu G, Behr J, Brown KK, Egan JJ, Kawut SM, Flaherty KR, et al. Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis With Ambrisentan. *Ann Intern Med.* 2013;158(9):641.
58. Don GW, Joseph F, Celermajer DS, Corte TJ. Iron case of hepatic dysfunction following the global withdrawal of sitaxentan. *Intern Med J.* 2012;42(12):1351–4.
59. Peacock AJ, Zamboni W, Vizza CD. Ambrisentan for the treatment of adults with pulmonary arterial hypertension: A review. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(9):1793–807.
60. Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin V, McFarlin J. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension: Open-label pilot study. *Chest* [Internet]. 2002;121(6):1860–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.121.6.1860>
61. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Defining the affinity and receptor sub-type selectivity of four classes of endothelin antagonists in clinically relevant human cardiovascular tissues. *Life Sci* [Internet]. 2012;91(13–14):681–6. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.008>

62. Vizza CD, Fedele F, Pezzuto B, Rubin LJ. Safety and efficacy evaluation of ambrisentan in pulmonary hypertension. *Expert Opin Drug Saf.* 2012;11(6):1003–11.
63. Vatter H, Seifert V. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006;24(1):63–76.
64. Newman JH, Kar S, Kirkpatrick P. Ambrisentan. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(9):697–8.
65. Girgis RE, Frost AE, Hill NS, Horn EM, Langleben D, McLaughlin V V., et al. Selective endothelinA receptor antagonism with sitaxsentan for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(11):1467–72.
66. Wu C, Chan MF, Stavros F, Raju B, Okun I, Mong S, et al. Discovery of TBC11251, a potent, long acting, orally active endothelin receptor-A selective antagonist. *J Med Chem.* 1997;40(11):1690–7.
67. Galiè N, Hoeper MM, Gibbs JSR, Simonneau G. Liver toxicity of sitaxentan in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2011;32(4):386–7.
68. Hughes M, Herrick AL. Systemic sclerosis. *Br J Hosp Med [Internet].* 2019;80(9):530–6. Available from: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/hmed.2019.80.9.530>
69. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:509–37.
70. Schinke S, Riemekasten G. Systemic sclerosis. *Internist.* 2019;60(12):1251–69.
71. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet [Internet].* 2017;390(10103):1685–99. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30933-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30933-9)
72. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):530–6.
73. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: A vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum.* 1975;4(4):351–68.
74. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996;22(4):675–94.
75. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737–47.
76. Verri WA, Cunha TM, Magro DA, Guerrero ATG, Vieira SM, Carregaro V, et al. Targeting endothelin ETA and ETB receptors inhibits antigen-induced neutrophil migration and mechanical hypernociception in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;379(3):271–9.
77. Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Carvalho MHC, Fortes ZB, et al. ETA Receptor Blockade Decreases Vascular Superoxide Generation in DOCA-Salt Hypertension. *Hypertension.* 2003;42(4):811–7.

78. Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, Pecetti G, et al. Evaluation of the effect of bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1):261–4.
79. Yamane K, Kashiwagi H, Suzuki N, Miyauchi T, Yanagisawa M, Goto K, et al. Elevated plasma levels of endothelin-1 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1991;34(2):243–4.
80. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum*. 1991;34(8):978–83.
81. Hajjalilo M, Noorabadi P, Tahsini Tekantapeh S, Malek Mahdavi A. Endothelin-1, α -Klotho, 25(OH) Vit D levels and severity of disease in scleroderma patients. *Rheumatol Int*. 2017;37(10):1651–7.
82. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Shi-wen X, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol*. 1997;151(3):831–41.
83. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(SUPPL. 2):1–8.
84. Yamane K. Endothelin and Collagen Vascular Disease: A Review with Special Reference to Raynaud's Phenomenon and Systemic Sclerosis. *Intern Med*. 1994;33(10):579–82.
85. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: Relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol*. 2005;24(2):111–6.
86. Murthy S, Wannick M, Eleftheriadis G, Müller A, Luo J, Busch H, et al. Immunoglobulin G of systemic sclerosis patients programs a pro-inflammatory and profibrotic phenotype in monocyte-like THP-1 cells. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2021;60(6):3012–22.
87. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2014;16(1):R29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472528>
<http://arthritis-research.com/content/pdf/ar4457.pdf>
<http://arthritis-research.com/content/16/1/R29>
88. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(7):808–17.
89. Günther J, Rademacher J, van Laar JM, Siegert E, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):529–42.
90. Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, et al. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from

- systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):1–14.
91. Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* [Internet]. 1991;72(1):65–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1384337/>
 92. Cabral-Marques O, Marques A, Giil LM, De Vito R, Rademacher J, Günther J, et al. GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat Commun*. 2018;9(1).
 93. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(3):159–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>
 94. Neumeister B, Böhm BO, Beneke H, Claudi-Böhm S, Gerhardt A, Manfras B, et al. Hämatologie. In: *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 6. Auflage. München, Deutschland: Elsevier; 2018. p. 442–69.
 95. Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and Temporal Regulation of 3-Phosphoinositides by PI 3-Kinase and PTEN Mediates Chemotaxis. Vol. 109, *Cell*. 2002.
 96. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller JB, et al. PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. *Nat Immunol*. 2008;9(7):743–52.
 97. Barnes TC, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2012;51(7):1166–9.
 98. Glennon-Alty L, Hackett AP, Chapman EA, Wright HL. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018;125:25–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049>
 99. Mencarelli M, Pecorelli A, Carbotti P, Valacchi G, Grasso G, Muscettola M. Endothelin receptor A expression in human inflammatory cells. *Regul Pept* [Internet]. 2009;158(1–3):1–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011509001244>
 100. Cambiaggi C, Mencarelli M, Muscettola M, Grasso G. Gene expression of endothelin-1 (ET-1) and release of mature peptide by activated human neutrophils. *Cytokine*. 2001;14(4):230–3.
 101. Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174(2):613–8.
 102. Zarpelon AC, Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, et al. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF α and CXCL1/CXCR2 in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(2):187–99.
 103. Sampaio ALF, Rae GA, Henriques MGMO. Effects of endothelin ET A receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation. *J Leukoc Biol*. 2004;76(1):210–6.
 104. Elferink JGR, de Koster BM. The role of cyclic AMP and protein kinase A in stimulation of neutrophil migration by endothelins. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1998;358(5):518–21.

105. Sampaio ALF, Rae GA, Henriques MGMO. Participation of endogenous endothelins in delayed eosinophil and neutrophil recruitment in mouse pleurisy. *Inflamm Res*. 2000;49(4):170–6.
106. Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(7):838–54.
107. De Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(6):378–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.49>
108. Kuc RE, Carlebur M, Maguire JJ, Yang P, Long L, Toshner M, et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. *Life Sci* [Internet]. 2014;118(2):391–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.020>
109. Khimji A karim, Rockey DC. Endothelin-Biology and disease. *Cell Signal* [Internet]. 2010;22(11):1615–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.002>
110. Bhargava S, Stummeyer T, Hotz B, Hines OJ, Reber HA, Buhr HJ, et al. Selective inhibition of endothelin receptor A as an anti-angiogenic and anti-proliferative strategy for human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(5):703–9.
111. Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AKY. A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2014;89(2):314–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.011>
112. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins : Pharmacology , Molecular Physiology , Biology Biochemistry , Pathophysiology. *Pharmacol Rev*. 1994;46(2):328–94.
113. Kohan DE, Cleland JG, Rubin LJ, Theodorescu D, Barton M. Clinical trials with endothelin receptor antagonists: What went wrong and where can we improve? *Life Sci* [Internet]. 2012;91(13–14):528–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.034>
114. Kast RE. Endothelin-1 inhibition by ambrisentan as a potential treatment adjunct after debulking surgery in epithelial ovarian cancer. *Oncol Res*. 2009;17(8):383–6.
115. Kaatsch DP, Spix DC, Katalinic PDA, Hentschel DS, Luttmann DS, Waldeyer-Sauerland DM, et al. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. Berlin; 2019.
116. AWMF LODKDK. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL [Internet]. Vol. 51, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe AWMF). 2013. Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
117. Ahn HM, Kim DG, Kim YJ. Blockade of endothelin receptor A enhances the therapeutic efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020;527(2):568–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.118>
118. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0, AWMF-Registriernummer: 032/035OL [Internet]. 2020. Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>

- onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Ovarialkarzinom/Version_4/LL_Ovarialkarzinom_Langversion_4.0.pdf
119. Bagnato A, Tecce R, Castro V Di, Moretti C, Spergel D, Catt KJ. Autocrine Actions of Endothelin-1 as a Growth Factor in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* 1995;1(9):1059–66.
 120. Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. The endothelin axis in cancer: The promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86(8):473–84.
 121. Leitlinienprogramm Onkologie: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL [Internet]. 2020. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
 122. Smollich M, Götte M, Kersting C, Fischgräbe J, Kiesel L, Wülfing P. Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;108(2):175–82.
 123. Smollich M, Götte M, Fischgräbe J, MacEdo LF, Brodie A, Chen S, et al. ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(2):345–57.
 124. Kotz KT, Xiao W, Miller-Graziano C, Qian WJ, Russom A, Warner EA, et al. Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics. *Nat Med.* 2010;16(9):1042–7.
 125. Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp.* 2008;(17):1–2.
 126. Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. *J Immunol Methods.* 1980;36(2):109–17.
 127. Newburger PE, Chovaniec ME, Greenberger JS, Cohen HJ. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J Cell Biol* [Internet]. 1979;82(2):315–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2110469&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
 128. Ambrisentan | C22H22N2O4 - PubChem [Internet]. [cited 2020 Sep 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6918493#section=Solubility&fullscreen=true>
 129. Santa Cruz Biotechnology I. ETAR (H-60): sc-33535 [Internet]. [cited 2020 Sep 9]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-33535.pdf>
 130. Santa Cruz Biotechnology I. ETBR (H-74): sc-33537 [Internet]. [cited 2021 Nov 4]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-33537.pdf>
 131. Rademacher J, Kill A, Mattat K, Dragun D, Siegert E, Günther J, et al. Monocytic angiotensin and endothelin receptor imbalance modulate secretion of the profibrotic chemokine ligand 18. *J Rheumatol.* 2016;43(3):587–91.

132. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(6):754–63.
133. Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit [Internet]. [cited 2020 Sep 9]. Available from: <http://www.promocell.com/f/product-information/manual/PK-CA707-30018.pdf>
134. Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;162(2):261–8.
135. CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, für die Durchflusszytometrie [Internet]. [cited 2020 Sep 10]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34554#/C34554>
136. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, Quinn LA, McGavran L, Gordon SG. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* [Internet]. 1980;25(5):591–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6989766>
137. Sweeney KJ, Swarbrick A, Sutherland RL, Musgrove EA. Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene*. 1998;16(22):2865–78.
138. Scapini P, Cassatella M. Social networking of human neutrophils within the immune system \n. *Blood* [Internet]. 2014;124(First Edition Paper):710–20. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/early/2014/06/11/blood-2014-03-453217.full.pdf?sso-checked=1>
139. Gieseler F, Plattfaut C, Quecke T, Freund A, Ungefroren H, Ender F. Heterogeneity of microvesicles from cancer cell lines under inflammatory stimulation with TNF- α . *Cell Biol Int*. 2018;42(11):1533–44.
140. Witte D, Zeeh F, Gädeken T, Gieseler F, Rauch B, Settmacher U, et al. Proteinase-Activated Receptor 2 Is a Novel Regulator of TGF- β Signaling in Pancreatic Cancer. *J Clin Med*. 2016;5(12):111.
141. Kim KK, Turner R, Khazan N, Kodza A, Jones A, Singh RK, et al. Role of trypsin and protease-activated receptor-2 in ovarian cancer. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(5):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232253>
142. Cabral-Marques O, França TT, Al-Sbiei A, Schimke LF, Khan TA, Feriotti C, et al. CD40 ligand deficiency causes functional defects of peripheral neutrophils that are improved by exogenous IFN- γ . *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(5):1571-1588.e9.
143. Hirose M, Schilf P, Gupta Y, Zarse K, Künstner A, Fähnrich A, et al. Low-level mitochondrial heteroplasmy modulates DNA replication, glucose metabolism and lifespan in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–15.
144. Kappes L, Amer RL, Sommerlatte S, Bashir G, Plattfaut C, Gieseler F, et al. Ambrisentan, an endothelin receptor type A-selective antagonist, inhibits cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):15931. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72960-1>
145. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.

146. Zeeh F, Witte D, Gädeken T, Rauch BH, Grage-Griebenow E, Leinung N, et al. Proteinase-activated receptor 2 promotes TGF- β -dependent cell motility in pancreatic cancer cells by sustaining expression of the TGF- β type I receptor ALK5. *Oncotarget*. 2016;7(27):41095–109.
147. Vacca F, Bagnato A, Cart KJ, Tecce R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 2000;60(18):5310–7.
148. Schafer AE, Blaxall BC. G Protein Coupled Receptor-mediated Transactivation of Extracellular Proteases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017;70(1):10–5.
149. Köse M. GPCRs and EGFR – Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2017;27(16):3611–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.002>
150. Wang W, Qiao Y, Li Z. New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2018;39(4):367–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.001>
151. Schäfer B, Gschwind A, Ullrich A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*. 2004;23(4):991–9.
152. Ahmed SI, Thompson J, Coulson JM, Woll PJ. Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(4):422–31.
153. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
154. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, et al. Expression of endothelin 1 and endothelin a receptor in ovarian carcinoma: Evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*. 1999;59(3):720–7.
155. Kim SW, Choi HJ, Lee HJ, He J, Wu Q, Langley RR, et al. Role of the endothelin axis in astrocyte- and endothelial cell-mediated chemoprotection of cancer cells. *Neuro Oncol*. 2014;16(12):1585–98.
156. Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2010;31(5):221–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.002>
157. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay [Internet]. [cited 2021 Dec 4]. Available from: https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570
158. Peduto Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2003;88(5):788–95.
159. Banerjee S, Hussain M, Wang Z, Saliganan A, Che M, Bonfil D, et al. In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67(8):3818–26.

160. Galle J, Lehmann-Bodem C, Hübner U, Heinloth A, Wanner C. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O₂⁻ formation. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(3):339–46.
161. Cerrato R, Cunnington C, Crabtree MJ, Antoniadou C, Pernow J, Channon KM, et al. Endothelin-1 increases superoxide production in human coronary artery bypass grafts. *Life Sci* [Internet]. 2012;91(13–14):723–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.024>
162. Ishida K, Takechige K, Minakami S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1990;173(2):pp 496–500. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X05800610>
163. White-Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, Babcock GF. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol*. 1992;30(8):2071–6.
164. Heller A, Schmeck J, Heller S, Phan H, Nebe T, Urbaschek R, et al. Endothelin-1 impairs neutrophil respiratory burst and elimination of *Escherichia coli* in rabbits. *Crit Care Med*. 2000;28(5):1515–21.
165. Marey MA, Yousef MS, Liu J, Morita K, Sasaki M, Hayakawa H, et al. Endothelin-1 downregulates sperm phagocytosis by neutrophils in vitro: A physiological implication in bovine oviduct immunity. *J Reprod Dev* [Internet]. 2016;62(2):151–7. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/62/2/62_2015-112/_article/-char/ja
166. Cziráj L, Dankó K, Sipka S, Zeher M, Szegedi G. Polymorphonuclear neutrophil function in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 1987;46(4):302–6.
167. Moraitis S, Langdon SP, Miller WR. Endothelin expression and responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer Part A*. 1997;33(4):661–8.
168. Rosanò L, Di Castro V, Spinella F, Tortora G, Nicotra MR, Natali PG, et al. Combined targeting of endothelin a receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res*. 2007;67(13):6351–9.
169. Maguire JJ, Kuc RE, Pell VR, Green A, Brown M, Kumar S, et al. Comparison of human ET A and ET B receptor signalling via G-protein and β -arrestin pathways. *Life Sci* [Internet]. 2012;91(13–14):544–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.021>
170. Vasaikar S, Tsipras G, Landázuri N, Costa H, Wilhelmi V, Scicluna P, et al. Overexpression of endothelin B receptor in glioblastoma: A prognostic marker and therapeutic target? *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
171. Casserly B, Klinger JR. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther*. 2009;2:265–80.
172. Friedl P, Sahai E, Weiss S, Yamada KM. New dimensions in cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(11):743–7.
173. Elferink JANGR, Koster BENMDE. Endothelin-induced activation of neutrophil migration. *Biochem Pharmacol*. 1994;48(5):865–71.

174. Oktar BK, Coşkun T, Bozkurt A, Yeğen BÇ, Yüksel M, Haklar G, et al. Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(3 42-3):483–91.
175. Cabral-Marques O, Carvalho-Marques AH, Schimke LF, Heidecke H, Riemekasten G. Loss of balance in normal GPCR-mediated cell trafficking. *Front Biosci - Landmark*. 2019;24(1):18–34.
176. Oikawa T, Kusuhashi M, Ishikawa S, Hitomi J, Kono A, Iwanaga T, et al. Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*. 1994;69(6):1059–64.
177. Schaffner F, Versteeg HH, Schillert A, Yokota N, Petersen LC, Mueller BM, et al. Cooperation of tissue factor cytoplasmic domain and PAR2 signaling in breast cancer development. *Blood*. 2010;116(26):6106–13.
178. Yang L, Ma Y, Han W, Li W, Cui L, Zhao X, et al. Proteinase-activated Receptor 2 promotes cancer cell migration through RNA methylation-mediated repression of MIR-125b. *J Biol Chem*. 2015;290(44):26627–37.
179. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer [Internet]*. 2013;12(1):1. Available from: Molecular Cancer
180. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446–56.
181. Rayhman O, Klipper E, Muller L, Davidson B, Reich R, Meidan R. Small interfering RNA molecules targeting endothelin-converting enzyme-1 inhibit endothelin-1 synthesis and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 2008;68(22):9265–73.
182. Tocci P, Rosanò L, Bagnato A. Targeting Endothelin-1 Receptor/β-Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(September):1–7.
183. Jaaback K, Johnson N, Lawrie TA. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(2).
184. Sugarbaker PH, Stuart OA, Bijelic L. Intraperitoneal Gemcitabine Chemotherapy Treatment for Patients with Resected Pancreatic Cancer: Rationale and Report of Early Data. *Int J Surg Oncol*. 2011;2011:1–7.
185. Bhalla A, Haque S, Taylor I, Winslet M, Loizidou M. Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest*. 2009;39 Suppl 2:74–7.

8 Eigene Veröffentlichungen und Vorträge

1. **L. Kappes***, R. L. Amer*, S. Sommerlatte, G. Bashir, C. Plattfaut, F. Gieseler, T. Gemoll, H. Busch, A. Altahrawi, A. Al-Sbiei, S. M. Haneefa, K. Arafat, L. F. Schimke, N. El Khawanky, K. Schulze-Forster, H. Heidecke, A. Kerstein-Staehle, G. Marschner, S. Pitann, H. D. Ochs, A. Mueller, S. Attoub, M. J. Fernandez-Cabezudo, G. Riemekasten, B. K. al-Ramadi, O. Cabral-Marques: "Ambrisentan, an endothelin receptor type A-selective antagonist, inhibits cancer cell migration, invasion, and metastasis".

(* geteilte Erstautorenschaft)

Publiziert in Scientific Reports am 30. September 2020

DOI: 10.1038/s41598-020-72960-1

2. **L. Kappes**, S. Sommerlatte, C. Plattfaut, S. Pitann, G. Marschner, H. Heidecke, P. Lamprecht, A. Müller, F. Gieseler, O. Cabral-Marques, G. Riemekasten: „Inhibitory effect of endothelin-1 type A receptor antagonists on migration of neutrophils and tumour cells”

Publizierter *abstract* beim *Annual European Congress of Rheumatology*, veröffentlicht am 15. Juni 2017. Ausgabe 76, Suppl. 2, S. 1108

DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.6173

3. Sommerlatte, **L. Kappes**, S. Pitann, G. Marschner, H. Heidecke, P. Lamprecht, A. Müller, T. Lange, O. Cabral-Marques, G. Riemekasten: "The activation of muscarinic acetylcholine receptors influences the ontogeny of neutrophils"

Publizierter *abstract* beim *Annual European Congress of Rheumatology*, veröffentlicht am 15. Juni 2017. Ausgabe 76, Suppl. 2, S. 772

DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.6573

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AK	Antikörper
ANA	antinukleären Autoantikörpern
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
Auto-AK	Autoantikörper
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
CT	cycle threshold
CYP	Cytochrom P450
DLCO	<i>diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECE	Endothelin-Converting Enzyme
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EKR	<i>extracellular regulated kinases</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymal-Transition
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET	Endothelin
ETAR	Endothelinrezeptor Typ A
ETBR	Endothelinrezeptor Typ B
ETR	Endothelinrezeptor

EULAR	European League against Rheumatism
EZM	Extrazellulären Matrix
FCS	fetales bovines Serum
FDA	U. S. <i>Food and Drug Administration</i>
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FVC	forcierte Vitalkapazität
GSVA	<i>Gene Set Variation Analysis</i>
HC	<i>healthy controls</i> (gesunde Proband*innen)
HIF	<i>hypoxia induced factor</i>
i. p.	intraperitoneale
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL-8	Interleukin-8
ILD	<i>Interstitial Lung Disease</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
jew.	jeweils
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MMP-9	Matrix-Metallopeptidase 9
mRSS	<i>modified Rodnan Skin Score</i>
n. s.	<i>nicht signifikant</i>
n. W.	nach Weber
NO	Stickstoffmonoxid
NTproBNP	N-terminales pro- <i>Brain Natriuretic Peptide</i>
p. o.	per os
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PAR-2	<i>Protease-activated Receptor - 2</i>
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Azetat
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i> (Polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - α
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGFR 3	<i>vascular endothelial growth factor receptor 3</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aminosäuresequenz von Endothelin-1, adaptiert nach Haynes und Webb (10).	8
Abbildung 2: Aminosäuresequenz des Endothelinrezeptors Typ A.	9
Abbildung 3: Lokalisationen des Endothelinrezeptors Typ A.	10
Abbildung 4: Strukturformel Sitaxentan 13	13
Abbildung 5: Strukturformel Ambrisentan 13	13
Abbildung 6: Netzwerk-Analyse zur Identifizierung von Zielmolekülen für Autoantikörper.	18
Abbildung 7: Gating von PMN für MFI von ETAR und ETBR.	34
Abbildung 8: Gating von HL60 und Colo357.	35
Abbildung 9: Gating von PMN unter Ambristentan für Apoptose/Nekrose/Healthy Cells Assay.	38
Abbildung 10: Gating von Colo357 für Apoptose/Nekrose/Healthy Cells Assay.	38
Abbildung 11: Gating von PMN für ROS-Release-Assay.	39
Abbildung 12: Gatingstrategie zur Messung der Phagozytosekapazität bei PMN.	40
Abbildung 13: Proliferationsassay mit CFSE, Gating und Analyse.	41
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Transwell Assay.	42
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung des Gatings für PMN (A) und HL60-Zelllinie (C) 43	43
Abbildung 16: Schematische Darstellung Oris Migrationassay.	44

Abbildung 17: Balkendiagramm zur ETR-Expression der Colo357-, MDA MB 231-, OvCar3- und HL60-Zelllinie durch qPCR.....	46
Abbildung 18: Oberflächenexpression von ETAR und ETBR bei der Colo357-Zelllinie.	48
Abbildung 19: ETAR- und ETBR-Expression der Colo357-Zelllinie.....	49
Abbildung 20: Verteilung der ETAR- bzw. ETBR-Expression in einer HL60-Zellpopulation.	50
Abbildung 21: ETAR- und ETBR-Expression einer HL60-Zellpopulation.	50
Abbildung 22: Repräsentative Darstellung der ETR-Expression von PMN bei SSc.....	51
Abbildung 23: ETR-Expression von PMN bei Systemische Sklerose-Patient*innen und Gesunden.....	52
Abbildung 24: Expressionsratio von ETAR- Δ MFI/ETBR- Δ MFI bei SSc-Patient*innen in Gegenüberstellung zu gesunden Kontrollen.....	53
Abbildung 25: Korrelation von CRP-Werten bei SSc mit der ETAR/ETBR-Expressionsratio auf humanen PMN.....	54
Abbildung 26: Höhe der anti-ETAR-Antikörper-Titer (ETAR ab) in U/ml der untersuchten Kohorte von SSc-Patient*innen.	54
Abbildung 27: Vitalität nach Inkubation mit ETAR-Antagonisten.	55
Abbildung 28: Einfluss von Ambrisentan und Sitaxentan auf die Vitalität von PMN.....	56
Abbildung 29: Einfluss von Ambrisentan und Sitaxentan auf die Vitalität von Colo357-Zellen.	56
Abbildung 30: Vitalität für PMN (A) und Colo357-Zellen (B).	57
Abbildung 31: Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch humane PMN.....	58
Abbildung 32: Nachweis von Reaktiven Sauerstoffspezies produziert durch humane PMN nach Inkubation mit ETAR-Antagonisten.....	59
Abbildung 33: Zellpopulation von humanen PMN für Staph. aureus-Positive (%).	60
Abbildung 34: Phagozytose von PMN nach Inkubation mit/ohne ETAR-Antagonisten als Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung nach Phagozytose-Assay von humanen PMN.	60
Abbildung 35: Histogramme im Vergleich nach 0 bzw. 5 Tagen Proliferation mit und ohne ETAR-Antagonisten.	61
Abbildung 36: MFI von CFSE für Colo357- und MDA-MB-231-Zellen im Proliferations-Versuch nach 5 Tagen Proliferation mit/ohne ETAR-Antagonisten.....	62
Abbildung 37: Colo357-Zellen im Phasenkontrast-mikroskop vor und nach Proliferation.....	63

Abbildung 38: MDA-MB231-Zellen im Phasen-contrastmikroskop vor und nach Proliferation.....	63
Abbildung 39: Dosis-Wirkungsbeziehung von Sitaxentan und Ambrisentan auf die Migration von PMN.	64
Abbildung 40: Migration von humanen PMN im Transwell Assay.....	65
Abbildung 41: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von PMN im Transwell Assay.....	65
Abbildung 42: Migration von HL60-Zellen im Transwell Assay.....	67
Abbildung 43: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Effekts von Sitaxentan und Ambrisentan auf HL60-Zellen im Transwell Assay.....	67
Abbildung 44: Migration der Colo357-Zelllinie im Oris Assay.....	69
Abbildung 45: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von Colo357-Zelllinie im Oris Assay.	69
Abbildung 46: Migration der OvCar3-Zelllinie im Oris Assay.	71
Abbildung 47: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme des Effekts von ETAR-Antagonisten auf die Migration von OvCar3-Zellen im Oris Assay.	71
Abbildung 48: Wirkung von ETAR-Blockade auf das Transkriptom der Colo357-Zelllinie. .	73

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	27
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial und Assays	28
Tabelle 3: Reagenzien	28
Tabelle 4: Antikörper	30
Tabelle 5: Software	30
Tabelle 6: Zelllinien	31
Tabelle 7: Zellkulturmedien	31
Tabelle 8: Klinische Charakterisierung von Systemische Sklerose-Patient*innen	36
Tabelle 9: Charakterisierung der Gesunden Kontrollen.....	36
Tabelle 10: Überblick über die Δ CT-Mittelwerte $\pm$ SEM für ETAR- bzw. ETBR-mRNA mittels qPCR.....	47
Tabelle 11: Mittelwerte $\pm$ SEM bei Colo357- und MDA-MB-231-Zellen im Proliferationsversuch.....	62
Tabelle 12: Mittelwerte $\pm$ SEM bei humanen PMN im Migrationsversuch.....	66

Tabelle 13: Mittelwerte $\pm$ SEM bei HL60-Zellen im Migrationsversuch.....	68
Tabelle 14: Migrationsfläche (Mittelwert $\pm$ SEM) von Colo357-Zellen im Migrationsversuch.	70
Tabelle 15: Mittelwerte $\pm$ Standardfehler von OvCar3-Zellen im Migrationsversuch.	72

9.4 Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Cabral-Marques
Klinik für Rheumatologie

im Hause

nachrichtlich:
Frau Prof. Dr. med. Riemekasten, Direktorin der Klinik für Rheumatologie

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-199
Datum: 14. November 2016

Sitzung der Ethik-Kommission am 04. August 2016

Antragsteller: Herr Dr. Cabral-Marques

Titel: Identifikation und Charakterisierung von neuen Biomarkern bei entzündlichen Systemerkrankungen

Sehr geehrter Herr Dr. Cabral-Marques,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 09. November 2016, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und die überarbeiteten Unterlagen vorlegen.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Riemekasten für das interessante Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die konstruktive Förderung bedanken. Meiner Doktormutter PD Dr. Antje Müller danke ich für die engagierte und herzliche Betreuung, die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen und die schnelle und unkomplizierte Erreichbarkeit und Zuverlässigkeit sowie die zahlreichen Ratschläge. Dr. Otavio Cabral Marques möchte ich danken für die vielen Ideen und das Engagement für die Veröffentlichung des *papers*, ich habe viel von ihm gelernt.

Prof. Frank Gieseler und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der experimentellen Onkologie, das *know-how* und die freundliche Betreuung und Unterstützung, bei Dr. Corinna Plattfaut bedanke ich mich für die nette und konstruktive Hilfe.

Dr. Anja Kerstein-Stähle möchte ich danken für die positiven Worte und schnelle Hilfen. Vielen Dank an Silke Pitann und Gabriele Marschner für die Geduld und Hilfestellungen bei dem Erlernen der Methodiken und aufmunternde Worte. Sabine Sommerlatte, meiner Mitdoktorandin danke ich für die kurzweiligen Laborstunden.

Prof. Hauke Busch danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der Daten der RNA Transkriptomanalyse. Frau Prof. Tanja Lange danke ich für den kritischen wissenschaftlichen Blick.

Danke für das Stipendium durch das GRK 1727 „Modulation of Autoimmunity“ sowie die dadurch mögliche fachliche Erweiterung meines Horizonts und Danke insbesondere für die engagierte Begleitung durch Jennifer Hundt.

Ich danke meinen Eltern, Christine und Reinhard Kappes sowie meinen Großeltern für die unglaubliche Unterstützung während des gesamten Studiums in jeglicher Hinsicht. Dennis Utermöhlen, Laura Hochgürtel und meinem Bruder Jonas Kappes danke ich für Rat und Tat in jeder Lebenslage. Meiner Tochter Frida Sophie danke ich besonders, denn ohne sie gäbe es diese Arbeit wohl nicht.