

**Charakterisierung neuer Inhibitoren
des Proteinase aktivierten Rezeptors (PAR) 2
als Ansatz für eine anti-metastatische Tumorthherapie**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Sonja Stahn

geboren am 14.10.1986 in Meerbusch

Die vorliegende Arbeit wurde an der Fakultät für angewandte
Naturwissenschaften der Technischen Hochschule Köln angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Johannes-Peter Stasch
2. Prof. Dr. Ralf Anton Benndorf
3. Prof. Dr. Stefan Herzig

Datum der öffentlichen Verteidigung: 22.03.2016

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
I.2	Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR).....	3
I.2.1	Pathophysiologie Proteinase aktivierter Rezeptoren (PAR)	6
I.3	Tumorerkrankungen und Therapie.....	7
I.3.1	PAR2 Expression in humanen Tumoren.....	10
I.3.2	Rolle von PAR2 in Tumorwachstum und Metastase	11
I.4	PAR Inhibitoren.....	15
I.5	Naturstoffklasse der Teleocidine	17
II.	Ziele der Arbeit.....	19
III.	Material und Methoden	21
III.1	Material	21
III.1.1	Geräte.....	21
III.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
III.1.3	Puffer, Medien und Lösungen	21
III.1.4	Fluoreszenzfarbstoffe.....	22
III.1.5	Biochemische und zellbasierte Testsysteme	22
III.1.6	Verwendete Agonisten und Inhibitoren.....	22
III.1.7	Verwendete niedermolekulare Naturstoffe und synthetisierte Verbindungen	23
III.1.8	Verwendete Software.....	24
III.1.9	Statistische Datenanalyse.....	24
III.2	Methoden	25
III.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien und Medien.....	25
III.2.2	Intrazelluläre Calciummobilisierung	26
III.2.3	cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	27
III.2.4	Zellviabilität.....	29
III.2.5	PAR2 (human) Agonist Radioliganden Bindungstest	29
III.2.6	Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA	30
III.2.7	Zellmigrationsassay	30
III.2.8	Färbung des Aktinzytoskeletts und des Zellkerns	31
IV.	Ergebnisse	33
IV.1	Stimulation der endogenen Ca²⁺ Mobilisierung.....	33
IV.1.1	Stimulation der Ca ²⁺ Mobilisierung in glatten Muskelzellen	33
IV.1.2	Stimulation von PAR2 in Tumor- und Endothelzellen.....	35
IV.1.3	Stimulation von PAR2 in gesunden und metastatischen Brustepithelzellen	37
IV.1.4	Stimulation von PAR1 und P2Y in Tumorzellen	38
IV.1.5	Einfluss von Teleocidin A2 auf die intrazelluläre Ca ²⁺ Mobilisierung.....	40
IV.2	Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung durch Teleocidin A2	40
IV.2.1	Spezifische Inhibition der SLIGKV-NH ₂ abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung.....	41

IV.2.2	Spezifische Inhibition der Trypsin abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung.....	43
IV.3	Analyse der Bindung von Teleocidin A2 an PAR2	46
IV.4	Zielprotein unabhängige Wirkungen von Teleocidin A2	46
IV.4.1	Wirkung von Teleocidin A2 auf die Zellviabilität.....	47
IV.4.2	Einfluss der PKC auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung.....	47
IV.4.3	Teleocidin A2 und PAR2 abhängige Aktivierung der PKC in Tumorzellen.....	49
IV.5	PAR2 stimulierte Migration von Tumorzellen.....	50
IV.5.1	Stimulation der Migration von MDA-MB 231 abhängig von PAR2.....	51
IV.5.2	Rolle der Protein Kinase C in der PAR2 abhängigen Migration	53
IV.5.3	Regulation der PAR2 abhängigen Migration über die GTPasen Rac1 und RhoA	55
IV.6	Inhibition der PAR2 stimulierten Migration durch Teleocidin A2.....	56
IV.7	Einfluss von PAR2 und Teleocidin A2 auf das Aktinzytoskelett.....	59
IV.7.1	PAR2 stimulierte Reorganisation der Aktinfasern in MDA-MB 231.....	59
IV.7.2	Teleocidin A2 abhängige Reorganisation der Aktinfasern in MDA-MB 231	61
IV.8	Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung PAR2 inhibierender Teleocidine und Indolactam Derivate	63
IV.8.1	Wirkung von Teleocidinen auf die PAR2 abhängige Ca ²⁺ Ausschüttung	63
IV.8.2	Wirkung von Indolactam V und Indolactam Derivaten auf die PAR2 abhängige Ca ²⁺ Mobilisierung.....	67
IV.9	Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die Zellviabilität	75
IV.10	Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die PKC	76
V.	Diskussion	79
V.1	Inhibition PAR2 abhängiger Signalwege durch Teleocidin A2.....	79
V.1.1	Stimulation der endogenen Ca ²⁺ Mobilisierung.....	79
V.1.2	Spezifische Inhibition der PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung durch Teleocidin A2	84
V.1.3	Analyse der Bindung von Teleocidin A2 an PAR2	86
V.1.4	Zielprotein unabhängige Wirkungen von Teleocidin A2	88
V.1.5	PAR2 stimulierte Migration von Tumorzellen und der Einfluss von PAR2 auf das Aktinzytoskelett.....	90
V.1.6	Inhibition der PAR2 stimulierten Migration durch Teleocidin A2 und der Einfluss von Teleocidin A2 auf das Aktinzytoskelett.....	94
V.2	Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung PAR2 inhibierender Teleocidine und Indolactam V Derivate	96
V.2.1	Untersuchungen zur Struktur abhängigen Wirkung von Teleocidinen.....	96
V.2.2	Untersuchungen zur Struktur abhängigen Wirkung von Indolactamen.....	98
V.2.3	Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die Zellviabilität	99
V.2.4	Identifizierung potenter, spezifischer Indolactam V Derivate mit reduzierter PKC Aktivität	99
VI.	Ausblick.....	102
VII.	Zusammenfassung.....	103

VIII.	Anhang	I
VIII.1	Abkürzungsverzeichnis.....	I
VIII.2	Abbildungsverzeichnis.....	III
VIII.3	Tabellenverzeichnis	IV
IX.	Literaturverzeichnis.....	V
X.	Publikationen und wissenschaftliche Beiträge	XXI
	Danksagung.....	XXII
	Eidesstattliche Erklärung.....	XXIII
	Lebenslauf	XXIV

I. Einleitung

I.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) umfassen die größte Rezeptorfamilie im Genom von Säugetieren, etwa 800 Gene codieren für funktionale GPCRs (Jacoby *et al.*, 2006). GPCRs sind die Zielstrukturen für 30 - 40 % aller vermarkteten, verschreibungspflichtigen Medikamente und repräsentieren somit bis heute die erfolgreichste Targetproteinfamilie (Jacoby *et al.*, 2006; Heng *et al.*, 2013). Beispiele für meistverkaufte Arzneimittel sind der β_1 -Adrenorezeptor Agonist Salmeterol zur Erweiterung der Atemwege bei Asthma oder der GABA_B Agonist GABApentin bei der Indikation neurologischer Schmerz. Weitere Beispiele sind der P2Y₁₂ Antagonist Clopidogrel, angewendet als antithrombotisches Medikament zur Sekundärprophylaxe bei Schlaganfällen und Myokardinfarkten oder Antagonisten von β_1 -Adrenorezeptoren zur Behandlung von Bluthochdruck (Metoprolol, Bisoprolol) (Jacoby *et al.*, 2006).

GPCRs besitzen eine charakteristische, identische Grundstruktur: sieben transmembrane, hydrophobe Helices (7TM), die über jeweils drei extrazelluläre (ECL1-3) und drei intrazelluläre Schleifen (ICL1-3) verbunden sind und eine aminoternale, extrazelluläre sowie eine carboxyterminale, intrazelluläre Domäne (Yeagle und Albert, 2007; Pierce *et al.*, 2002). Auf zytosolischer Seite sind GPCRs über die 3. intrazelluläre Schleife an heterotrimeren G-Proteine gekoppelt, welche sich aus den Untereinheiten G_α , G_β und G_γ zusammensetzen und als molekulare Schalter wirken (Kobilka, 2007; Gilman, 1987). Die Rezeptoraktivierung wirkt sich auf die Konformation der Transmembranhelices aus und es kommt an G_α zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP) und zur Abdissoziation des G_β/G_γ Heterodimers von G_α , sodass abhängig von G_α und ebenso von $G_{\beta\gamma}$, nachgeschaltete Effektorproteine stimuliert werden können (Ballesteros *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2002). GPCRs interagieren unabhängig von heterotrimeren G-Proteinen mit weiteren Adaptermolekülen, den β -Arrestinen, die die Signalweiterleitung und –termination regulieren (Lefkowitz, 1998). Die Struktur und Funktion von GPCR und die Diversität unterschiedlicher G-Proteine in der Initiierung intrazellulärer biochemischer Signalkaskaden wurde in verschiedenen Übersichtsartikeln umfassend beschrieben (Rosenbaum *et al.*, 2009; Oldham und Hamm, 2008; Gilman, 1987; Simon *et al.*, 1991). Abbildung I.1 zeigt eine Übersicht.

$G_{\alpha s}$ stimuliert das membrangebundene Enzym Adenylatcyclase, welches aus ATP zyklisches AMP (cAMP) bildet (Bacskai *et al.*, 1993). $G_{\alpha i}$ dagegen hemmt Adenylatcyclasen und stimuliert cGMP spezifische Phosphodiesterasen. cAMP aktiviert die Protein Kinase A (PKA), sodass deren katalytische Untereinheit das Protein CREB (cAMP responsives Element (CRE)-bindendes Protein) phosphoryliert, das die Transkription reguliert. Die G-

Proteine G_{12} und G_{13} stimulieren Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs), die wiederum kleine RhoGTPasen aktivieren. Die kleinen GTPasen wirken als molekulare Schalter, sie sind aktiv in GTP gebundener Form (Siehler, 2009).

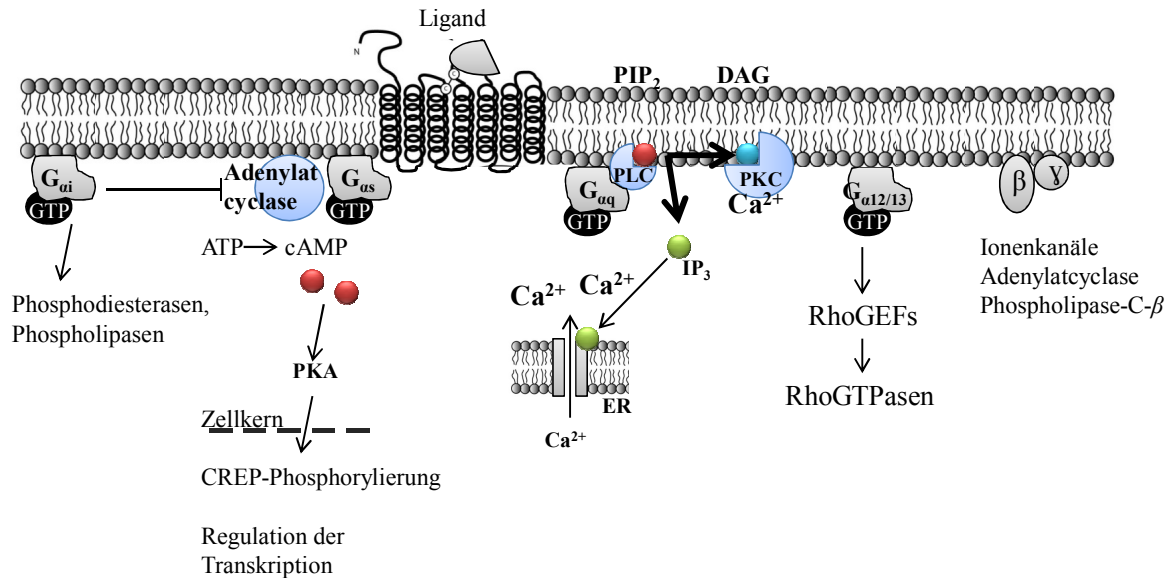


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung G-Protein abhängiger Signalwege¹

$G_{\alpha q}$ interagiert mit Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. Die Bindung von IP_3 an IP_3 -regulierte Ionenkanäle auf dem ER oder SR führt zu einem raschen, 10-50-fachen Anstieg der zytosolischen Calcium (Ca^{2+}) Konzentration (Neves *et al.*, 2002). Ca^{2+} fungiert als sekundärer Mediator, indem es Ca^{2+} abhängige zytosolische Proteine wie Calmodulin reguliert. Das membrangebundene DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC) zusammen mit Ca^{2+} (Steinberg, 2008). Aktivierte PKCs regulieren die Genexpression und beeinflussen die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Ein wichtiges physiologisches Zielprotein der PKC ist das endogen-myristylierte-Alanin-reiche-C-Kinase Substrat (MARCKS), ein peripheres Membranprotein, das spezifisch an den Serinresten Ser159, 163, 167 und 170 innerhalb der Bindedomäne für Calmodulin phosphoryliert wird (Heemskerk *et al.*, 1993; Thelen *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung durch PKC resultiert in der Bindung von Calmodulin an MARCKS, wodurch MARCKS in das Zytoplasma verlagert wird. Die Affinität des Proteins für Aktinfilamente wird dadurch herabgesetzt (Taniguchi und Manenti, 1993) und die Aktinfilamente verlinkende Aktivität von MARCKS negativ reguliert, sodass es zu einer Reorganisation der Filamente kommen kann (Hartwig *et al.*, 1992). Auch $G_{\beta\gamma}$ Dimere können neben G_{α} funktional aktiv sein und die Aktivität von Ionenkanälen, Adenylatcyclase und Phospholipase C regulieren (Marinissen und Gutkind, 2001).

¹ Abbildung erstellt in Anlehnung an Marinissen und Gutkind, 2001.

I.2 Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR)

Humane GPCRs wurden basierend auf ihrer Proteinsequenz und -struktur systematisch in drei große Hauptgruppen A, B, C klassifiziert: Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren (A), Sekretinrezeptoren (B) und metabotrope Glutamatrezeptoren (C). Die größte Gruppe der Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren bindet verhältnismäßig kleine Liganden, deren Bindungstasche innerhalb der sieben Transmembranhelices verborgen liegt. GPCRs der Familien B und C dagegen interagieren mit größeren Molekülen über Regionen der aminoterminalen Domäne, der extrazellulären Schleifen sowie exponierten Bereichen der Membranhelices und sind durch relativ lange N-Termini charakterisiert (Foord *et al.*, 2005).

Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR) gehören zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCR. Es sind vier PAR bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt wurden (PAR1-4) (Alexander *et al.*, 2013). PARs werden nicht über einen freien extrazellulären Liganden, sondern durch einen proteolytischen und dadurch irreversiblen Aktivierungsmechanismus aktiviert. Ihr endogener Ligand liegt eingebettet im jeweiligen extrazellulären N-Terminus vor (Zhao *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2011). Der N-Terminus wird an einer, für jeden der vier Rezeptoren, spezifischen Aminosäuresequenz proteolytisch von Serinproteasen gespalten (Tabelle I.1). Anschließend nimmt der verkürzte N-Terminus (engl. tethered ligand) die Ligandenfunktion ein und bindet an Regionen der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors (Abbildung I.2). Dies resultiert in Konformationsänderungen der Rezeptordomänen und der subsequenten Einleitung von intrazellulären, nachgeschalteten Signalwegen (Soh *et al.*, 2010; Ramachandran und Hollenberg, 2008).

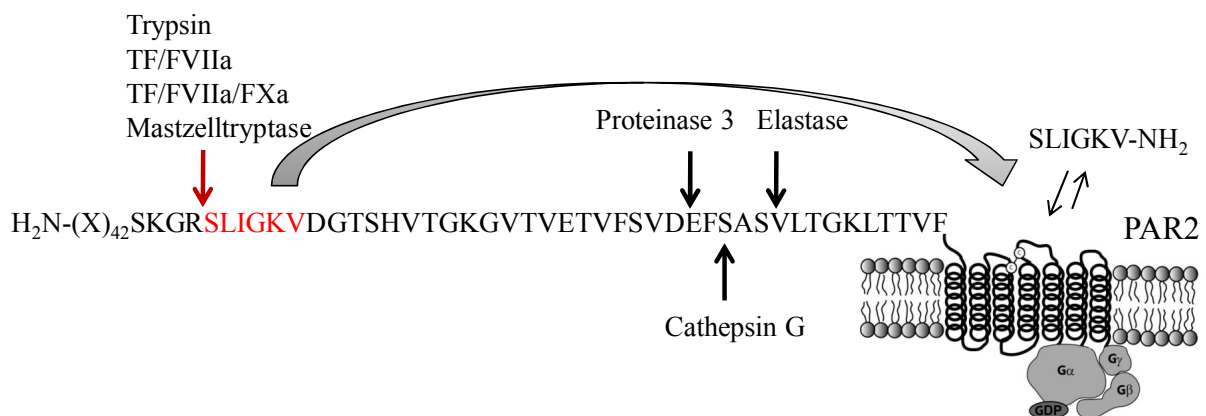


Abbildung I.2: Aktivierungsmechanismus Proteinase aktivierter Rezeptoren²

Die proteolytisch gereifte aminoternale Domäne interagiert mit Regionen der zweiten extrazellulären Schleife und wirkt dadurch auf die Rezeptorkonformation und -aktivierung. Proteasen wie Proteinase 3, Elastase und Cathepsin G regulieren PAR2 negativ, indem sie den Rezeptor aktivierenden Liganden durch proteolytische Spaltung entfernen. Synthetische Peptide (PAR2: SLIGKV-NH₂) können PAR direkt und unabhängig der Proteolyse aktivieren.

² Abbildung erstellt in Anlehnung an Zhao *et al.*, 2014 sowie in Anlehnung an Adams *et al.*, 2011.

Kurze, lösliche, synthetische Peptide aktivieren PARs direkt und unabhängig von der Proteolyse (Tabelle I.1). Sie sind abgeleitet von dem endogenen, proteolytisch gespaltenen N-Terminus und besitzen eine, im Vergleich zu den Proteasen, erheblich geringere Wirksamkeit (Scarborough *et al.*, 1992).

Zusätzlich und unabhängig von dem Blutgerinnungsprozess können Serinproteasen der Koagulationskaskade auf Zellmembranrezeptoren aus der Familie der PAR wirken (Déry *et al.*, 1998). Nach einer Gefäßverletzung kommt es während der sekundären Hämostase zur Einleitung der plasmatischen Gerinnung, die entweder Gewebethromboplastin (TF, engl. Tissue factor) abhängig über den extrinsischen Weg oder nach Aktivierung durch beschädigte Endothelien über den intrinsischen Weg initiiert wird. Der zentrale Schritt der Kaskade ist die Faktor Xa (FXa) vermittelte Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin; Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin. Serinproteasen der Gerinnungskaskade (Thrombin/IIa, VIIa, IXa, Xa) liegen als inaktive Proenzyme vor, die durch Spaltung in ein proteolytisches Enzym umgewandelt werden (Mackman *et al.*, 2007). Als ein funktionaler Zellmembranrezeptor für die zellvermittelten Aktionen von Thrombin konnte 1991 PAR1 als humaner Thrombin Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen kloniert werden (Vu *et al.*, 1991). PAR1 wird an den Aminosäureresten Arg41/Ser42 von Thrombin proteolytisch gespalten (Tabelle I.1). Thrombin reguliert unter anderem über den Proteinase aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) auf Thrombozyten die Thrombozytenaggregation (Coughlin, 2000).

Ein Komplex aus TF und den Koagulationsenzymen FVIIa und/oder FXa kann zusätzlich die Aktivität von Proteinase aktiviertem Rezeptor 2 (PAR2) regulieren (Camerer *et al.*, 2000). Eine Besonderheit von PAR2 ist, dass der Rezeptor einzig nicht durch die Protease Thrombin aktiviert, sondern proteolytisch von Trypsin an den Resten Arg36/Ser37 gespalten wird, wobei die N-terminale Sequenz SLIGKV freigelegt wird (Tabelle I.1) (Nystedt *et al.*, 1994). Einige weitere Serinproteasen aktivieren PAR2 an der Schnittstelle Arg36/Ser37, jedoch mit unterschiedlicher Potenz, darunter Trypsin I/II, Trypsin IV, Tryptase, Proteinase aus Immunzellen (Granzym A) oder verschiedene Gewebekallikrine (Kallikrine 2, 4, 6 und 14). Tryptase kann den Rezeptor zusätzlich an einer weiteren Schnittstelle, den Resten Arg41/Ser42, proteolytisch spalten (Zhao *et al.*, 2014).

PAR3 wird durch Thrombin an den Resten Lys38/Thr39 geschnitten und zusätzlich von aktiviertem Protein C (APC) reguliert (Burnier und Mosnier, 2013). Bisher scheint es, dass PAR3 keine eigenständigen Signalkaskaden induziert, sondern vielmehr als Cofaktor für die Thrombin abhängige Aktivierung von PAR4 oder als PAR1/PAR3 Heterodimer wirkt (Madhusudhan *et al.*, 2012; McLaughlin *et al.*, 2007; Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000). Des

Weiteren kann PAR3 nicht von synthetischen, löslichen Agonistpeptiden stimuliert werden (Tabelle I.1) (Ishihara *et al.*, 1997).

PAR4 wird ebenso wie PAR1 und PAR3 von Thrombin proteolytisch gespalten, besitzt aber eine geringere Affinität für Thrombin als PAR1. Im Gegensatz zu PAR1 und PAR3 besitzt PAR4 keine Hirudin ähnliche Bindedomäne innerhalb der aminoterminalen Sequenz, die die Bindung von Thrombin und die Proteolyse erleichtert. Jedoch kann PAR4 im Gegensatz zu den anderen Thrombin regulierten Rezeptoren zusätzlich mit ähnlicher Sensitivität von Trypsin reguliert werden (Xu *et al.*, 1998). PAR4 findet sich zusammen mit PAR1 als Heterodimer in humanen Blutplättchen und reguliert zusätzlich zu PAR1 die Funktion der Thrombozyten (Ramachandran und Hollenberg, 2008).

Tabelle I.1: PARs, ihre aktivierenden Proteasen und resultierenden N-Termini

Rezeptor	Proteinase	Prozessierter N-Terminus	Synthetisches Agonistpeptid	Referenz
PAR1	Thrombin Plasmin	SFLLRN-	TFLLR-NH ₂	Vu <i>et al.</i> , 1991
PAR2	Trypsin TF/VIIa, FXa Tryptase	SLIGKV- (h) SLIGRL- (m)	SLIGKV-NH ₂ SLIGRL-NH ₂ 2f-LIGRL-NH ₂	Nystedt <i>et al.</i> , 1994
PAR3	Thrombin	TFRGAP-	TFRGAP (keine Aktivierung)	Ishihara <i>et al.</i> , 1997
PAR4	Thrombin	GYPGQV-	AYPGKV-NH ₂ (h)	Xu <i>et al.</i> , 1998

Die neutrophilen Serinproteasen Cathepsin G, Proteinase 3 oder Elastase können im Zuge der initialen Stadien akuter inflammatorischer Prozesse durch infiltrierende Granulozyten als erste Antwort der angeborenen Immunität in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt werden (Korkmaz *et al.*, 2010; Burnier und Mosnier, 2013). Sie sind in der Lage, den N-Terminus von PAR2 an einer, von der aktivierenden Protease abweichenden Sequenz zu schneiden. Dadurch entfernen oder zerstören sie den innerhalb des extrazellulären N-Terminus liegenden aktivierenden Liganden (Shpacovitch *et al.*, 2008). Das Ergebnis ist ein deaktivierter Rezeptor, der nicht mehr auf die aktivierende Protease reagiert. Jedoch wurde in neueren Studien deutlich, dass Elastase zwar Trypsin und PAR2 abhängige Signale, wie die Ausschüttung von intrazellulärem Ca²⁺ oder die Rekrutierung des Adapterproteins β -Arrestin unterdrückt, jedoch gleichzeitig andere Signalwege in der Zelle stimuliert (Ramachandran *et al.*, 2011).

Die PAR vermittelte Signaltransduktion läuft über die klassische intrazelluläre Kopplung an heterotrimere G-Proteine (G_{αq}, G_{α12/13} und G_{αi}) und zusätzlich für PAR2 über G-Protein unabhängige Signalwege, die multifunktionale β -Arrestin Adaptermoleküle mit einbeziehen, ab (Paing *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2011). Die Signalweiterleitung durch PARs besitzt eine hohe Diversität und ist abhängig von ihrer physiologischen Umgebung und dem jeweiligen

Gewebetyp (Übersichtsartikel: Zhao *et al.*, 2014; Gieseler *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2012). PARs zeichnen sich durch ein sogenanntes „biased signaling“ aus. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Agonisten verschiedene nachgeschaltete Effektorproteine aktivieren und so verschiedene Signalwege und Antworten einleiten können (Hollenberg *et al.*, 2014). Aufgrund der irreversiblen proteolytischen Spaltung, muss die PAR abhängige Signalkaskade aktiv beendet werden: G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und nachgeschaltete Effektorinasen, wie PKC, phosphorylieren den Rezeptor an der carboxyterminalen Domäne und an der 3. intrazellulären Schleife. Dies fördert die Bindung von β -Arrestinen (DeWire *et al.*, 2007). Für die Internalisierung und Desensitivierung von PAR2 ist die Interaktion mit β -Arrestin Voraussetzung. Sie führt zur Bildung von Clathrin bedeckter Vesikel, Ubiquitylierung und Lysosomentargeting (Soh *et al.*, 2010).

I.2.1 Pathophysiologie Proteinase aktivierter Rezeptoren (PAR)

Im Allgemeinen sind PARs auf zahlreichen Körperzellen, wie Endothel-, Epithel-, Immun- oder glatten Muskelzellen und in zahlreichen Gewebetypen exprimiert. Sie regulieren dort kritische Prozesse, die zur Entwicklung pathophysiologischer Merkmale im kardiovaskulären, respiratorischen und gastrointestinalen System sowie im Bewegungsapparat und im zentralen Nervensystem beitragen und das Wachstum von Tumoren unterstützen (Ramachandran *et al.*, 2012). Basierend auf den zahlreichen krankheitsrelevanten Rollen die PARs einnehmen, sind die GPCR in den Fokus der Entwicklung neuer Therapeutika gerückt.

Im kardiovaskulären System regulieren PARs die vaskuläre Relaxation und die Thrombozytenaggregation (Kahn *et al.*, 1998). PAR2 spielt eine Rolle in der Antwort auf Gefäßverletzungen (Bucci *et al.*, 2005); die Aktivierung des Rezeptors verursacht die Proliferation von Endothelzellen und kann die Gefäßneubildung stimulieren (Mirza *et al.*, 1996; Milia *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde PAR2 mit der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie assoziiert. Die pulmonale Hypertonie (PH) umfasst verschiedene Formen des Lungengefäßhochdrucks und geht mit einer zunehmenden Belastung des rechten Herzens einher. *In-vivo* Studien mit dem oral verfügbaren und spezifischen Faktor Xa (FXa) Inhibitor Rivaroxaban zeigten eine Reduzierung des Drucks in der rechten Herzkammer und der Rechtsherzhypertrophie in Ratten und beschreiben die Rolle des Koagulationsfaktors Xa in experimenteller PH (Delbeck *et al.*, 2011). Aktiver FXa wirkt, abhängig von TF und FVIIa, proteolytisch auf die aminoternale Domäne von PAR2 (Camerer *et al.*, 2000). In Plasmaproben von Patienten mit idiopathischer pulmonal arterieller Hypertonie (IPAH) ist weiterhin die Konzentration von Trypsin erhöht, die PAR2 ebenso proteolytisch spaltet (Molino *et al.*, 1997; Steinhoff *et al.*, 2000). Sie stimuliert PAR2 abhängig die Proliferation humaner primärer pulmonal arterieller glatter Muskelzellen (PASMC) (Kwapiszewska *et al.*,

2012). Erhöhte PAR2 Expressionslevel in IPAH Patienten unterstützen zusätzlich die These, dass PAR2 assoziierte Signalwege zur vaskulären Remodelierung und Verdickung der Gefäßmuskulatur bei Lungenhochdruck beitragen (Kwapiszewska *et al.*, 2012).

PAR2 ist ein relevanter Rezeptor in der Pathophysiologie inflammatorischer Erkrankungen, dazu zählen entzündliche Darmerkrankungen, wie Dickdarmentzündungen (Kim *et al.*, 2003; Maharshak *et al.*, 2015), Bauchspeicheldrüsenentzündungen (Kawabata *et al.*, 2008), Arthritis (Russell und McDougall, 2009) sowie neurologische Fehlfunktionen und Entzündungen innerhalb des Nervensystems (Rothmeier und Ruf, 2012). Die Expression und Aktivierung von PAR2 im Nervensystem ist in die Verarbeitung von Schmerz involviert (Bao *et al.*, 2014). Unter anderem ist PAR2 in die angeborene Immunantwort des Herzens involviert (Weithauser *et al.*, 2013).

In den Atemwegen sind PARs an der Regulation der Entzündungsantwort sowie der Rekrutierung inflammatorischer Zellen beteiligt. Mastzelltryptase stimuliert PAR2 abhängig die Proliferation von Fibroblasten in der Lunge und spielt daher eine Rolle in der Pathogenese von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) und pulmonaler Fibrose (Akers *et al.*, 2000). Allergene und Serinproteasen der Hausstaubmilbe (Der-p1) besitzen Trypsin ähnliche Aktivität und können dadurch PAR2 aktivieren. Aus diesem Grund nimmt PAR2 eine Funktion in Allergen-induziertem Asthma ein (Walker und DeFea, 2014).

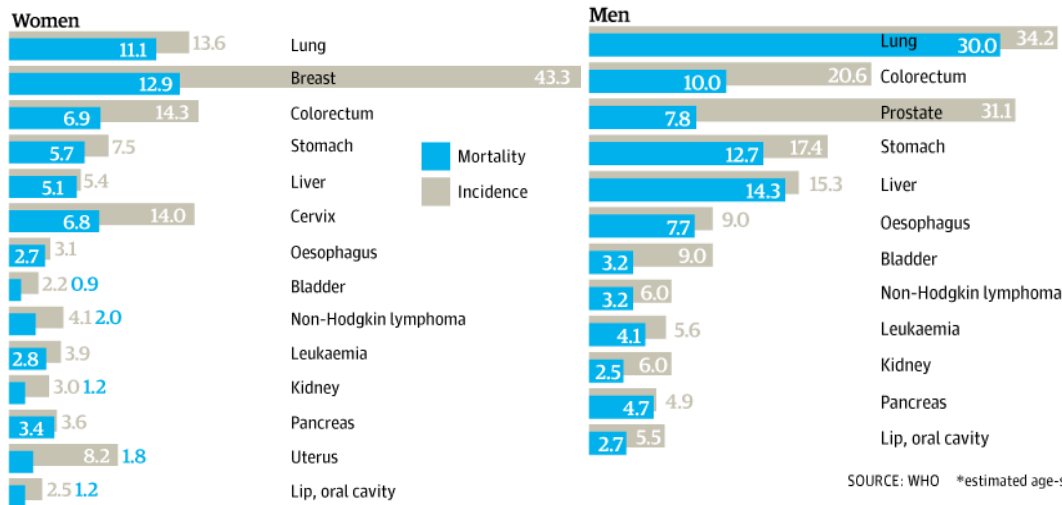
Nicht zuletzt vermitteln Protease aktivierte Rezeptoren wachstumsfördernde und prometastatische Signale in der Entwicklung maligner Tumore (Ramachandran *et al.*, 2012). Auf die Expression der verschiedenen PARs in humanen Tumoren im Allgemeinen und die Rolle von PAR2 in Tumorerkrankungen im Speziellen wird in Kapitel I.3.1 der Einleitung eingegangen.

I.3 Tumorerkrankungen und Therapie

Im Weltkrebsbericht 2014 prognostiziert die Weltgesundheitsorganisation bis 2025 einen starken Anstieg in der Anzahl an Menschen, die jährlich weltweit an Krebs erkranken. Im Jahr 2012 gab es weltweit um die 14 Millionen Krebsneuerkrankungen und es starben 8 Millionen Menschen an krebsbedingten Ursachen (Stewart und Wild, 2014). Tumorerkrankungen sind damit nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Tumorerkrankungen der Lunge und der Brustdrüse stehen mit ca. 13 % bzw. 12 % an erster und zweiter Stelle der Krebsneuerkrankungen, wobei Lungenkrebs gleichzeitig die höchste Mortalitätsrate zeigt (Abbildung I.3).

Worldwide cancer rates

Incidents and mortality rates per 100,000 people*



SOURCE: WHO *estimated age-standardised, 2012

Abbildung I.3: Krebsneuerkrankungen und Mortalität 2012³

In Deutschland dokumentiert das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) für 2011 etwa 483.000 Tumorneuerkrankungen, davon betrafen etwa 70.000 die Brustdrüse, 64.500 die Prostata, 63.000 den Darm und 52.700 die Lunge. Die 5-Jahres Überlebensraten sind abhängig von den verschiedenen Tumorarten und liegen bei Lungenkrebs unter 20 % und bei Brustkrebs durch verbesserte Therapieansätze bei mittlerweile etwa 80 % (Kaatsch *et al.* 2013).

Tumorerkrankungen der Lunge verlaufen in frühen Stadien oft asymptomatisch und werden daher meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Günstige Prognosen bestehen jedoch nur bei auf die Lunge beschränkten Primärtumoren (5-Jahres Überlebensrate: 54%). Bei Diagnose einer fortgeschrittenen Neoplasie liegt die 5-Jahres Überlebensrate bei gerade einmal 4 % (Howlader *et al.*, 2012). Die hohe Dichte an Blutgefäßen und Lymphbahnen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Primärtumorzellen in das Blutsystem gelangen und in andere Gewebe streuen. Bronchialkarzinome werden in kleinzellige, Chemotherapie sensitivere (small cell lung cancer, SCLC) (etwa 15%) und häufigere nicht-kleinzellige (non small cell lung cancer, NSCLC) (etwa 85%) Formen unterteilt (Jackman und Johnson, 2005). Nicht kleinzellige Karzinome können in frühen Stadien durch eine lokale Operation mit adjuvanter Chemotherapie behandelt werden. In späteren Stadien kann das Tumorwachstum mit Hilfe von Bestrahlung und Chemotherapie gehemmt werden (Goeckenjan, 2010). EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Mutationen und erhöhte EGFR Expression führen zu einer positiven Ansprechrate auf zielgerichtete EGFR Tyrosinkinase Inhibitoren, wie

³ Abbildung aus IARC World Cancer Report 2014 (Stewart und Wild, 2014).

Erlotinib oder Gefitinib (Paez *et al.*, 2004; Cappuzzo *et al.*, 2005). Ein anderes, häufig mutiertes Onkogen codiert für KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma), sodass KRAS regulierte Signalwege konstitutiv aktiviert werden. KRAS mutierte NSCLC sprechen in sehr geringem Maße auf adjuvante Chemotherapie an und überlappen nicht mit EGFR Mutationen (Riely *et al.*, 2009). Trotz diverser Ansätze sind jedoch bisher keine direkten anti-KRAS Therapien vorhanden (Lovly *et al.*, 2015).

Die Mortalitätsraten für das Mammakarzinom gehen seit einigen Jahren trotz steigender Neuerkrankungen zurück (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005). Hormonempfindliche Östrogen-Rezeptor (ER) bzw. Progesteron-Rezeptor (PR) positive Tumore können mit Hilfe einer Antihormontherapie behandelt werden. Eine endokrine Therapie mit Tamoxifen, einem Inhibitor des Östrogen-Rezeptors und Aromatasehemmern bzw. GnRH (Gonadotropin releasing hormone)-Analoga, die den Östrogenspiegel senken, wird vor allem nach einer Operation als adjuvante Therapie angewendet und zielt darauf ab, das hormonstimulierte Wachstum der Tumorzellen zu unterdrücken (American Cancer Society, 2014). Etwa 20-30 % aller Mammakarzinome sind HER2-neu Rezeptor positiv, das heißt, dass die Tumorzellen verstärkt epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) exprimieren (American Cancer Society, 2014). Zielgerichtete Therapien mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab oder dem Tyrosinkinase-Hemmer Lapatinib dämmen das Wachstum HER2 positiver Karzinome ein (Arteaga *et al.*, 2012; Romond *et al.*, 2005). Tumorarten, deren Hormonrezeptorstatus negativ ist und die keine Überexpression an HER2-neu zeigen, reagieren weder auf eine Antihormontherapie, noch auf die zielgerichtete Therapie mit HER2 Inhibitoren: sie werden als dreifach negativ (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) eingestuft. 10–20 % aller invasiven Mammakarzinome sind dreifach-negative Brusttumore (TNBC) mit deutlich aggressiveren Formen des Tumorwachstums und schlechterer Prognose. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt 22 % in fortgeschrittenen Stadien, wobei die für Brustkrebs allgemeine 5-Jahres Überlebensrate bei 80 % liegt (Boyle, 2012; Dent *et al.*, 2007). Die Behandlung beschränkt sich hauptsächlich auf operative Verfahren, Bestrahlung und Chemotherapie mit zumeist einer Kombination aus einem Mitosehemmer (z.B. Taxane) und einem Anthrazyklin. Zielgerichtete Therapien gelten als Hoffnungsträger in der Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von TNBC (Laurentiis *et al.*, 2010). Erfolge konnten in Patienten mit TNBC und Funktionsverlust-Mutationen im Tumorsuppressorgen Breast cancer 1 oder 2 (BRCA1, BRCA2), einem Protein, das geschädigte DNA repariert (Antoniou *et al.*, 2003), erzielt werden: klinische Studien mit Inhibitoren der poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP), einem Enzym, das DNA Schäden repariert, erzielten gesteigerte Überlebensraten bei Patienten mit TNBC in fortgeschrittenen Stadien in Kombination mit einer Chemotherapie (Sonnenblick *et al.*, 2015).

I.3.1 PAR2 Expression in humanen Tumoren

Eine Studie zur Analyse der in der Literatur dokumentierten Expression der vier verschiedenen PAR in humanen Primärtumoren, Primärtumorzellen und Tumorzelllinien ergab grundsätzlich höhere Expressionsraten von PAR1 und PAR2 im Vergleich zu PAR3 und PAR4. Jedoch ist anzumerken, dass der Anteil an PAR3 oder PAR4 basierten Studien zur Analyse ihrer Rolle in Tumoren geringer war (Tabelle I.2) (Elste und Petersen, 2010).

Tabelle I.2: Übersicht zur Expression von PAR1, 2, 3 und 4 in humanen Tumorproben und Zelllinien⁴

Die Expression der Rezeptoren wurde mittels verschiedener Methoden (RT-PCR, Western Blot, Immunohistochemie) analysiert. PT, Primärtumor; PC, Primärzellkultur; Zn, Zelllinie; ADC, Adenocarcinoma; HCC, Hepatocellular carcinoma; IDC, Invasive ductal carcinoma; SCC, Squamous cell carcinoma.

Organ	Art des Tumors	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Prostata	ADC	PT 100%	PT 100%	Zn 0%	PT 100%
Brust	Karzinom		Zn 100%		Zn 0%/100%
	IDC	Zn 33%	PT 100%		
	ADC			PT 0%	
Cervix	SCC		PT 100%		
Haut	Melanom	PT 94%	PT 92%	Zn 0%	Zn 0%
Leber	HCC	PT 10%		PT 0%	PT 0%
Niere	ADC	PC 100%	Zn 100%	PC 100%	PC 0%
Lunge	ADC (NSCLC)	PT 77%	Zn 100%		PT 73%
Darm	ADC	PT 91%	PT 100%		
Kopf, Nacken	SCC	PT 50-80%			
ZNS	Glioblastom	PC 100%	Zn 100%		
Pankreas	ADC	Zn 100%	PT 100%		
Magen	ADC		PT 100%		

Eine Vielzahl von Studien konnte belegen, dass PAR2 verstärkt auf isolierten Tumorzelllinien exprimiert wird. Die Expression des Rezeptors konnte auf Adenokarzinomzelllinien, etabliert aus Tumorgewebe der Brust (Su *et al.*, 2009), des Darms (Hu *et al.*, 2013) und der Bauchspeicheldrüse (Shi *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015) sowie auf Glioblastomzellen (Svensson *et al.*, 2011) und auf hepatozellulären Karzinomzellen (Kaufmann *et al.*, 2011; Nakanuma *et al.*, 2010) nachgewiesen werden. Insbesondere konnte die Expression und Aktivierung von PAR2 auf der aus einem TNBC isolierten Zelllinie MDA-MB 231 und auf der NSCLC Zelllinie A549 detektiert werden (Hjortoe *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2013).

Hochregulierter PAR2 in isoliertem Tumorgewebe aus einem Mammakarzinom (Rydén *et al.*, 2010) und einem hochgradigen Astrozytom (Svensson *et al.*, 2011) konnte mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert werden. PAR2 konnte weiterhin in einem Lungenkarzinom (D'Andrea *et al.*, 2001), sowie einem Magen- und Speiseröhrentumor (Li *et al.*, 2014) detektiert werden. In Eierstocktumoren korrelierten gesteigerte PAR2 mRNA- und

⁴ Tabelle erstellt in Anlehnung an Elste und Petersen, 2010.

Proteinlevel mit fortgeschrittenen klinischen Stadien (Jahan *et al.*). Darüber hinaus ist PAR2 in weiteren Zellen der Tumormikroumgebung (TME) exprimiert: die Expressionsraten sind in Mastzellen, Makrophagen, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen, isoliert aus malignen Läsionen, im Gegensatz zu normalen und gutartigen Gewebeproben erhöht (D'Andrea *et al.*, 2001). In einer *in vivo* Studie mit transgenen Mäusen, die spontan metastasierende Adenome ausbilden (MMTV-PyMT), war die Entwicklung und Metastasierung des Tumors in PAR2 defizienten Mäusen stark verzögert (Versteeg *et al.*, 2008). Klinische Untersuchungen konnten erstmalig zeigen, dass Patientinnen, die an primärem Brustkrebs erkrankten und deren Tumorgewebe erhöhte Level an PAR2 und PAR2 abhängig phosphorylierten Gewebefaktor (TF) aufwiesen, eher unter dem Wiederauftreten der Tumore litten und sich verstärkt erneut Tumore ausbildeten. Gleichzeitig korrelierte die Co-Expression von PAR2 und VEGF mit aggressiveren Tumorarten (Rydén *et al.*, 2010).

Die Analyse der tumorassoziierten Expression von PAR2 in Tumorzelllinien und -gewebe und die klinische Relevanz der PAR2 Expression in metastasierenden Tumoren, macht PAR2 zu einem möglichen Regulator der Aggressivität einer neoplastischen Erkrankung und verbindet den Rezeptor mit malignen Verläufen.

1.3.2 Rolle von PAR2 in Tumorwachstum und Metastase

Neoplastische Erkrankungen gehen auf entartete, körpereigene Zellen zurück, die in die proliferative Unabhängigkeit von wachstumsregulierenden Signalmolekülen übergehen, Tumorsuppressorgene abschalten und Mechanismen etablieren, um die Apoptose zu umgehen. Entartete Zellen stimulieren die Angiogenese neuer Gefäße in der TME und aktivieren die Invasion und Metastase, um aus ihrer primären Gewebeumgebung auszuwandern (Hanahan und Weinberg, 2011). Tumore bestehen vielmehr aus komplexen Zellverbänden mit entarteten, proliferierenden und tumorassoziierten Zellen, darunter Endothelzellen und Perizyten, Immunzellen und tumorassoziierten Fibroblasten, die miteinander interagieren und über Signalmoleküle kommunizieren und dadurch metastatische und angiogene Prozesse regulieren und aktivieren (Ostman und Augsten, 2009; Hanahan und Weinberg, 2011).

Das Auftreten thromboembolischer Komplikationen und hyperkoagulativer Stadien korreliert zumeist mit einer erhöhten Malignität und einer schlechten Prognose neoplastischer Erkrankungen (Sorensen *et al.*, 2000). Die Aktivierung der Blutkoagulation durch den Tumorzell-exprimierten TF und die gleichzeitige Exposition von Phosphatidylserin kann zur Ausbildung eines Fibrinpolymers führen, das den Tumor vor der Eliminierung durch natürliche Killerzellen des angeborenen Immunsystems schützt (Palumbo *et al.*, 2004). Auch

konnte gezeigt werden, dass Koagulationsfaktoren regulierende Funktionen in der Angiogenese und Metastase einnehmen (Lima und Monteiro, 2013). In humanen, malignen Tumorgeweben konnten erhöhte Level an exprimiertem TF nachgewiesen und mit verstärkter Invasivität und Metastasierung assoziiert werden (van den Berg *et al.*, 2012). Es gibt zunehmende Hinweise, dass Blutkoagulationsenzyme in der TME, darunter aktiver Faktor VIIa oder Xa, PAR2 im Komplex mit TF proteolytisch spalten und über die PAR2 regulierte Signalweiterleitung Einfluss auf metastatische Prozesse nehmen (Schaffner und Ruf, 2009). Tumorzellen sekretieren PAR2 stimulierende Proteasen wie Trypsin (Ducroc *et al.*, 2002) und inflammatorische, tumorassoziierte Mastzellen sekretieren zusätzlich Mastzelltryptase, die ebenso PAR2 proteolytisch aktiviert (Molino *et al.*, 1997).

Eine Vielzahl von Studien dokumentiert, dass PAR2 regulierte Signale in Tumorzellen eine kritische Rolle spielen, indem sie die Proliferation, Migration und Invasion der Zellen anregen und gleichzeitig Zellen in der TME aktivieren können (Abbildung I.4) (Reviewartikel: Gieseler *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2011).

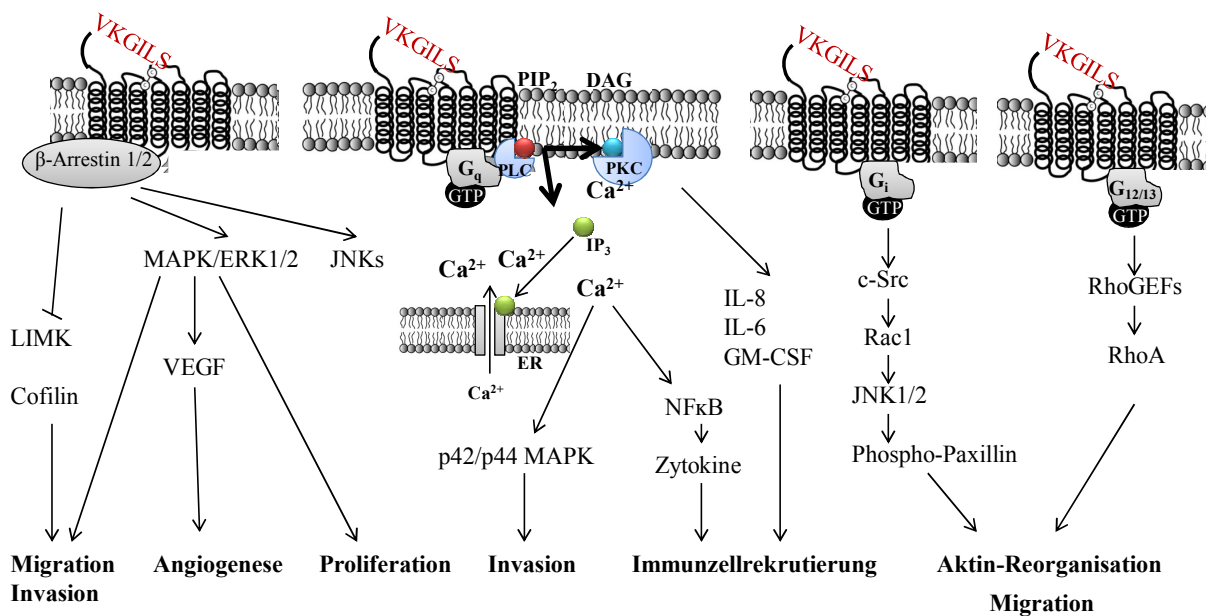


Abbildung I.4: Schematische Darstellung PAR2 regulierter Signalkaskaden⁵

Die PAR2 assoziierte Signalweiterleitung stimuliert verschiedene tumorfördernde Prozesse. [LIMK, LIM Kinase ; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ERK, Extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; c-Src, cellular Src kinase].

Die Aktivierung von PAR2 mit TF/VIIa, Trypsin oder SLIGKV-NH₂ kann die Apoptose in Tumorzelllinien reduzieren (Luo *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2013) und führt zu einer gesteigerten Proliferation von Tumorzellen aus unterschiedlichen Geweben, darunter Gallengangs-, Dickdarm- und Magenkarzinomzellen sowie pankreatischen Tumorzellen (Nakanuma *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013; Miyata, 2000; Xie *et al.*, 2015). PAR2 stimuliertes

⁵ Die Abbildung wurde basierend auf den folgenden Literaturstellen generiert: Zoudilova *et al.*, 2010; Liu und Mueller, 2006; Kaufmann *et al.*, 2011; Hjortoe *et al.*, 2004; Darmoul *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2005; Suen *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2009.

Zellwachstum in Darmadenokarzinomzellen wird über PKC α und ERK reguliert (Hu *et al.*, 2013). Auch in Stromalen Fibroblasten aus einem intrahepatischen Gallengangskarzinom (ICC) konnte die Expression von PAR2 detektiert und die Mastzelltryptase und SLIGKV-NH₂ abhängige Aktivierung einer PAR2 abhängigen fibroproliferativen Antwort gezeigt werden (Akers *et al.*, 2000; Frungieri *et al.*, 2002). Fibroblasten vermitteln protumorigene Effekte (Ostman und Augsten, 2009) in der TME; sie werden auch im Zuge einer Gewebeverletzung stimuliert und sind Bestandteil der extrazellulären Matrix. Ebenso sind PAR2 Agonisten in der Lage Endothelzellen zu aktivieren und ihre Proliferation zu stimulieren (Mirza *et al.*, 1996).

Proangiogene Faktoren wie VEGF, Angiopoetin-1 oder FGF2 fördern die Ausbildung neuer Blutgefäße innerhalb des soliden Tumors, sodass dieser mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann und metabolische Abfallprodukte abtransportiert werden können. Überwiegt die Anwesenheit pro- gegenüber anti-angiogener Moleküle in der TME, kommt es zu einem „angiogenen Switch“ (Bergers und Benjamin, 2003) und ein kritischer Punkt in der Entwicklung maligner und metastasierender Tumore wird erreicht (Hanahan und Folkman, 1996). In primären Endothelzellen wurde eine durch hypoxische Bedingungen erhöhte Expression von PAR2 nachgewiesen (Svensson *et al.*, 2011). Auch wurde gezeigt, dass PAR2 die Expression und Freisetzung von VEGF stimuliert (Rasmussen *et al.*, 2012) und diese in Brustkrebszellen und Glioblastomzellen abhängig von MAPK Signalwegen reguliert wird (Liu und Mueller, 2006; Dutra-Oliveira *et al.*, 2012), was eine potenzielle Rolle des Rezeptors in der Tumorangio-genese hervorhebt.

Der gerichtete Auf- und Abbau von Aktinstrukturen und Kontakten mit der extrazellulären Matrix in Zellen ist Voraussetzung für die Beweglichkeit der Zellen und trägt somit im weitesten Sinne zur Wanderung und Invasion der Zellen aus ihrem ursprünglichen Gewebeverband in nahe Blut- oder Lymphgefäße sowie zum Eintritt in entfernt liegende Gewebe bei. Kleine RhoGTPasen wirken als molekulare Schalterproteine, die in GDP gebundener Form inaktiv und in GTP gebundener Form aktiv sind. Sie unterliegen der Regulation durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF), die den Austausch von GDP mit GTP stimulieren, GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI), die die GDP gebundene Form stabilisieren (Raftopoulou und Hall, 2004).

GTPasen der Rho Familie (Cdc42, Rac1, RhoA) regulieren die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Zelladhäsionen während der Zellmigration, indem sie nachgeschaltete zelluläre Prozesse aktivieren und an unterschiedlichen Orten in der Zelle aktiv sind. Die GTPase Cdc42 fördert die Ausbildung von fingerförmigen Filopodien aus

wachsenden Aktinfilamenten in Bewegungsrichtung der Zelle und die Ausbildung neuer Zellkontakte mit der extrazellulären Matrix. Rac1 dagegen kontrolliert die Aktinpolymerisation in Lamellipodien, Membranausstülpungen am Leitsaum der Zelle und RhoA reguliert die Ausbildung von kontraktile Aktinstressfasern im Zellkörper (Raftopoulou und Hall, 2004).

Abhängig von einer PAR2 Aktivierung mit Trypsin oder SLIGKV-NH₂ konnte in unterschiedlichen Zelltypen eine G-Protein und RhoGTPase regulierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Form von Filopodien, Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten dokumentiert werden (Greenberg *et al.*, 2003; Klarenbach *et al.*, 2003; Sriwai *et al.*, 2013). G_{12/13} ist involviert in die RhoA vermittelte Ausbildung von Stressfasern in Darmkrebszellen (Suen *et al.*, 2014). Weiterhin wurde die PAR2 abhängige, G_i, c-Src-Tyrosinkinase regulierte Aktivierung von Rac1 in Brustkrebszellen gezeigt (Su *et al.*, 2009). Diese führt zu der gesteigerten Aktivierung von JNKinasen und der Phosphorylierung von Paxillin, einem Adapterprotein, das weitere Enzyme in Adhäsionspunkte rekrutiert und so Einfluss auf die Beweglichkeit von Zellen nimmt (Schaller, 2001). PAR2 stimulierte Signalwege regulieren weiterhin die Dephosphorylierung und Aktivierung des Aktin-destabilisierenden Proteins Cofilin in Brustkrebszellen durch die β -Arrestin abhängige Inhibition der LIM Kinase (LIMK) und die Aktivierung der Phosphatase Chronophin (CIN) (Zoudilova *et al.*, 2007; Zoudilova *et al.*, 2010). Eine Regulation der PAR2 stimulierten Migration von Tumorzellen wurde in metastatischen Brustkrebszellen abhängig von β -Arrestin und MAPKinase nachgewiesen (Ge *et al.*, 2003) und in Darmkrebszellen abhängig von PKC α und ERK1/2 demonstriert (Wu *et al.*, 2013). β -Arrestine rekrutieren als Adapter- oder Gerüstproteine C-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) oder Src Tyrosinkinasen und fördern die Aktivierung Mitogen aktivierter Protein Kinasen (MAPK/ERK) (Miller und Lefkowitz, 2001) unter anderem in Tumorzellen (Ge *et al.*, 2003). Außerdem wurde die PAR2 stimulierte Migration in weiteren Tumorzelllinien sowie in anderen Zelltypen, darunter vaskuläre (Marutsuka *et al.*, 2002) und pulmonal arterielle glatte Muskelzellen (Kwapiszewska *et al.*, 2012) sowie primären Leukozyten (Nichols *et al.*, 2012), gezeigt.

Die PAR2 regulierte Signalkaskade kann Ca²⁺ abhängig zur Aktivierung des nuklearen Faktors κ B (NF κ B) führen, der die Gentranskription verschiedener inflammatorischer Zytokine anstößt (Macfarlane *et al.*, 2005). Auch konnte gezeigt werden, dass die PAR2 aktivierte Ca²⁺ Freisetzung und die subsequente Aktivierung der PKC die Sekretion von immunregulatorischen Faktoren stimuliert (Suen *et al.*, 2014; Jairaman *et al.*, 2015). Eine PAR2 assoziierte Freisetzung von IL-8, IL-6, TNF- α und GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) durch Tumorzellen wurde nachgewiesen (Hjortoe *et al.*, 2004; Darmoul *et al.*, 2004). Auch in Patienten mit chronischem Asthma und überexprimiertem

PAR2 konnte β -Arrestin abhängig eine proinflammatorische Wirkung über die Freisetzung einer Reihe an Zytokinen (IL-4, IL-6, IL-13 und TNF- α) dokumentiert werden, die in der Migration und Infiltration von Leukozyten resultierte (Nichols *et al.*, 2012). Diese Daten unterstützen die potenzielle proinflammatorische Rolle von PAR2 in der TME. Tumorfördernde inflammatorische Zellen wie Makrophagen, Mastzellen und Neutrophile sekretieren Proteasen und matrixdegradierende Enzyme, wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs) oder Cathepsine, um durch Degradation und Remodelierung der extrazellulären Matrix das Tumorwachstum und die Invasion zu gewährleisten (Kessenbrock *et al.*, 2010).

Basierend auf einer Vielzahl von Studien zur PAR2 vermittelten Signalweiterleitung wird deutlich, dass PAR2 abhängige Signale sehr divers und vor allem auch abhängig vom Zelltyp sein können. Jedoch wird besonders deutlich, dass PAR2 eine zunehmende Wichtigkeit in der Onkologie einnimmt. PAR2 gewinnt somit zunehmende Aufmerksamkeit als potenzielles therapeutisches Zielprotein für die Entwicklung eines neuen zielgerichteten medizinischen Ansatzes in der Anti-Tumortherapie.

I.4 PAR Inhibitoren

Basierend auf der relevanten Rolle der erst in jüngerer Zeit entdeckten PARs in einer Vielzahl von Krankheiten und insbesondere basierend auf der tumorassoziierten Funktion von PAR2, hat das Interesse an der Entwicklung von PAR Inhibitoren als neue Therapeutika stark zugenommen. Trotz intensiver Forschung konnte jedoch bisher erst ein selektiver und potenter Antagonist für PAR1 identifiziert werden. Der auf dem Naturstoff Himbacin, einem Alkaloid aus der Magnolienart *Galbulimima*, basierende PAR1 Antagonist Vorapaxar inhibiert die PAR1 vermittelte Thrombozytenaggregation (Chackalamannil *et al.*, 2008). Vorapaxar ist seit 2014 von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen und kann zur Sekundärprophylaxe thromboembolischer Ereignisse bei Herzinfarktpatienten eingesetzt werden (Morrow *et al.*, 2012). Im Vergleich zu anderen Transmembranrezeptoren aus der Familie der GPCRs und aufgrund des besonderen Aktivierungsmechanismus hat sich die Entwicklung potenter PAR Inhibitoren als herausfordernde Aufgabe erwiesen. Kleine Moleküle müssen mit der hohen lokalen Konzentration des am Rezeptor gebundenen, durch die proteolytische Spaltung generierten Liganden, konkurrieren (Ramachandran *et al.*, 2012). Mit Ausnahme von PAR1 stehen keine Kristallstrukturen für ein Drug-Design zur Verfügung, da die Herstellung der Proteinkristalle schwierig ist. Die Kristallstruktur von PAR1 unter Bindung an Vorapaxar konnte ermittelt werden, sodass die Interaktion des Inhibitors mit Aminosäureresten verschiedener Transmembrandomänen (TM) sowie mit extrazellulären Domänen analysiert werden konnte (Zhang *et al.*, 2012).

Die potente und selektive Inhibition von PAR2 ist bisher trotz mehrerer Ansätze nicht gelungen. Alle bis dato identifizierten, potentiell PAR2 inhibierenden Moleküle wirken nur in hohen Konzentrationen, sind nicht selektiv oder vermitteln agonistische Eigenschaften und inhibieren PAR2 abhängige Signalwege nur unvollständig. Die systemische Applikation der niedermolekularen Verbindung ENMD-1068 brachte eine Reduktion der PAR2 induzierten Kniegelenksschwellung in Mäusen, wurde jedoch in millimolaren Konzentrationen angewendet und zeigte auch *in vitro* hohe IC₅₀ Werte (2.5-5 mM), was auf eine geringe Rezeptoraffinität schließen lässt (Kelso *et al.*, 2006). Die das Rezeptor aktivierende Peptid nachahmende Verbindung K14585 (IC₅₀ 5-10 µM) konnte lediglich Peptid-Agonist stimulierte Signale unterdrücken und scheiterte bei der Inhibition Trypsin-stimulierter Antworten, zusätzlich zeigte die Verbindung in höheren Konzentrationen agonistische Wirkungen (Kanke *et al.*, 2009; Goh *et al.*, 2009).

Mit dem PAR2 Antagonisten GB88 konnte eine vergleichbare Wirksamkeit bezüglich der Inhibition der durch drei strukturell und mechanistisch unterschiedlich wirksame PAR2 Agonisten induzierten intrazellulären Ca²⁺ Freisetzung erreicht werden (IC₅₀ 2 µM) (Suen *et al.*, 2012). *In vivo* reduzierte GB88 eine akute, PAR2 induzierte experimentelle Kolitis und minderte chronische Arthritis in Ratten, ausgelöst durch die Unterdrückung PAR2 abhängiger Entzündungssymptome (Lohman *et al.*, 2012a; Lohman *et al.*, 2012b). Jedoch wurde in nachfolgenden Studien deutlich, dass GB88 eine funktionelle Selektivität besitzt und verschiedene PAR2 induzierte Signalwege unterschiedlich beeinflusst sowie auch eine agonistische Wirkung zeigt (Suen *et al.*, 2014). Der kürzlich beschriebene Antagonist C391 (Abbildung I.5) basiert auf der Struktur des Peptid-mimetischen Agonisten 2-f-LIGRLO-NH₂ und schränkt die PAR2 abhängigen Ca²⁺ und MAPK Signale ein (IC₅₀ 1,3 µM; maximale Inhibition bei 3 µM), zeigte jedoch eine partielle agonistische Aktivität größer 10 µM (Boitano *et al.*, 2015).

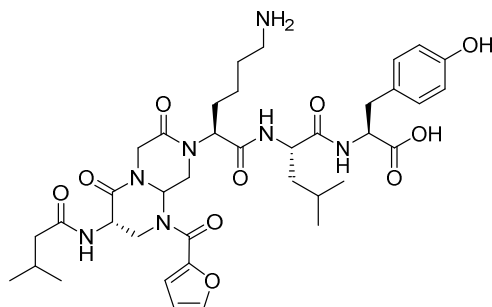


Abbildung I.5: Struktur des peptidischen Antagonisten C391⁶

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass trotz zahlreicher Ansätze zur Identifizierung eines PAR2 Inhibitors bis heute keine vielversprechende, potente und selektive Verbindung

⁶ aus Boitano *et al.*, 2015

identifiziert werden konnte. Die Identifizierung und Analyse neuer potenziell PAR2 inhibierender Substanzen ist notwendig, um PAR2 vermittelte pathophysiologische Wirkungen zu unterdrücken und die komplexe PAR2 abhängige Signalkaskade im physiologischen und pathophysiologischen Umfeld aufklären zu können.

I.5 Naturstoffklasse der Teleocidine

Kleine Naturstoffmoleküle sind die Hauptquelle von innovativen therapeutischen Medikamenten. Fünf Prozent aller neuen chemischen Ansätze in den Jahren 1981-2001 waren Naturstoffe und weitere 23 % von Naturstoffen abgeleitete Moleküle. Besonders Anti-Tumortherapien basieren auf Naturstoffmolekülen; bis zu 62 % aller neu zugelassenen chemischen therapeutischen Substanzen waren Naturstoffe (Newman *et al.*, 2003; Clardy und Walsh, 2004). Beispiele für naturstoffbasierte Zytostatika sind die auf Mikrotubuli wirkenden Agenzien Taxan (Paclitaxel) aus der Rinde von pazifischen Eiben, das Pflanzenalkaloid Vincristin, das DNA-Strangbrüche verursachende Bleomycin aus Streptomyceten oder Etoposid, ein Topoisomerase hemmendes pflanzliches Toxin (da Rocha, 2001; Altmann, 2001). Der Ozean bietet eine Fülle an Quellen für natürliche, potenziell therapeutisch wirksame Substanzen und marine Pharmazeutika gewinnen zunehmendes Interesse in der Entwicklung innovativer anti-Tumor Therapien. Wirksame zugelassene anti-Tumor Medikamente, die auf marinen Naturstoffen basieren, sind unter anderem das Cytidin Isomer Cytarabin (araC), das Alkaloid Trabectedin und das Mikrotubuli interferierende Eribulin (Bhatnagar und Kim, 2010).

Zur Substanzklasse der Teleocidine gehören eine Reihe verschiedener natürlich vorkommender Verbindungen aus unterschiedlichen Organismen. Aus *Streptomyces mediocidius* konnten die Teleocidine der B-Reihe (Teleocidin B1, B2, B3 und B4) sowie Teleocidin A1 und A2 isoliert werden (Abbildung I.6). Das Isomer Teleocidin A1 aus *Streptomyces* ist identisch mit Lyngbyatoxin A, einem toxischen Sekundärmetaboliten aus dem marinen filamentösen Cyanobakterium *Moorea producens*, früher *Lyngbya majuscula* genannt, der akute dermale Läsionen verursachen kann (Engene *et al.*, 2012; Osborne *et al.*, 2001). Die Lyngbyatoxine A, B und C zählen somit zur Klasse der Teleocidine, ebenso Olivoretine aus *Streptomyces olivoreticuli* und Blastmycetine aus *Streptomyces blastmyceticum*. Teleocidine sind Indolalkaloide, denen in der Vergangenheit hauptsächlich tumorpromovierende Eigenschaften zugeschrieben wurden (Fujiki *et al.*, 1981).

Tumorpromotoren sind nicht kanzerogene Chemikalien, die, wenn sie wiederholt nach Applikation einer kanzerogenen Substanz angewendet werden, das Wachstum des initialen Tumors verstärken (Nakagawa, 2012). Im Modell der zweistufigen Hautkarzinogenese, in dem der initiale Schritt zur Entwicklung eines Tumors mit einem chemischen Karzinogen

hervorgerufen wird, zeigten Teleocidine und Phorbolster wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) eine tumorstimulierende Wirkung auf das Wachstum von Hauttumoren in Mäusen (Imamoto *et al.*, 1993). PMA sowie Teleocidine wurden in Studien zur Untersuchung der Zelldifferenzierung von monozytischen Leukämiezellen eingesetzt (Huberman *et al.*, 1982; Schwende *et al.*, 1996).

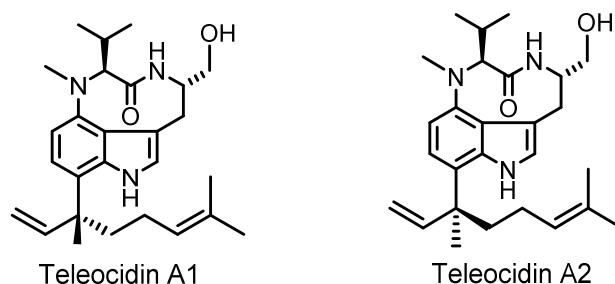


Abbildung I.6: Die Isomere Teleocidin A1/Lyngbyatoxin A und Teleocidin A2

Die tumorpromovierende Wirkung von Teleocidinen wurde mit der Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) Isoformen assoziiert (Imamoto *et al.*, 1993), wobei jedoch der Wirkmechanismus nicht eindeutig bekannt ist. Trotz des Unterschieds in ihren chemischen Strukturen binden und aktivieren Phorbolster sowie Teleocidine Serin/Threonin Kinasen aus der Familie der PKC. PKC Isoenzyme sind in drei Klassen unterteilt: konventionelle PKC (cPKC: Isoformen α , β , γ), neue PKC (nPKC: Isoformen δ , ϵ , η , θ) und atypische PKC (aPKC: Isoformen ζ , τ). cPKC werden durch die Bindung von DAG und Ca^{2+} , nPKC nur durch die Bindung von DAG aktiviert, dagegen werden aPKC weder von DAG noch von Ca^{2+} gebunden. C1A und C1B Domänen in den regulatorischen Regionen konventioneller und neuer PKC beinhalten die Bindestellen für DAG, das PKC transient aktiviert (Hurley *et al.*, 1997). Tumorpromotoren können DAG imitieren, jedoch führt dies zu einer verlängerten Aktivierung und Dephosphorylierung der PKC und ihrer subsequenten Degradation und Herabregulation (Hansra *et al.*, 1999). Verschiedene Studien verfolgten die Synthese neuer chemischer Analoga zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Tumorpromotion durch die Aktivierung von PKC und als potenzielle therapeutische Leitstrukturen für PKC aktivierende und/oder inhibierende Verbindungen (Nathel *et al.*, 2014; Nakagawa, 2012; Steinberg, 2008). Die chemische Synthese von Indolactam V, der Kernstruktur der natürlich vorkommenden Teleocidine, wurde beschrieben und die Untersuchung der Verbindungen hat gezeigt, dass Phorbolster und Indolactam V bei chronischer Stimulation von Zellen ein unterschiedliches Potential hinsichtlich der Herabregulation von PKC Isoformen haben (Meseguer *et al.*, 2000).

II. Ziele der Arbeit

PAR2 stellt ein pathophysiologisch relevantes Zielprotein dar, das vor allem in der Entwicklung maligner Tumorerkrankungen eine kritische Rolle zu spielen scheint. Trotz einer Reihe von Ansätzen ist es bisher jedoch noch nicht gelungen, wirksame und selektive PAR2 antagonistische Verbindungen zu entwickeln. Zur Identifizierung neuer PAR2 Antagonisten wurde eine Substanzbibliothek ausgewählter Naturstoffe in einem zellbasierten Screening evaluiert. Der Naturstoff Teleocidin A2 ging daraus als potenzielle PAR2 inhibierende Substanz hervor⁷.

Aus diesen Gründen sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Naturstoff Teleocidin A2 in zellbasierten Testsystemen, die unterschiedliche PAR2 relevante Signalwege abdecken (Detektion der G_q gekoppelten Ca²⁺ Mobilisierung, der Chemokinese und der Reorganisation der Aktinstruktur), auf seine PAR2 inhibitorische Wirkung evaluiert werden. Potenzielle, Zielprotein-unabhängige Wirkungen sollten anhand von Viabilitätsstudien und einem zu etablierenden PKC Aktivitäts-Assay untersucht werden. Außerdem wurde angestrebt, eine Substanzbibliothek Teleocidin A verwandter Verbindungen, isoliert aus *Streptomyces species*, in Bezug auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu charakterisieren. Ausgehend von den Erkenntnissen, die durch die Untersuchung der Naturstoff-Derivate gewonnen wurden, sollten im Rahmen eines Kooperationsprojektes neu synthetisierte, derivatisierte Indolactam V Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur-Aktivitäts-Beziehung analysiert werden.

Die Ziele der Arbeit gliedern sich in folgende Hauptpunkte:

Untersuchung der Inhibition PAR2 abhängiger Signalwege durch Teleocidin A2

- Nachweis der endogenen PAR2 stimulierten Ca²⁺ Mobilisierung in Tumor- und Primärzellen
- Charakterisierung des Naturstoffs Teleocidin A2 in Bezug auf die Inhibition der PAR2 stimulierten Ca²⁺ Mobilisierung
- Nachweis der PAR2 stimulierten Migration von Tumorzellen
- Charakterisierung des Naturstoffs Teleocidin A2 in Bezug auf die Inhibition der PAR2 stimulierten Migration
- Analyse des Einflusses von PAR2 und Teleocidin A2 auf das Aktinzytoskelett

⁷ Das Screening wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Nicole Teusch durchgeführt.

Untersuchung Zielprotein unabhängiger Wirkungen von Teleocidin A2

- Auswirkungen von Teleocidin A2 auf die Zellviabilität und die Proliferation
- Etablierung eines zellbasierten Testsystems zum Nachweis der Aktivierung von PKC durch Teleocidine
- Evaluierung der PAR2 stimulierten zellulären PKC Aktivierung
- Analyse der Teleocidin A2 abhängigen Aktivierung der PKC

Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung PAR2 inhibierender Teleocidine und chemisch neu synthetisierter Indolactam V Derivate

- Charakterisierung der Wirkung von Teleocidinen auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Ausschüttung und Evaluierung der Spezifität
- Charakterisierung der Wirkung von Indolactam V und Indolactam V Derivaten auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung und Evaluierung der Spezifität
- Analyse der Zielprotein unabhängigen Wirkungen von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten
- Identifizierung neuer, potenter, spezifischer PAR2 inhibierender Indolactam V Derivate mit reduzierter PKC Aktivierung

III. Material und Methoden

III.1 Material

III.1.1 Geräte

Tabelle III.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec VE-55, Systec GmbH (Wettenberg)
CO ₂ Inkubator	Heracell 150i, Thermo Scientific (Waltham, USA)
Inverses Fluoreszenzmikroskop	AxioVert A1 mit AxioCam MRm, Zeiss (Jena)
Inverses Mikroskop	IT400+, VWR (Darmstadt)
Kryokonservierungsbehälter	Cryo 1°C Cooler, VWR (Darmstadt)
Magnetrührer	MR Hei-Standard, Heidolph (Schwabach)
Multiwell-Reader	Infinite M1000 Pro, Infinite M200, Tecan (Männedorf, Schweiz)
pH-Meter	HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Photometer	VWR UV-1600PC (VWR, Darmstadt)
Pipetten	Eppendorf reference, Eppendorf (Hamburg) peqpette, peqlab (Erlangen)
Pipettierroboter	CyBi-Well, CyBio (Jena)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt)
Schüttler	ThermoMax Q4000, Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank	Mars Safety Class 2, Scanlaf (Hertfordshire, UK), Holten Lamin Air Typ S-2010 1.5, Holten
Waage	Kern ABJ 220-4M, KERN & Sohn GmbH (Balingen)
Wasserbad	VWB 12, (VWR Darmstadt)
Zentrifugen	Rotina 420, Rotina 420R (Hettich, Tuttlingen)
Flüssigstickstofftank	Arpege 140, Air Liquide (Paris)
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries (New York, USA)
Zählkammer	Neubauer-Kammer, Marienfeld, (VWR Darmstadt)
Zellcounter	Luna Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Annandale, USA)
Thermocycler	CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, USA)

III.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: AAT Bioquest, (Sunnyvale, USA), Biochrom (Berlin), Biomol (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich), Life Technologies (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt), Nunc (Biberich), Roth (Karlsruhe), Schott (Mainz), Sigma Aldrich (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA), VWR (Darmstadt).

III.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Methodenspezifische Lösungen oder Puffer werden an den entsprechenden Stellen erwähnt. Zur Sterilisation von Lösungen wurden diese mittels Systec VE-55 Autoklav (Systec GmbH, Wettenberg) autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar) oder im Fall von thermolabilen Substanzen

steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Die Einstellung des pH-Werts der hergestellten Lösungen erfolgte mit 1-5 M NaOH oder 25%iger HCl.

III.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Detektion der intrazellulären Calciummobilisierung sowie die Färbung lebender Zellen im Migrationsassay basierten auf folgenden Farbstoffen:

- Quest Fluo-8™, AM (20 x 50 µg) (Biomol, Hamburg)
- Track It™ Green (AAT Bioquest Sunnyvale, USA)

Die Färbung von Actinzytoskelett und Zellkern erfolgte mit den folgenden Farbstoffen:

- Alexa Fluor 546 konjugiertes Phalloidin (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- DAPI Dilactat (Life Technologies, Carlsbad, USA)

III.1.5 Biochemische und zellbasierte Testsysteme

Tabelle III.2: Verwendete Testsysteme

Test	Untersuchung	Firma
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Zellviabilität	Promega, Madison, USA
Oris™ Cell Migration Assay	Zellmigration	Platypus Technologies, Madison, USA
PathScan® Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA	Zelluläre PKC Aktivierung	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	RNA Isolation aus Zellen	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	cDNA Synthese	Promega, Madison, USA

III.1.6 Verwendete Agonisten und Inhibitoren

Tabelle III.3: Verwendete Agonisten

Agonist	Zielprotein	Bezug
SLIGKV-NH ₂	PAR2	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Trypsin	PAR2	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Tryptase	PAR2	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
FXa	PAR/Prothrombin	Abcam (Cambridge, UK)
TFLLR-NH ₂	PAR1	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Thrombin	PAR1	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
ATP	P2Y	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
EGF	EGFR	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Calpeptin	Rho Kinasen Aktivator	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
PMA Phorbolster	PKC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

Tabelle III.4: Kommerziell erhältliche verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Zielprotein	Bezug
EHop-016	Rac1 GTPase	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Gö6983	Proteinkinase C	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Staurosporin	Proteinkinasen, Apoptoseinduktion	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Vorapaxar	PAR1	Axon Medchem (Groningen)
Y27632	ROCK1/2, RhoA Effektorkinase	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

III.1.7 Verwendete niedermolekulare Naturstoffe und synthetisierte Verbindungen

Tabelle III.5: Untersuchte Teleocidin Naturstoffderivate

ID	Naturstoff	Summenformel	Masse (g/mol)	Firma
IMD1	Teleocidin B4	C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂	451,64	zur Verfügung gestellt von der Firma IMD Natural Solutions (Dortmund)
IMD2	Olivoretin C	C ₂₉ H ₄₃ N ₃ O ₂	465,67	
IMD3	O-Demethyl-olivoretin C	C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂	451,64	
IMD4	7-Octyl-indolactam V	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₂	413,60	
IMD5	Olivoretin	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₂	467,69	
IMD6	Olivoretin	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₂	467,69	
IMD7	Teleocidin B	C ₂₈ H ₄₃ N ₃ O ₂	453,66	
IMD8	8-oxo-Teleocidin B	C ₂₈ H ₃₉ N ₃ O ₃	465,63	
IMD9	Teleocidin A2	C ₂₇ H ₃₉ N ₃ O ₂	437,62	
IMD10	Teleocidin B (nicht-definiertes Epimer)	C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂	451,64	

Tabelle III.6: Untersuchte Indolactam V Derivate (IL-V Derivate)

ID		Summenformel	Masse (g/mol)	Synthese
JES313	Indolactam V	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₂	301,38	Arbeitskreis Prof. Dr. Hans- Günther Schmalz, Doktorand Jan Erik Stein, Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln
JES303	Derivat	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	441,54	
JES305	Derivat	C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₄ S	455,57	
JES307	Derivat	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₂	287,36	
JES339	Indolactam V	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₂	301,38	
JES354	Derivat	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₂	315,41	
JES342	Derivat	C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₂	391,51	
JES345	Derivat	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄	435,52	
JES375	Derivat	C ₃₃ H ₄₁ N ₃ O ₂ Si	539,78	
JES388	Derivat	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	343,42	
JES401	Derivat	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄	359,42	
JES403	Derivat	C ₃₁ H ₃₃ F ₂ N ₃ O ₂	517,62	
JES405	Derivat	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂	409,51	
JES406	Derivat	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₃	371,48	
JES411	Derivat	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂	409,50	
JES412	Derivat	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₃	421,53	
JES414	Derivat	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂	409,50	

III.1.8 Verwendete Software

Tabelle III.7: Verwendete Software

Software	Verwendung	Firma
ChemBioDraw Ultra 14.0	Zeichnung chemischer Molekülstrukturen	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts
GraphPad Prism v. 5.04	Ermittlung sigmoidaler Konzentrations-Wirkungskurven mittels nichtlinearer Regression; Berechnung der mittleren effektiven Konzentration EC ₅₀ und der mittleren inhibitorischen Konzentration IC ₅₀ ; Statistische Datenanalyse	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	Quantifizierung von Zellen im Migrationsassay	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2014
OriginPro 8G	Erstellung des 3D Punktediagramms	OriginLab, Northampton, Massachusetts
ZEN lite 2011	Bearbeitung der Aufnahmen Fluoreszenzfarbstoffmarkierter Zellen	Carl Zeiss, Jena

III.1.9 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte anhand einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) und dem Tukey's Post-hoc Test für den Vergleich aller Gruppen untereinander bzw. dem Dunnett's Post-hoc Test für den Vergleich der Gruppen mit einer Kontrolle Für den Vergleich der Mittelwerte von Messdaten zweier Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test verwendet. Zur Beschreibung der statistischen Signifikanz wurde für alle Analysen ein p-Wert < 0,05 gewählt.

III.2 Methoden

III.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien und Medien

Zur Untersuchung der endogenen PAR2 regulierten, intrazellulären Signalkaskade und der Charakterisierung des Effekts von Teleocidin A2 auf diverse zelluläre Signale wurden die folgenden Zelllinien und Zelltypen eingesetzt:

Tabelle III.8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Bezug	Literatur
MDA-MB 231	Brustadenokarzinom, pleurale Effusion	ATCC-Nr. HTB-26 TM ECACC (Salisbury, UK)	Cailleau <i>et al.</i> , 1974
A549	Lungenkarzinom	ATCC-Nr. ACC-107 DSMZ (Braunschweig)	Giard <i>et al.</i> , 1973
HUVEC human umbilical vein endothelial cells	Endothelzellen aus der Nabelvene	Lonza (Basel, Schweiz)	
HMEC human mammary epithelial cells	Brustepithelzellen	Lonza (Basel, Schweiz)	
hPASC human pulmonary artery smooth muscle cells	glatte Muskelzellen aus der pulmonalen Arterie	Lonza (Basel, Schweiz)	
mPASC murine pulmonary artery smooth muscle cells - Wildtyp (WT) - PAR2 ^{-/-}	glatte Muskelzellen isoliert aus der pulmonalen Arterie von WT und PAR2 ^{-/-} Mäusen	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stephan Rosenkranz, Herzzentrum der Universität zu Köln	Freyhaus <i>et al.</i> , 2015

MDA-MB 231, A549 und mPASC wurden unter Zugabe von 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, USA) kultiviert. Die Kultivierung von MDA-MB 231 erfolgte in Leibovitz's L15 Medium (Biochrom, Berlin), supplementiert mit 15 % fötalem Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Carlsbad, USA) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin). A549 und mPASC wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies, Carlsbad, USA), supplementiert mit 10 % bzw. mit 20 % FCS kultiviert. Die Kultivierung von HUVEC, HMEC und hPASC erfolgte nach den Angaben von Lonza (Basel, Schweiz) in endothelial basal medium (EBM), Mammary epithelial basal medium (MEBM) beziehungsweise smooth muscle basal medium (SmBM) unter Zugabe von supplementären Faktoren. Die Zellen wurden bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre, im Fall von MDA-MB 231 ohne Zufuhr von CO₂ kultiviert.

Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche oder -schale erfolgte mittels Enzym-freiem „Cell Dissociation Buffer“ (Life Technologies), um die PAR2 Rezeptoraktivierung mit Trypsin zu vermeiden. Die Subkultivierung der Primärzellen erfolgte mit Reagenzien laut Herstellerangaben (Lonza). Die Zellzählung wurde mittels Luna Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Annandale, USA) durchgeführt.

III.2.2 Intrazelluläre Calciummobilisierung

Zur Untersuchung der pharmakologischen Wirkung verschiedener Agonisten sowie Antagonisten auf die GPCR, bzw. PAR abhängige Signaltransduktion in verschiedenen Zelllinien, wurde die G_q Protein regulierte, intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Calciumindikators (Quest Fluo-8TM AM, AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) gemessen. Fluo-8 zeichnet sich durch gesteigerte Signalintensität und zellverträglichere Inkubationsbedingungen aus (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA)⁸. Die Kopplung von Fluo-8 an einen Acetoxymethylester (AM-Ester) ermöglicht die passive Aufnahme des Moleküls in die Zelle. Dort wird der Ester mit Hilfe von intrazellulären Esterasen abgespalten und so der Wiederaustritt des Indikators verhindert. Fluoreszierende Moleküle sind gekennzeichnet durch die Emission von Licht, welches beim Übergang von einem angeregten Elektronenzustand in einen niedrigeren Grundzustand frei wird. Das Licht, welches zunächst von dem Fluorophor absorbiert wird, um die Elektronen in einen angeregten Zustand zu versetzen, besitzt eine höhere Energie sowie eine kürzere Wellenlänge als das im Anschluss emittierte Licht längerer Wellenlänge. Die Bindung von Ca^{2+} an den Fluorophor Fluo-8 steigert die Lichtemission nach Anregung um ein Vielfaches und resultiert in einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität.

MDA-MB 231, A549 oder mPASC MC wurden 20-24 h vor Zugabe des Indikators in einer empirisch ermittelten Zell-spezifischen Zellzahl (Tabelle III.9) in 100 μ l Zellkulturhungermedium (enthält 2 % FCS) in eine schwarze 96-Mikrotiterplatte mit Hilfe des CyBi-Well Pipettierroboters ausgesät. Die Primärzellen HUVEC, HMEC und hPASC MC wurden in dem entsprechenden Vollmedium ausgesät.

Tabelle III.9: Zelllinien abhängige Bedingungen im Ca^{2+} Mobilisationsassay

Zelllinie	Zellzahl	Konzentration Fluo-8 AM	Inkubation mit Fluo-8 AM
MDA-MB 231	2×10^4 Zellen/Well	4 μ M	30 min, 37°C und 30 min RT
A549	2×10^4 Zellen/Well	5 μ M	30 min, 37°C und 30 min RT
HUVEC	$1,5 \times 10^4$ Zellen/Well	4 μ M	30 min, 37°C und 30 min RT
HMEC	$1,5 \times 10^4$ Zellen/Well	4 μ M	30 min, 37°C
hPASC MC	1×10^4 Zellen/Well	4 μ M	30 min, 37°C und 30 min RT
mPASC MC	5×10^3 Zellen/Well	5 μ M	30 min, 37°C und 30 min RT

Das Kulturmedium wurde mittels Achtkanalpipette entfernt, Primärzellen einmal mit HHBS (Hank's Salzlösung mit 20mM HEPES) Puffer gewaschen und die Zellen anschließend mit Fluo-8 AM in HHBS, 1% FCS inkubiert. Die optimierten Inkubationsbedingungen sind in Tabelle III.9 dargestellt. Die Indikatorlösung wurde anschließend entfernt und durch HHBS mit 2 mM Probenecid ersetzt. Probenecid verhindert den Austritt des Indikators über Zellmembran integrierte Transporter.

⁸ <http://aatbio.com/protocol/A3300d1.pdf> (03.10.2015)

Zur Untersuchung verschiedener PAR2, PAR1 und P2Y Agonisten und Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) wurden 100 μ l HHBS Puffer mit 2 mM Probenecid hinzugefügt und die Zellen weitere 10 min bei RT inkubiert, um den vollständigen Eintritt restlicher Indikatormoleküle in die Zelle zu ermöglichen. Die konzentrationsabhängige Aktivierung der Ca^{2+} Freisetzung wurde anhand einer dreifach konzentriert angesetzten Verdünnungsreihe mit 6-8 Agonistkonzentrationen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. SLIGKV-NH₂, TFLLR-NH₂ und ATP wurden in H₂O, Trypsin, Thrombin, FXa und Tryptase in HHBS verdünnt. Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung einer Substanz auf die Agonisten induzierte Ca^{2+} Freisetzung wurden nach Entnahme der Indikatorlösung 100 μ l HHBS Puffer mit 2 mM Probenecid für die Kontrollen und 90 μ l für die Verdünnungsreihe des Inhibitors zu den Zellen hinzugegeben. In einer Vorlageplatte wurde eine 10-fach konzentrierte Verdünnungsreihe mit 6-8 Konzentrationen vorgelegt, von denen anschließend je 10 μ l in Dreifachbestimmung in die Zellplatte transferiert wurden. Die Zellen wurden 10 min mit den Substanzen inkubiert und anschließend mit 50 μ l Agonist in der entsprechenden EC_{50} stimuliert. Als Negativkontrollen dienten H₂O oder HHBS, als Positivkontrolle 10 μ M Calciumionophor A23187 (Sigma Aldrich, Taufkirchen). Das Fluoreszenzsignal in relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU) wurde mittels Well-Kinetik Messung (Kinetik-Zyklen: 80; Intervallzeit: 1 s) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm im Tecan Infinite M1000Pro Mikrotiterplattenreader gemessen. Die Injektion der Probe (50 μ l) erfolgte bei Zyklus 16. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Basisfluoreszenz (Zyklus 1-16) von allen RFU Werten subtrahiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzmaximum jeder Well-Kinetik bestimmt (RFU_{max}). Die prozentuale Ca^{2+} Mobilisierung wurde anhand folgender Formel berechnet (NK: Negativkontrolle):

$$\% Ca^{2+} \text{ Mobilisierung} = \frac{RFU_{max} - RFU_{max}(NK)}{RFU_{max}(A23187/Agonist) - RFU_{max}(NK)} \times 100$$

III.2.3 cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Methode der Reversen Transkription mit folgender Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Quantifizierung einer spezifischen mRNA. Zur Analyse der PAR2 Genexpression in metastatischen Brustkrebszellen und primären humanen Brustepithelzellen wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend der cDNA Gehalt der Probe mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt.

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden 70-80 % konfluente MDA-MB 231 oder HMEC Zellen geerntet und $3-4 \times 10^6$ Zellen in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen sowie die Reinigung der Gesamt-RNA erfolgten mittels RNeasy Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. Die cDNA Synthese wurde mit 1 µg isolierter Gesamt-RNA, 0,5 µg Oligo(dT)₁₅ Primern und AMV Reverser Transkriptase (15 U) unter Verwendung des Reverse Transcription System nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Synthese der cDNA erfolgte für 15 min bei 42°C, 5 min bei 95°C und 5 min auf Eis. Anschließend wurde ein Verdau der nicht translatierten RNA mit 0,5 µl RNase H (2,5 U) durchgeführt (20 min, 37°C). Zur Quantifizierung der gewonnenen cDNA mittels qPCR wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit verwendet. Der fluoreszierende DNA Farbstoff SYBR Green inkorporiert in doppelsträngige DNA während der Amplifikation. Am Ende eines jeweiligen Elongationsschritt innerhalb eines jeden PCR Zyklus erfolgt die Messung der Fluoreszenz zur Bestimmung der DNA Menge. Das Fluoreszenzsignal ist über eine weite Strecke von PCR Zyklen proportional zur DNA Konzentration. Je größer die Menge an Ausgangstemplate zu Beginn der PCR Reaktion, desto niedriger der Schwellenwert (Ct), der Wert, an dem zuerst Fluoreszenzsignale oberhalb des Hintergrunds oder der gesetzten Grundlinie gemessen wurde. Die Gen-spezifischen, synthetischen Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation der cDNA wurden von eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen (Tabelle III.10).

Tabelle III.10: Verwendete Gen spezifische Primer in der qPCR

Gen spezifischer Primer	Sequenz 5' - 3'	Tm °C
GAPDH-for	TGCACCACCAACTGCTTAGC	60,6
GAPDH-rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	59,7
HPRT1-for	TGACACTGGCAAAACAATGCA	59,5
HPRT1-rev	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	61,1
PAR2-for	GGCAACATGTACTGTTCCATTCTC	61,0
PAR2-rev	GGTTCACGATGACCCAATACCT	60,3

Vor der eigentlichen Expressionsanalyse wurden die Primereffizienzen durch Testung bei verschiedenen cDNA Mengen bestimmt und optimiert. Zur Bestimmung der relativen cDNA Menge von PAR2 (Gen: *F2RL1*) wurden die Expressionsdaten gegen die Haushaltsgene (HHG) *GAPDH* und *HRPT1* mit folgender Formel normalisiert: $\Delta Ct = Ct (PAR2) - Ct (HHG)$; mit Ct: Schwellenwert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit 30 ng cDNA, QuantiTect SYBR Green Master Mix und 0,75 µM forward/reverse Primer [95°C, 15 min; 44x (94°C, 15 s; 55°C, 25 s; 72°C, 10 s) 95°C, 10 s; 64°C, 1 min; Schmelzkurvenbestimmung 64-95°C, Schrittweite 0,5°C] im CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad).

III.2.4 Zellviabilität

Die Viabilität von MDA-MB 231 Zellen nach Behandlung mit potenziell zellwachstumsfördernden oder zytotoxischen Substanzen wurde mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) untersucht. Der Viabilitätstest basiert auf der Messung der metabolischen Aktivität durch Detektion des ATP Gehalts in lebenden Zellen über eine Luciferase Reaktion. In Anwesenheit von ATP und Ultra-Glo Luciferase wird Luciferin in Oxyluciferin umgewandelt. Das dabei entstehende Lichtsignal kann anschließend durch eine Lumineszenzmessung ausgewertet werden. Die Aussaat erfolgte mit 70-80% konfluenten MDA-MB 231 oder HMEC Zellen 24 h vor Zugabe der Substanzen in eine weiße 96- oder 384-Well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden (Tabelle III.11). Die Zellen wurden 24-48 h bei 37°C kultiviert. Die Aussaat in 384er Mikrotiterplatten sowie die Zugabe der Substanzen wurde mittels CyBi-Well Pipettierroboter durchgeführt.

Tabelle III.11: Anzahl der ausgesäten Zellen in Mikrotiterplatten

Zelllinie	Zellzahl bei 96-Well Format	Zellzahl bei 384-Well Format
MDA-MB 231	$1,5 \times 10^4$ Zellen/Well	5×10^3 Zellen/Well
HMEC		$2,5 \times 10^3$ Zellen/Well

In einer Vorlageplatte wurden die zu untersuchenden Agonisten und Antagonisten in Zellkulturmedium vorgelegt und anschließend zu definierten Zeitpunkten jeweils 5 µl in Dreifachbestimmung zu den Zellen pipettiert. Als Zytotoxizitätskontrolle dienten 2 µM Staurosporin (Sigma Aldrich), als Lösemittelkontrolle 0,1-0,5% DMSO in Kulturmedium und als Negativkontrolle zellfreies Medium. Die untersuchten Stimulatoren und Inhibitoren sind im Ergebnisteil der Arbeit in den jeweiligen Legenden der Abbildungen entsprechend vermerkt. Die Zellen wurden 24 oder 48 h bei 37°C ohne Zufuhr von CO₂ inkubiert. Vor Zugabe des CellTiter-Glo Detektionsreagenz wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur (RT) äquilibriert. Das Reagenz wurde hinzugefügt und die Platte 15 min bei RT inkubiert. Die Auslesung der Lumineszenz erfolgte mittels Tecan Infinite M1000 Pro Mikrotiterplattenreader. Anhand des Viabilitätstests wurde der Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Zellen untersucht, um toxische Effekte durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden (Daten nicht gezeigt). Eine DMSO Konzentration von maximal 0,5% wurde dahingehend als Endkonzentration für alle Experimente der Arbeit gewählt.

III.2.5 PAR2 (human) Agonist Radioliganden Bindungstest

Die Studien zur Bindung von Teleocidin A2 an den humanen PAR2 Rezeptor wurden bei der Firma CEREP (Celle l'Evescault, Frankreich) in Auftrag gegeben. Die Bindung von Teleocidin A2 (0,5 µM, 5 µM) an den Rezeptor wurde anhand eines radioaktiven

Bindungstest mit radioaktivmarkiertem PAR2 Peptid [³H]2-f-LIGRL-NH₂ analysiert (Kanke *et al.*, 2005).

III.2.6 Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA

Die Untersuchung der Aktivierung zellulärer Proteinkinase C erfolgte auf Basis des PathScan® Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Der ELISA detektiert die spezifische endogene Phosphorylierung von MARCKS an Ser 152 und Ser 156 durch die PKC (Thelen *et al.*, 1991; Heemskerk *et al.*, 1993). Das in Zelllysaten vorhandene Gesamt MARCKS Protein wird in einer beschichteten Mikrotiterplatte an einen MARCKS Antikörper gebunden. Anschließend wird das phosphorylierte Protein durch biotinylierten phospho-MARCKS Antikörper, Meerrettich Peroxidase (HRP, Horseradish peroxidase) gekoppeltes Streptavidin und HRP Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) kolorimetrisch detektiert. Die Absorption ist dabei proportional zur Menge des phosphorylierten MARCKS Protein. MDA-MB 231 Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,8 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Schalen (Greiner CELLSTAR®) in FCS freiem Leibovitz's L15 Medium, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach Behandlung der 70-80 % konfluenten Zellen mit den entsprechenden Substanzen, wurden Zelllysate basierend auf dem Protokoll des Herstellers generiert und der zugehörige Lysepuffer mit 1 mM Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich) ergänzt. Die Lysatprotein-konzentration wurde anhand des Bradford Protein Assay bestimmt (Bradford, 1976). Der Sandwich ELISA wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt und die Absorption wurde mittels Tecan Infinite M200 Pro Mikrotiterplattenreader bestimmt⁹.

III.2.7 Zellmigrationsassay

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit von MDA-MB 231 als Antwort auf die Stimulation von PAR2 und zur Charakterisierung des Effekts von Teleocidin A2 und anderer Inhibitoren auf die PAR2 stimulierte Migration, wurde der Migrationstest Oris™ Cell Migration Assay (Platypus Technologies, Madison, USA) herangezogen. Dieser beruht auf einem Wundheilungsassay, der die Chemokinese der Zellen abbildet (Liang *et al.*, 2007). Durch den Einsatz von runden, in der Mitte der Wells platzierten Zellaussaatstoppern wurde eine konsistente Detektionszone geschaffen. Zellen mit erhöhter Chemokinese wandern in diese zellfreie Zone ein und können unter dem Mikroskop detektiert werden.

⁹ Die Etablierung des Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA wurde von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit „Pharmacological Inhibition of Protease-Activated Receptor 2: A Novel Anti-Metastatic Therapeutic Approach in Breast Cancer“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln durchgeführt.

Die Aussaat von MDA-MB 231 erfolgte bei einer Zelldichte von 70-80 % 24 h vor Zugabe der verschiedenen Substanzen in einer empirisch ermittelten Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen/well in eine schwarze Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden und Zellaussaatstoppfern. Diese wurden am folgenden Tag entfernt, sodass eine definierte, zellfreie, kreisrunde Fläche vorlag, in die die Zellen nach Stimulation migrieren konnten. Zur Entfernung nicht-adhärenter oder abgestorbener Zellen wurden die Wells einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend frisches Medium zu den Zellen gegeben. In einer weiteren Mikrotiterplatte wurden die zu untersuchenden Agonisten und Antagonisten 5-fach konzentriert in Zellkulturmedium vorgelegt und anschließend zu definierten Zeitpunkten jeweils 5 μ l in Dreifachbestimmung zu den Zellen pipettiert. Die untersuchten Stimulatoren und Inhibitoren sind im Ergebnisteil der Arbeit in den jeweiligen Legenden der Abbildungen entsprechend vermerkt. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C ohne Zufuhr von CO₂ inkubiert. Nach Entnahme des Kulturmediums erfolgte die Färbung der lebenden Zellen mit Hilfe des Zellfarbstoffs Track It™ Green (AAT Bioquest (Sunnyvale, USA) durch Zugabe von 100 μ l/well 1:2000 in HHBS verdünnter Track It™ Green Stocklösung für 15 min. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioVert A1, dem Filter für grün fluoreszierendes Protein (GFP), sowie der AxioCam MRm durchgeführt. Die Quantifizierung der Zellzahl innerhalb der Detektionszone erfolgte mit einer Partikelanalyse in ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014) unter Verwendung des folgenden Macros: „Migration_AnalyzeParticles_smalloval_SSt“:

```
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
//setTool("oval");
makeOval(324, 174, 742, 751);
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity pixel display exclude clear include add");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
```

III.2.8 Färbung des Aktinzytoskeletts und des Zellkerns

Im Zellmigrationsassay konnte bei der Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop eine Veränderung der Zellmorphologie nach Behandlung von MDA-MB 231 mit Teleocidin A2 festgestellt werden. Ausgehend von diesen Beobachtungen diente die Färbung des Aktinzytoskeletts humaner Brustkrebszellen der Visualisierung einer Umordnung der Aktinstruktur induziert durch PAR2 Agonisten sowie durch Teleocidine. Zur weiteren Untersuchung der PAR2 und Teleocidin gekoppelten Signalkaskade in der Zelle wurden die Inhibitoren Gö6983, EHop-016 und Y27632 (Sigma Aldrich) verwendet. Gö6983 ist ein

kompetitiver Inhibitor der Proteinkinase C, der im aktiven Zentrum des Enzyms bindet (Gould *et al.*, 2011). Y27632 inhibiert selektiv p160ROCK, eine Downstream Effektor kinase der kleinen GTPase RhoA und unterdrückt so die durch RhoA induzierte Ausbildung von Stressfasern in Zellkulturen (Ishizaki *et al.*, 2000). EHop-016 inhibiert Rac1, eine weitere GTPase aus der Familie der Rho GTPasen (Montalvo-Ortiz *et al.*, 2012).

Die Zellaussaat erfolgte mittels CyBi-Well Pipettierroboter bei einer Konfluenz von 70-80 % in einer Zelldichte von 5×10^3 Zellen je Well 24 h vor Zugabe der Substanzen in Leibovitz's L15 Medium in eine schwarze Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden. Das Medium wurde mittels Achtkanalpipette entfernt und je nach Bedingung 100, 90 oder 80 μ l frisches Medium zu den Zellen gegeben. In einer Vorlageplatte wurden die zu untersuchenden Agonisten oder Antagonisten 10-fach konzentriert vorgelegt und anschließend zu definierten Zeitpunkten jeweils 10 μ l in Doppelbestimmung zu den Zellen pipettiert. Die untersuchten Stimulatoren und Inhibitoren sind im Ergebnisteil der Arbeit in den jeweiligen Legenden der Abbildungen entsprechend vermerkt.

Nach Stimulation der Zellen, Entfernung des Mediums und Waschen der Zellen mit 100 μ l vorgewärmtem PBS, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 μ l Roti-Histofix 4% (Carl Roth, Karlsruhe) für 20 min. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden unter moderaten Schwenkbewegungen bei RT durchgeführt. Nach Inkubation der fixierten Zellen mit PBS, 0,1% Triton-X (5 min) erfolgte ein Waschschrte mit PBS, 1% BSA und die Zugabe von 100 nM Alexa Fluor 546 Phalloidin (Ex/Em: 556/570 nm, Life Technologies) in PBS, 1% BSA, 25 min in Dunkelheit. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS, diente DAPI Dilactat (3 μ M) (Ex/Em: 358/461 nm, Life Technologies) in PBS der Färbung des Zellkerns. Die Visualisierung und Dokumentation der Aktinstrukturen sowie des Zellkerns erfolgte mikroskopisch mit 20- oder 40 facher Vergrößerung in einem Zweikanal-Fluoreszenz Experiment mittels Mikroskopie-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss). Die Bearbeitung der Bilddateien wurde mit Hilfe der Software ZEN lite 2011 durchgeführt.

IV. Ergebnisse

IV.1 Stimulation der endogenen Ca^{2+} Mobilisierung

Die Aktivierung von GPCRs, gekoppelt an das heterotrimere G Protein G_q , löst intrazellulär die Hydrolyse von PIP_2 durch die PLC aus, wodurch es zur Induktion des $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ Signalwegs kommt. Die Ausschüttung des Botenstoffs Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (ER, SR) nach Bindung von IP_3 an IP_3 Rezeptoren wurde mit dem ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-8 AM detektiert, der Ca^{2+} Ionen chelatiert. Der Indikatorfarbstoff kann durch sichtbares Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden und ist ohne eine Bindung an Ca^{2+} nicht fluoreszierend. Bei Ca^{2+} Bindung kommt es zu einer starken Fluoreszenzemission (Paredes *et al.*, 2008). So kann die Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} Mobilisierung als Folge der Rezeptoraktivierung in lebenden Zellen gemessen werden. Zur Charakterisierung der Rezeptoraktivierung wurden die verschiedenen Zellen mit PAR2, PAR1 oder P2Y Agonisten stimuliert und die Konzentration der maximal erreichten Ca^{2+} Freisetzung gegen die Konzentration des Agonisten aufgetragen, um die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) mittels nichtlinearer Regression und sigmoidaler Konzentrations-Wirkungskurve zu ermitteln.

IV.1.1 Stimulation der Ca^{2+} Mobilisierung in glatten Muskelzellen

Aus Studien ging hervor, dass PAR2 assoziierte Signalwege zur vaskulären Remodelierung und Verdickung der Gefäßmuskulatur bei Lungenhochdruck beitragen (Kwapiszewska *et al.*, 2012; Delbeck *et al.*, 2011). Murine glatte Muskelzellen (mPASMCM WT und $\text{PAR2}^{-/-}$) werden zur Aufklärung pathophysiologischer Merkmale in der pulmonalen Hypertonie eingesetzt. Zur Charakterisierung der Rezeptoraktivierung von PAR2 und PAR1 in murinen WT und $\text{PAR2}^{-/-}$ PASMCM wurde die intrazelluläre Ca^{2+} Ausschüttung nach Beladung der Zellen mit Ca^{2+} Indikator im direkten Vergleich untersucht (Abbildung IV.1).

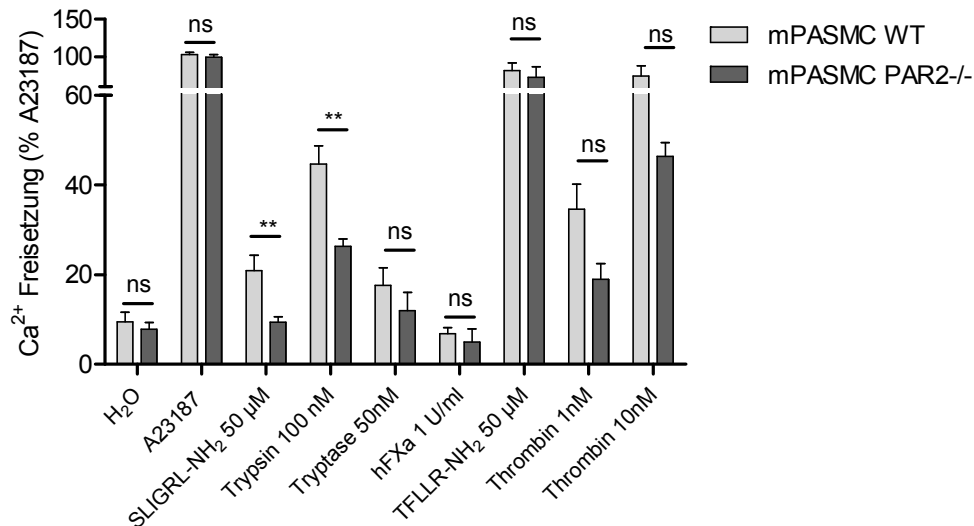


Abbildung IV.1: PAR1 und PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung in mPASC WT und PAR2^{-/-} Zellen

Die Zellen wurden mit Fluo-8 Ca²⁺ Indikator beladen und anschließend mit murinem PAR2 stimulierenden Peptid SLIGRL-NH₂ (50 µM), Trypsin (100 nM), Tryptase (50 nM), hFXa (1 U/ml) sowie PAR1 stimulierendem Peptid TFLLR-NH₂ (50 µM) und Thrombin (1,10 nM) stimuliert. H₂O und Ca²⁺ Ionophor A23187 (10 µM) dienten als Negativ- und Positivkontrolle für minimale und maximale Fluoreszenz. Die Ergebnisse zeigen maximale RFU-Werte der Ca²⁺ Kinetik in Prozent der A23187 induzierten Ca²⁺ Freisetzung. Dargestellt sind MW ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. Zur statistischen Analyse erfolgte ein ungepaarter Student's t-Test. ns, nicht statistisch signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01.

Die Ca²⁺ Ausschüttung durch das murine PAR2 stimulierende Peptid SLIGRL-NH₂ (50 µM) betrug in WT Zellen 20,9 ± 3,3 % und in PAR2^{-/-} Zellen 9,4 ± 1,2 %, die Ausschüttung durch Trypsin (100 nM) in WT 44,6 ± 4,0 % und in PAR2^{-/-} Zellen 26,4 ± 1,6 %. Die PAR2 abhängige Freisetzung von Ca²⁺ war somit in PAR2^{-/-} Zellen deutlich reduziert, was darauf hindeutet, dass SLIGRL-NH₂ und Trypsin PAR2 spezifisch aktivieren. Die Stimulation mit 50 nM Tryptase führte zu einer moderaten Ca²⁺ Mobilisierung in WT Zellen und einer reduzierten Mobilisierung in PAR2^{-/-} Zellen. Die Verwendung von 1 U/ml FXa als Stimulanz für die Ca²⁺ Ausschüttung zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Zellen, die Testung geringerer und höherer Konzentrationen FXa brachte keine Antwort der Zellen hervor (Daten nicht gezeigt). Die PAR1 abhängige Ausschüttung durch TFLLR-NH₂ (50 µM) lag in WT Zellen bei 81,5 ± 10,1 % und in PAR2^{-/-} Zellen bei 72,5 ± 14,0 %. Die Thrombin (10 nM) ausgelöste Freisetzung über PAR1 war in PAR2^{-/-} Zellen im Vergleich zu WT Zellen nicht signifikant verringert; 74,3 ± 13,9 % Ausschüttung in WT, 46,3 ± 3,0 % Ausschüttung in PAR2^{-/-} Zellen.

Humane primäre pulmonal arterielle glatte Muskelzellen (hPASC) exprimieren PAR2 und proliferieren abhängig von einem PAR2 und ERK1/2 regulierten Signalweg (Kwapiszewska *et al.*, 2012). PAR2 und PAR1 wurden mit SLIGKV-NH₂, Trypsin und FXa sowie Thrombin stimuliert und die Zellantwort in Form der Ca²⁺ Ausschüttung gemessen. Abbildung IV.2

stellt die Kinetik der Ca^{2+} Mobilisierung in hPASMC nach Stimulation mit 50 μM SLIGKV-NH₂, 100 nM Trypsin, 1 U/ml FXa und 10 nM Thrombin dar.

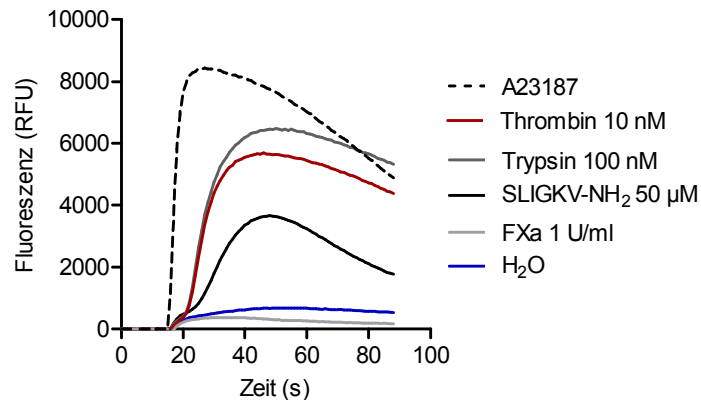


Abbildung IV.2: Stimulation der Ca^{2+} Mobilisierung in humanen PASMC

Kinetik der Ca^{2+} Mobilisierung nach Stimulation von hPASMC mit 10 nM Thrombin, 100 nM Trypsin, 50 μM SLIGKV-NH₂ und 1 U/ml FXa. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladen. Dargestellt sind MW aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten.

Die Proteasen Trypsin und Thrombin verursachten einen starken Einstrom von Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol der Zellen, wobei der PAR2 abhängige Ca^{2+} Einstrom auch durch SLIGKV-NH₂ Stimulation bestätigt werden konnte. Aktiver, löslicher FXa hatte auch in hPASMC keinen signifikanten Effekt auf die Ca^{2+} Mobilisierung.

Zusammenfassend wird aus den Untersuchungen zur PAR vermittelten Ca^{2+} Ausschüttung in murinen und humanen pulmonal arteriellen glatten Muskelzellen deutlich, dass Trypsin und Thrombin PAR2 und PAR1 deutlich stimulierten, die Mastzell-Serinprotease Tryptase jedoch nur eine schwache Aktivierung hervorrief und eine deutlich geringere Wirkung im Vergleich zu Trypsin zeigte. Der Koagulationsfaktor Xa zeigte in seiner aktiven Form weder einen Effekt in murinen noch in humanen glatten Muskelzellen.

IV.1.2 Stimulation von PAR2 in Tumor- und Endothelzellen

PAR2 kann *in vitro* mit dem Hexapeptid SLIGKV-NH₂, abgeleitet von der Aminosäuresequenz des geschnittenen N-Terminus des Rezeptors, oder mit der Rezeptor aktivierenden Protease Trypsin aktiviert werden (Nystedt *et al.*, 1994). Die invasive Zelllinie MDA-MB 231, isoliert aus einem Adenokarzinom, exprimiert verstärkt PAR2 (Cailleau *et al.*, 1974; Su *et al.*, 2009). In der Lungenkarzinomzelllinie A549 wurde die Expression und Stimulation von PAR2 mit einer verhinderten Apoptose der Tumorzellen assoziiert (Huang *et al.*, 2013). In primären humanen Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC) konnte gezeigt werden, dass PAR2 Rezeptoren unter hypoxischen Bedingungen verstärkt exprimiert und aktiviert werden und dass unter diesen Bedingungen verstärkt proangiogene Faktoren

ausgeschüttet werden (Svensson *et al.*, 2011). Die Stimulation mit steigenden Konzentrationen SLIGKV-NH₂ und Trypsin führte zum konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Freisetzung: Abbildung IV.3 A-B zeigt die Kinetik der Ca²⁺ Mobilisierung nach Stimulation der Zellen mit SLIGKV-NH₂ oder Trypsin in MDA-MB 231.

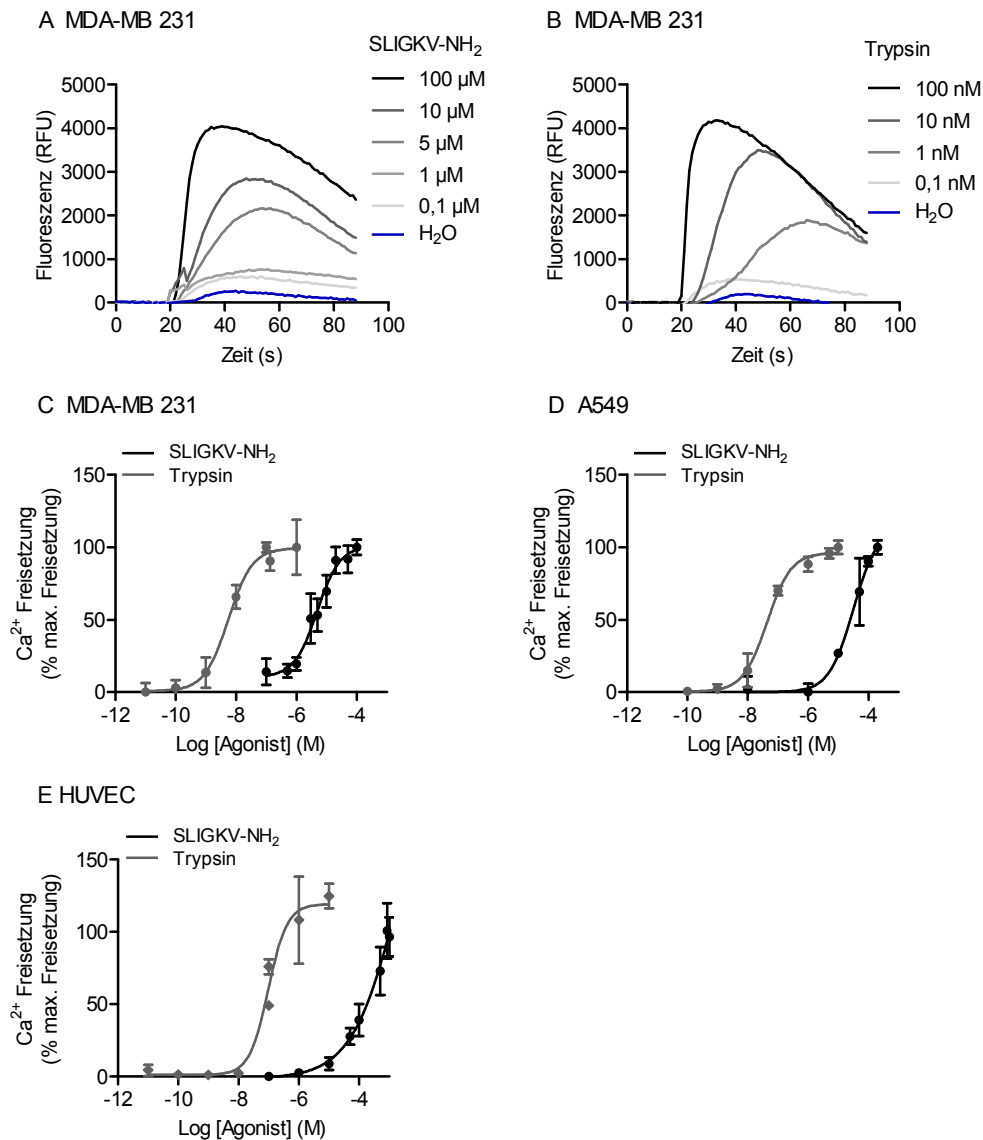


Abbildung IV.3: PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung in Tumor- und primären Endothelzellen

Die Zellen wurden mit Fluo-8 Ca²⁺ Indikator beladen und anschließend stimuliert. (A, B) Kinetik der intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung in MDA-MB 231 nach Stimulation der Zellen mit SLIGKV-NH₂ und Trypsin. (C, D, E) Konzentrations-Wirkungskurven der intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ induziert durch SLIGKV-NH₂ und Trypsin in MDA-MB 231, A549 und HUVEC. Die maximalen RFU-Werte der Ca²⁺ Kinetik in Prozent der maximalen Ca²⁺ Freisetzung wurden gegen die jeweilige logarithmische Konzentration des Agonisten aufgetragen. Die Ergebnisse repräsentieren MW ± SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten.

Innerhalb von 10-30 s nach Injektion von SLIGKV-NH₂ und Trypsin stieg der intrazelluläre Ca²⁺ Spiegel in der Zelle stark an und fiel nach dem Erreichen des Maximums langsam wieder ab. Die Ermittlung der Konzentrations-Wirkungskurve, sowie die daraus resultierende EC₅₀ für die PAR2 abhängige Ca²⁺ Freisetzung in der Zelle erfolgte durch logarithmische

Auftragung der eingesetzten Konzentration des Agonisten in mol/L (M) auf der Abszisse gegen die jeweiligen erreichten Fluoreszenzmaxima in % (Abbildung IV.3 C).

Die ermittelten EC_{50} Werte für SLIGKV-NH₂ und Trypsin unterschieden sich zwischen den drei untersuchten Zelllinien MDA-MB 231 ($7,46 \pm 0,88 \mu\text{M}$ und $4,49 \pm 0,41 \text{ nM}$), A549 ($23,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$ und $43,1 \pm 8,3 \text{ nM}$) und HUVEC ($109 \pm 9 \mu\text{M}$ und $112 \pm 15 \text{ nM}$). Die Rezeptor aktivierende Protease Trypsin aktivierte die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung in allen Zelllinien mit deutlich höherer Wirksamkeit, die EC_{50} für Trypsin lag in allen Zelllinien 500-1500fach niedriger als die ermittelte EC_{50} für SLIGKV-NH₂ (Abbildung IV.3 C-E). Die Anwesenheit funktionaler PAR2 Rezeptoren konnte in den Zelllinien MDA-MB 231, A549 und HUVEC durch die Messung der Ca^{2+} Freisetzung als Antwort der Zellen auf die Aktivierung des Rezeptors mit den PAR2 Agonisten SLIGKV-NH₂ und Trypsin nachgewiesen werden.

IV.1.3 Stimulation von PAR2 in gesunden und metastatischen Brustepithelzellen

Die Expression und Aktivierung von PAR2 in humanen Brustepithelzellen (HMEC), isoliert aus gesundem, weiblichem Brustgewebe und in invasiven, metastatischen Karzinomzellen (MDA-MB 231), sollte anhand der intrazellulären Ca^{2+} Mobilisierung (II.2.2) und der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) (II.2.3) analysiert werden. Abbildung IV.4 A zeigt die Kinetik der Ca^{2+} Mobilisierung nach der Stimulation von HMEC mit unterschiedlichen Agonisten.

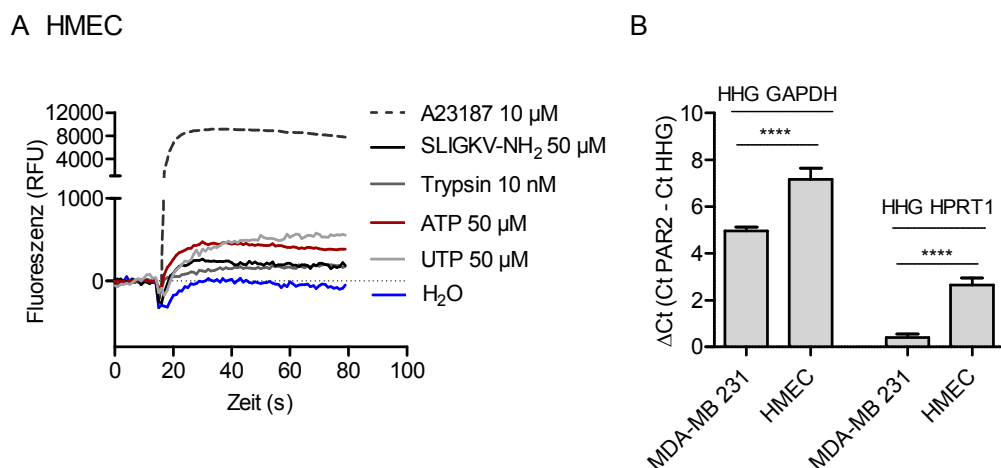


Abbildung IV.4: Stimulation und Expression von PAR2 in humanen nicht-kanzerogenen Brustepithelzellen

(A) Kinetik der Ca^{2+} Mobilisierung nach Stimulation von HMEC mit SLIGKV-NH₂ (50 μM), Trypsin (10 nM), ATP (50 μM) und UTP (50 μM). Als Negativ- und Positivkontrolle für minimale und maximale Fluoreszenz dienten H₂O und Ca^{2+} Ionophor A23187 (10 μM). Dargestellt sind MW aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. (B) Untersuchung der Genexpression von *PAR2* in MDA-MB 231 und HMEC mittels qPCR. Die Expression von *PAR2* wurde gegen zwei Haushaltsgene (HHG), *GAPDH* und *HPRT1*, normalisiert. Dargestellt sind die ΔCt MW \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten, mit $\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{PAR2}) - \text{Ct} (\text{HHG})$. Zur statistischen Analyse erfolgte ein ungepaarter Student's t-Test. **** $P < 0,0001$.

Die Stimulation mit SLIGKV-NH₂ bis zu einer Konzentration von 50 µM und mit Trypsin bis 10 nM führte zu keiner signifikanten Ca²⁺ Mobilisierung in HMEC Zellen (Abbildung IV.4A). Im Vergleich dazu betrug die EC₅₀ für SLIGKV-NH₂ und Trypsin in MDA-MB 231 Zellen 7,46 ± 0,88 µM, bzw. 4,49 ± 0,41 nM. Der Ionophor A23187 geht stabile Komplexe mit zweiwertigen Kationen ein und wirkt als Ionen-Carrier für den Transport von Ca²⁺ und weiteren Kationen über Membranen und wird *in vitro* verwendet, um die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration in intakten Zellen zu erhöhen (Reed und Lardy, 1972; Wulf und Pohl, 1977). Die erfolgreiche Aufnahme des Ca²⁺ Indikators in HMEC konnte durch die Stimulation der Zellen mit A23187, die in einem starken bis maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität resultierte, nachgewiesen werden. Um die Ca²⁺ Antwort in HMEC nach Stimulation eines endogenen Rezeptors nachzuweisen, wurden die Zellen mit den Liganden ATP und UTP der purinergen, ubiquitär exprimierten P2Y Rezeptoren stimuliert. Jedoch konnte lediglich ein moderater Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit ein sehr schwacher Ca²⁺ Einstrom in das Zytosol detektiert werden.

Um weiterhin zu prüfen, ob PAR2 im Vergleich zu gesunden Epithelzellen verstärkt auf kanzerogenen, metastatischen Brustepithelzellen exprimiert wird, wurde die Expression von *PAR2* in HMEC und MDA-MB 231 mittels qPCR analysiert. In Abbildung IV.4 B sind die C_t Werte (engl. cycle threshold) normalisiert gegen zwei verschiedene Haushaltsgene (HHG), *GAPDH* und *HPRT-1* dargestellt. Die endogene Expression von *PAR2* war in MDA-MB 231 im Vergleich zu HMEC signifikant erhöht.

Die Ca²⁺ Antwort in HMEC nach deren Stimulation mit den PAR2 spezifischen Agonisten SLIGKV-NH₂ und Trypsin war im Vergleich zu MDA-MB 231 signifikant reduziert und konnte mit hohen Peptid- und Protease Konzentrationen nicht ausgelöst werden. Die Expressionsanalyse von *PAR2* in gesunden und metastatischen Brustepithelzellen konnte zusätzlich die Hypothese unterstützen, dass PAR2 in aggressiven Tumorzellen verstärkt exprimiert wird und somit auch verstärkt aktiviert werden kann.

IV.1.4 Stimulation von PAR1 und P2Y in Tumorzellen

Für eine spätere Charakterisierung der Spezifität von Teleocidin A2 in Bezug auf die PAR2 induzierte Ca²⁺ Mobilisierung erfolgte, aufbauend auf den Experimenten zur PAR2 Stimulierung, die Aktivierung weiterer G_q gekoppelter GPCRs (PAR1 und P2Y) in den Krebszelllinien MDA-MB 231 und A549. Dazu wurde die Antwort der Zellen auf die Stimulation von PAR1 mit PAR1 aktivierendem Peptid TFLLR-NH₂ und mit der Rezeptor aktivierenden Protease Thrombin, sowie die Antwort auf die Stimulation purinerge P2Y Rezeptoren mit ATP gemessen und die EC₅₀ bestimmt (Abbildung IV.5). Purinerge P2Y

Rezeptoren sind ubiquitär exprimierte GPCR, die durch Nukleotide reguliert werden. Sie reagieren auf Adenin- (ATP, ADP) und Uridinnukleotide (UTP, UDP) sowie auf den Nukleotidzucker UDP-Glucose. Mehrere ATP und/oder UTP regulierte Untergruppen der Rezeptorklasse der P2Y Rezeptoren koppeln an G_q und lösen IP_3 vermittelt einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} Konzentration aus. P2Y Rezeptoren regeln die Aggregation von Thrombozyten, die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) sowie die Immunantwort (Erb und Weisman, 2012).

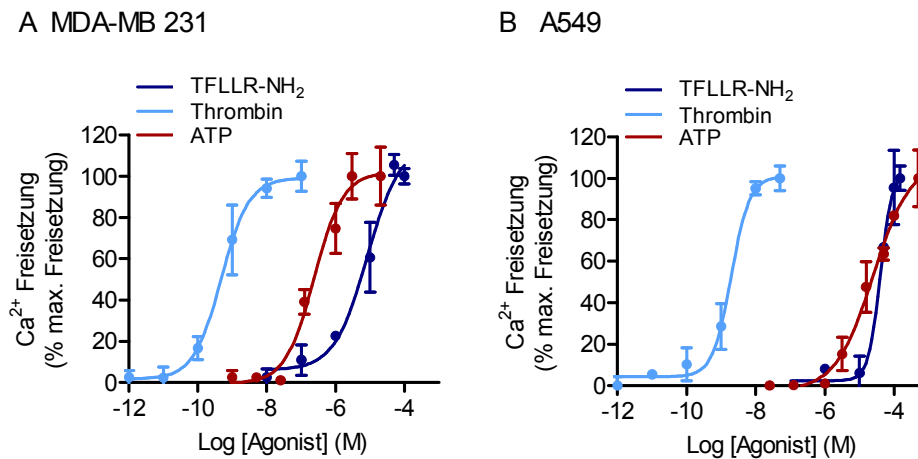


Abbildung IV.5: PAR1 und P2Y abhängige Ca^{2+} Mobilisierung in Tumorzellen

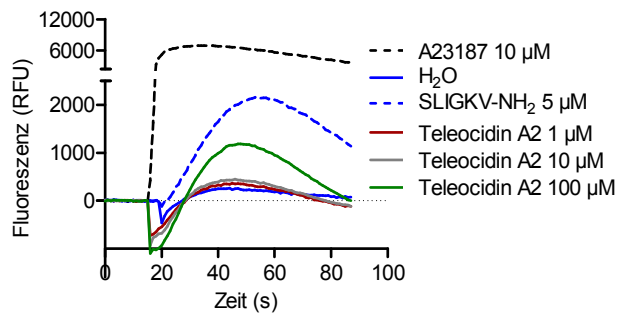
Konzentrations-Wirkungskurven der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} induziert durch die PAR1 Agonisten Thrombin und TFLLR-NH₂ sowie durch ATP, Agonist der P2Y Rezeptorfamilie in MDA-MB 231 (A) und A549 (B). Vor der Stimulation wurden die Zellen mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladen. Die Ergebnisse repräsentieren MW \pm SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten.

Die Stimulierung von PAR1 mit PAR1 aktivierenden Peptid TFLLR-NH₂ oder Thrombin führte zum konzentrationsabhängigen Anstieg der PAR1 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung mit EC₅₀ Werten von $7,15 \pm 0,60 \mu M$ und $0,53 \pm 0,12 nM$ für MDA-MB 231 und EC₅₀ Werten von $52,1 \pm 5,0 \mu M$ und $2,57 \pm 0,12 nM$ für A549 Zellen jeweils für TFLLR-NH₂ und Thrombin. Thrombin wies, wie zuvor beobachtet bei der PAR2 aktivierenden Protease Trypsin, eine signifikant erhöhte Wirkung im Vergleich zu TFLLR-NH₂ auf. Die Stimulierung der ubiquitär exprimierten P2Y Rezeptorgruppe mit ATP resultierte in einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Ca^{2+} Freisetzung in MDA-MB 231 und A549. Die jeweils ermittelten EC₅₀ für ATP betragen $254 \pm 9 nM$ in MDA-MB 231 und $37,2 \pm 15,6 \mu M$ in A549. Die Stimulation der Ca^{2+} Mobilisierung durch die PAR1 Agonisten TFLLR-NH₂ und Thrombin sowie durch den P2Y Rezeptor Agonist ATP konnte in MDA-MB 231 und A549 Zellen erfolgreich charakterisiert werden. Zur Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung verschiedener Verbindungen auf die Ca^{2+} Mobilisierung wurden die ermittelten EC₅₀ Werte zur Stimulation der Rezeptoren eingesetzt.

IV.1.5 Einfluss von Teleocidin A2 auf die intrazelluläre Ca^{2+} Mobilisierung

Ziel des Versuchs war es, die agonistische Aktivität von Teleocidin A2 hinsichtlich einer Ca^{2+} Mobilisierung zu untersuchen. Im Gegensatz zu einer deutlichen Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration nach Stimulation mit dem Kationen Ionophor A23187 in gesunden HMEC und MDA-MB 231 Zellen sowie nach Stimulation von MDA-MB 231 mit SLIGKV-NH₂ löste Teleocidin A2 keine Ca^{2+} Ausschüttung in den Zellen aus (Abbildung IV.6).

A MDA-MB 231



B HMEC

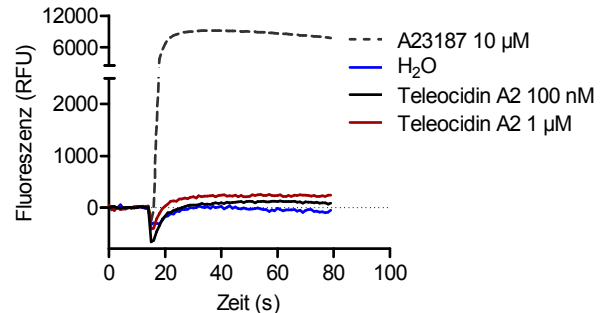


Abbildung IV.6: Kontrolle zur intrinsischen agonistischen Funktionalität von Teleocidin A2

Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} Mobilisierung in MDA-MB 231 (A) und HMEC (B) nach Stimulation der Zellen mit Teleocidin A2. SLIGKV-NH₂ (5 μM) diente als Kontrolle für die PAR2 Aktivierung in MDA-MB 231, A23187 (10 μM) und H₂O zur Kontrolle der maximalen, bzw. minimalen Fluoreszenz. Die Zellen wurden mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladen und anschließend stimuliert. Dargestellt sind MW aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten.

Erst ab Konzentrationen von 10 – 100 μM konnte in MDA-MB 231 ein schwacher Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Injektion des Teleocidins A1/A2 detektiert werden. In den für die PAR2 Inhibition relevanten Konzentrationen (< 50 nM) zeigte Teleocidin A2 keine biologische Aktivität hinsichtlich einer Ca^{2+} Freisetzung in MDA-MB 231 sowie in nicht kanzerogenen HMEC.

IV.2 Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung durch Teleocidin A2

Eine Auswahl verschiedener Naturstoffe wurde im Rahmen eines zellbasierten Screenings analysiert, das dazu diente, neue PAR2 inhibierende Verbindungen zu identifizieren¹⁰. Der Naturstoff Teleocidin A2 isoliert aus *Streptomyces spec.* konnte als potentiell PAR2 inhibierende Substanz identifiziert werden. Zur genaueren Analyse von Teleocidin A2 wurde die Inhibition der durch zwei strukturell verschiedene PAR2 Agonisten (SLIGKV-NH₂, Trypsin) ausgelösten, PAR2 abhängigen, intrazellulären Ca^{2+} Mobilisierung untersucht. Zur Charakterisierung eines spezifischen inhibitorischen Effekts von Teleocidin A2 auf das PAR2 induzierte Ca^{2+} Signal wurde die Wirkung von Teleocidin A2 auf die endogen exprimierten GPCRs PAR1 und P2Y in Tumorzellen untersucht. In einem funktionalen zellbasierten

¹⁰ Unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Nicole Teusch

Antagonisten Assay hängen die mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) stark von den Bedingungen ab, unter denen sie gemessen werden. Je höher die eingesetzte agonistische Konzentration zur Stimulation des gemessenen Faktors, desto höher die ermittelten IC_{50} Werte. Zur besseren Vergleichbarkeit der IC_{50} Werte auf unterschiedlichen Zelllinien, erfolgte die Stimulation mit der EC_{50} des jeweiligen Agonisten sowie eine regelmäßige Bestimmung der EC_{50} zur Überprüfung der Reaktivität der Zellen auf ihre Stimuli.

IV.2.1 Spezifische Inhibition der SLIGKV-NH₂ abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung

Zur Charakterisierung der Inhibition der PAR2 vermittelten Ca²⁺ Mobilisierung in Tumor- und Endothelzellen durch Teleocidin A2 wurden die Zellen mit Ca²⁺ Indikator beladen und mit steigenden Konzentrationen Teleocidin A2 inkubiert und anschließend mit dem zuvor ermittelten EC_{50} Wert für SLIGKV-NH₂ in MDA-MB 231, A549 und HUVEC stimuliert. Ziel war es, die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) als Maß für die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung in der Zelle zu ermitteln. Dies erfolgte durch die logarithmische Auftragung der eingesetzten Konzentration des Antagonisten in mol/L (M) auf der Abszisse gegen die jeweiligen erreichten Fluoreszenzmaxima in %. In MDA-MB 231, A549 und HUVEC konnte der durch das Peptid SLIGKV-NH₂ ausgelöste Einstrom von Ca²⁺ durch Teleocidin A2 mit vergleichbarer Wirksamkeit inhibiert werden (Abbildung IV.7 A, B, C). Die IC_{50} von Teleocidin A2 lag bei $18,1 \pm 1,7$ nM auf MDA-MB 231 Zellen, $25,8 \pm 1,7$ nM auf A549 Zellen und $14,0 \pm 4,1$ nM auf HUVEC Zellen. Um ausschließen zu können, dass Teleocidin A2 die Detektion der Ca²⁺ Ionen in der Zelle beeinflusst, wurden MDA-MB 231 Zellen zusätzlich mit einer hohen Teleocidin A2 Konzentration (2 μ M) inkubiert und anschließend der Ca²⁺ Einstrom mittels Kationen Ionophor A23187 ausgelöst. Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration durch A23187 wurde durch Teleocidin A2 nicht beeinflusst (Abbildung IV.7 D).

Die Stimulation von PAR1 und P2Y Rezeptoren in MDA-MB 231 und A549 Zellen führte zum Anstieg der Ca²⁺ Konzentration (IV.1.4). Teleocidin A2 inhibierte die durch das PAR1 spezifische Peptid TFLLR-NH₂ bei EC_{50} (7,1 μ M oder 52 μ M) ausgelöste Ca²⁺ Freisetzung in MDA-MB 231 und A549 Zellen, jedoch mit deutlich geringerer Wirkung (Abbildung IV.8 A, B).

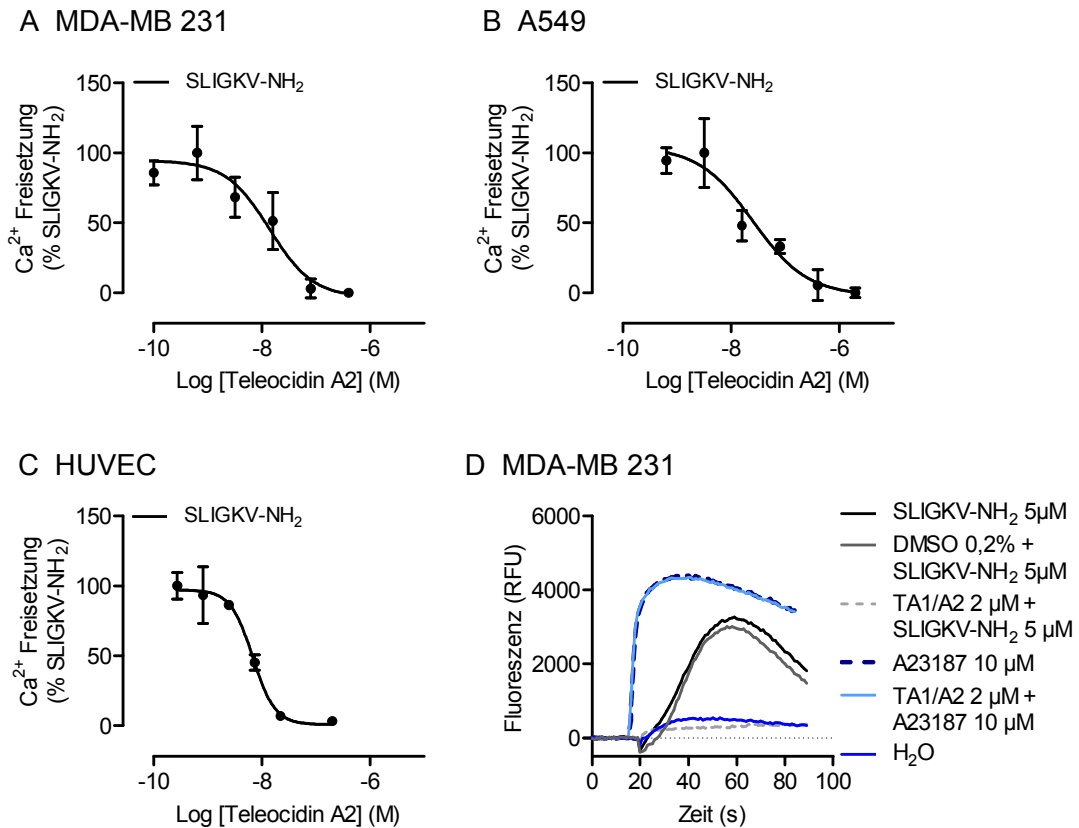


Abbildung IV.7: Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung in Tumor- und primären Endothelzellen

(A, B, C) Konzentrations-Wirkungskurven der Inhibition der intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ induziert durch SLIGKV-NH₂ in MDA-MB 231, A549 und HUVEC. Die maximalen RFU-Werte der Ca²⁺ Kinetik in Prozent der Ca²⁺ Freisetzung induziert mit der jeweiligen, Zelltyp spezifischen EC₅₀ von SLIGKV-NH₂ wurden gegen die jeweilige logarithmische Konzentration des Antagonisten Teleocidin A2 aufgetragen. Die Zellen wurden mit Fluo-8 Ca²⁺ Indikator beladen, dann 15 min mit steigenden Konzentrationen Teleocidin A2 inkubiert und anschließend mit SLIGKV-NH₂ (EC₅₀) stimuliert. (D) Kinetik der intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung der durchgeführten Kontrollen in MDA-MB 231. Die Kontrollen beinhalteten 0,2% DMSO mit anschließender Stimulation durch SLIGKV-NH₂ und Teleocidin A2 mit anschließender Stimulation durch Ca²⁺ Ionophor A23187. Die Ergebnisse repräsentieren MW ± SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in biologischen Triplikaten.

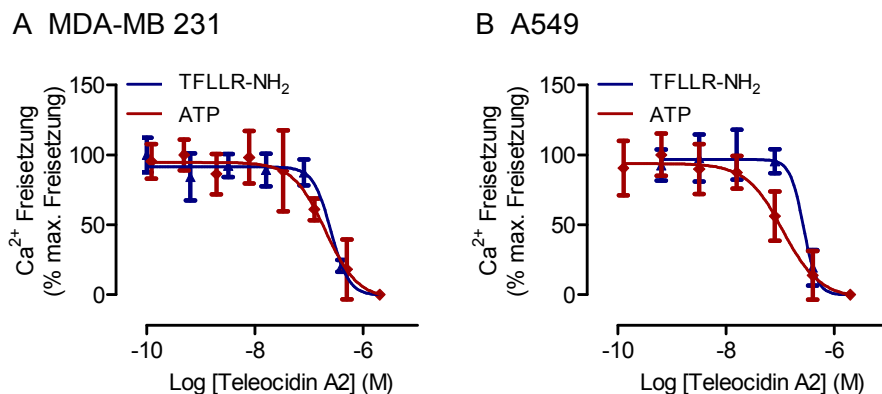


Abbildung IV.8: Inhibition der PAR1 und P2Y Rezeptor abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung in Tumorzellen

(A, B) Konzentrations-Wirkungskurven der Inhibition der intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ induziert durch TFLLR-NH₂ und ATP in MDA-MB 231 und A549. Die maximalen RFU-Werte der Ca²⁺ Kinetik in Prozent der maximalen Ca²⁺ Freisetzung induziert mit der jeweiligen, Zelltyp spezifischen EC₅₀ von TFLLR-NH₂ und ATP wurden gegen die jeweilige logarithmische Konzentration des Antagonisten Teleocidin A2 aufgetragen. Die Zellen wurden mit Fluo-8 Ca²⁺ Indikator beladen, dann 15 min mit Teleocidin A2 inkubiert und anschließend mit TFLLR-NH₂ (EC₅₀) und ATP (EC₅₀) stimuliert. Die Ergebnisse repräsentieren MW ± SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten.

Die IC_{50} für die Inhibition des PAR1 abhängigen Ca^{2+} Signals war im Vergleich zur Inhibition von PAR2 20 fach erhöht in MDA-MB 231 (371 ± 58 nM) und 8 fach erhöht in A549 (200 ± 38 nM). Teleocidin A2 inhibierte die Ca^{2+} Mobilisierung ausgelöst durch den ATP regulierten P2Y Rezeptor, jedoch mit einer ebenso niedrigeren Wirkung. Im Vergleich zu PAR2 wurde die Rezeptorgruppe P2Y auf MDA-MB 231 10 fach weniger effizient (IC_{50} 179 ± 37 nM) und auf A549 3 fach weniger effizient (IC_{50} 78 ± 11 nM) inhibiert.

Die Antwort der Zellen auf die Aktivierung von PAR2 konnte mit Teleocidin A2 Konzentrationen, die im niedrigen, nanomolaren Bereich lagen, unterdrückt werden. Zusammenfassend konnte eine wirksame Inhibition der Ca^{2+} Freisetzung, ausgelöst durch die Aktivierung endogener PAR2 Rezeptoren mit SLIGKV-NH₂ auf MDA-MB 231, A549 sowie HUVEC, nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein potenter und selektiver inhibitorischer Effekt des Teleocidins A2 auf die PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ induzierte Ca^{2+} Mobilisierung in der Zelle in Tumorzellen eindeutig nachgewiesen. Die Inhibition der Rezeptoraktivierung durch die PAR2 aktivierende Protease Trypsin sollte im nächsten Schritt untersucht werden, um die Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 zu unterstreichen.

IV.2.2 Spezifische Inhibition der Trypsin abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung

Kurze, vom Protease prozessierten N-Terminus abgeleitete Peptide, wie SLIGKV-NH₂ (PAR2) und TFLLR-NH₂ (PAR1) besitzen eine höhere Stabilität in Lösung im Vergleich zu PAR aktivierenden Proteasen. Sie vereinfachen dadurch die Experimente zur Untersuchung Protease aktivierter Rezeptoren. Sie aktivieren die Rezeptoren mit deutlich geringerer Potenz gegenüber den Proteasen (Chung *et al.*, 2002). Die Wirksamkeit von Teleocidin A2 auf die Inhibition der durch Trypsin ausgelösten, PAR2 abhängigen Antwort in MDA-MB 231 sollte untersucht werden. Zur Charakterisierung der Selektivität von Teleocidin A2 in Bezug auf die Protease stimulierte PAR2 Aktivierung sollte außerdem die Inhibition der durch Thrombin ausgelösten, PAR1 abhängigen Ca^{2+} Antwort analysiert werden.

EC_{50} Werte für Trypsin und Thrombin in MDA-MB 231 konnten erfolgreich ermittelt werden (IV.1.2; IV.1.4) und wurden in diesem Experiment für die Testung von Teleocidin A2 in MDA-MB 231 verwendet. Der Vergleich der Inhibition der Trypsin und Thrombin vermittelten Ca^{2+} Ausschüttung zeigte einen Unterschied in der Selektivität von Teleocidin A2 (Abbildung IV.9A, B). Vorapaxar ist ein auf dem Naturstoff Himbacin basierender PAR1 Antagonist, der seit 2014 durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen ist (Morrow *et al.*, 2012). Vorapaxar diente hier als Kontrolle für die spezifische Inhibition der PAR1/Thrombin abhängigen Ca^{2+} Freisetzung (Abbildung IV.9B, C).

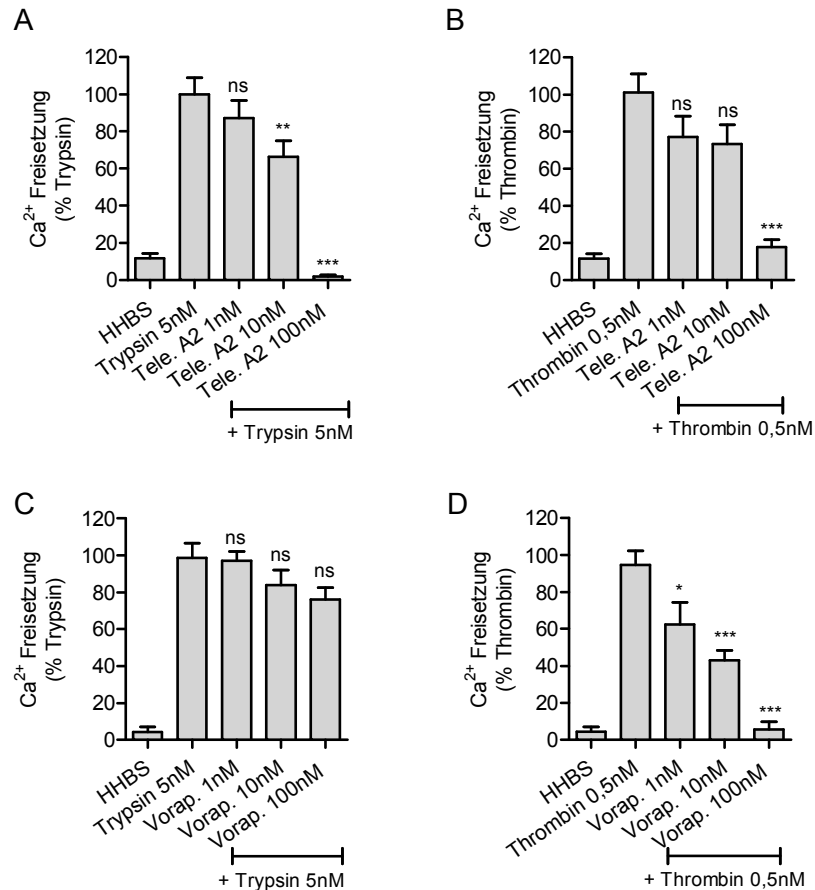


Abbildung IV.9: Inhibition der Trypsin und Thrombin abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung mit Teleocidin A2 und Vorapaxar

Konzentrationsabhängige, spezifische Inhibition der intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ in MDA-MB 231 durch Teleocidin A2 (A, B) und Vorapaxar (C, D). Mit Ca²⁺ Indikator Fluo-8 beladene Zellen wurden 15 min mit Teleocidin A2 (A, B) oder Vorapaxar (C, D) inkubiert und anschließend mit Thrombin oder Trypsin bei EC₅₀ stimuliert. Die Ergebnisse zeigen maximale RFU-Werte der Ca²⁺ Kinetik in Prozent, normalisiert gegen die jeweils interne Trypsin oder Thrombin induzierte Ca²⁺ Freisetzung. Dargestellt sind MW ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte durch eine einseitige ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test mit Trypsin oder Thrombin als Kontrolle. ns, nicht statistisch signifikant, *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001 versus Thrombin 0,5 nM oder Trypsin 5 nM.

Die Ca²⁺ Ausschüttung über PAR2 wurde von 100 nM Teleocidin A2 vollständig unterdrückt ($1,93 \pm 0,82$ % Ca²⁺ Freisetzung) und von 10 nM auf $56,3 \pm 7,3$ % reduziert, die Ausschüttung über PAR1 von 100 nM auf $17,7 \pm 3,9$ % und von 10 nM auf lediglich $87,3 \pm 9,9$ % des Thrombin abhängigen Ca²⁺ Signals reduziert. Im Gegensatz zur Trypsin-PAR2 induzierten Ca²⁺ Antwort wurde die Thrombin-PAR1 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung konzentrationsabhängig von Vorapaxar inhibiert. Bei Behandlung der Zellen mit 100 nM Vorapaxar wurde eine vollständige Unterdrückung der Ca²⁺ Ausschüttung erreicht ($5,6 \pm 4,0$ % Ca²⁺ Freisetzung) und mit 10 nM Vorapaxar das Signal auf $43,0 \pm 5,4$ % reduziert. Dagegen wurde das Trypsin-PAR2 abhängige Signal durch 100 nM Vorapaxar auf $76,1 \pm 6,4$ % und durch 10 nM lediglich auf $84,0 \pm 7,9$ % herabgesetzt (Abbildung IV.9 B).

Die PAR2 abhängige und durch Trypsin aktivierte Ca^{2+} Ausschüttung konnte, vergleichbar mit der Inhibition des Peptid stimulierten Signals (III.1.5), von Teleocidin A2 wirksamer unterdrückt werden, als die durch Thrombin ausgelöste Ausschüttung. Der PAR1 Antagonist Vorapaxar zeigte im Experiment zur Ca^{2+} Mobilisierung eine deutliche Selektivität zu PAR1, Teleocidin A2 dagegen zeigte eine signifikant spezifische Inhibition von PAR2.

Tabelle IV.1 zeigt eine abschließende Zusammenfassung ermittelter EC_{50} Werte der Ca^{2+} Mobilisierung in den Zelllinien MDA-MB 231, HUVEC und A549, mit denen die Zellen in den Inhibitorstudien stimuliert wurden. Die Tabelle fasst außerdem die gemessenen IC_{50} für die Inhibition der PAR2, PAR1 und P2Y abhängigen Ca^{2+} Ausschüttung zusammen.

Tabelle IV.1: Stimulation der Ca^{2+} Mobilisierung in Tumor und Endothelzellen mit PAR2, PAR1 und P2Y Agonisten und Inhibition der Rezeptor vermittelten Ca^{2+} Antwort mit Teleocidin A2

Rezeptor	Ligand	Zelllinie	EC_{50} (nM/ μM)	n	IC_{50} (nM)	n
PAR2	SLIGKV-NH ₂	MDA-MB 231	$7,46 \pm 0,88 \mu\text{M}$	5	$18, \pm 1,7$ (ns)	9
		HUVEC	$109 \pm 9 \mu\text{M}$	3	$14,0 \pm 4,1$ (* vs A549)	3
		A549	$23,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$	3	$25,8 \pm 1,7$ (* vs HUVEC)	4
	Trypsin	MDA-MB 231	$4,49 \pm 0,41 \text{ nM}$	4		
		HUVEC	$112 \pm 15 \text{ nM}$	3	n.d.	
		A549	$43,1 \pm 8,3 \text{ nM}$	3	n.d.	
PAR1	TFLLR-NH ₂	MDA-MB 231	$7,15 \pm 0,60 \mu\text{M}$	4	371 ± 58 (**)	5
		A549	$52,1 \pm 5,0 \mu\text{M}$	3	200 ± 38 (**)	3
	Thrombin	MDA-MB 231	$0,53 \pm 0,12 \text{ nM}$	3		
		A549	$2,57 \pm 0,12 \text{ nM}$	3	n.d.	
P2Y	ATP	MDA-MB 231	$254 \pm 9 \text{ nM}$	4	179 ± 37 (**)	4
		A549	$37,2 \pm 15,6 \mu\text{M}$	3	$77,9 \pm 10,6$ (**)	4

Gezeigt sind die MW \pm SEM aus drei oder mehr unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Der statistische Vergleich der IC_{50} Werte für Teleocidin A2 getestet gegen SLIGKV-NH₂ auf den Zelllinien MDA-MB 231, A549 und HUVEC erfolgte anhand einer einseitigen ANOVA mit anschließendem Tukey's Post-hoc Test. Der statistische Vergleich zweier IC_{50} Werte für Teleocidin A2 getestet gegen SLIGKV-NH₂ und TFLLR-NH₂ bzw. SLIGKV-NH₂ ATP auf einer Zelllinie erfolgte mittels ungepaartem Student's t-Test. * $P < 0,05$, n.d., nicht definiert.

Anhand der Untersuchungen zur Ca^{2+} Mobilisierung wurde gezeigt, dass a) Teleocidin A2 die PAR2 stimulierte Ca^{2+} Antwort in Brust- und Lungenkarzinomzellen und in primären Endothelzellen potent und konzentrationsabhängig unterdrückt und b) Teleocidin A2 einen spezifischen Effekt auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Ausschüttung zeigt. Die Ca^{2+} Ausschüttung über verwandte G_q gekoppelte Rezeptoren aus der Familie der GPCRs konnte ausschließlich mit 10-20fach höheren Teleocidin A2 Konzentrationen reduziert werden. Der spezifische Effekt deutet auf eine direkte Interaktion von Teleocidin A2 und PAR2 hin. Zur Aufklärung, ob der Mechanismus der Inhibition über eine direkte Konkurrenz mit der Bindung des PAR2 Peptids oder der freigelegten N-terminalen Sequenz läuft, wurde ein Radioliganden Bindungstest durchgeführt (Kapitel IV.3).

IV.3 Analyse der Bindung von Teleocidin A2 an PAR2

In IV.2.1 und IV.2.2 konnte die selektive Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Ausschüttung durch Teleocidin A2 gezeigt werden. Das Ziel war es demnach zu analysieren, ob der Mechanismus der Inhibition abhängig von einer konkurrierenden Bindung von SLIGKV-NH₂ oder der neu generierten N-terminalen Sequenz an extrazelluläre Schleifen des Rezeptors ist. Die Bindungsstudie wurde bei der Firma CEREP (Celle l'Evescault, Frankreich) in Auftrag gegeben. Die Bindung von Teleocidin A2 an humanen PAR2 in rekombinanten Hela Zellen wurde in Konkurrenz mit dem radioaktiv markierten PAR2 Peptid [³H]2-f-LIGRL-NH₂ analysiert (Kanke *et al.*, 2005) (Tabelle IV.2).

Tabelle IV.2: PAR2 (human) Agonist Radioliganden Bindungstest¹¹

Verbindung	Testkonzentration	% Inhibition der spezifischen Bindung von [³ H]2-f-LIGRL-NH ₂
SLIGRL-NH ₂ (Referenz)	0,12 µM	50
Teleocidin A2	0,5 µM 5 µM	-2,05 ± 9,82 (n=2) 3,75 ± 3,18 (n=2)

Radioaktiv markierter PAR2 Agonist [³H]2-f-LIGRL-NH₂ diente als kompetitiver Agonist zur Analyse der Bindung von Teleocidin A2 an humanen PAR2 in rekombinanten Hela Zellen. Der IC₅₀ Wert der Referenz SLIGRL-NH₂ bezüglich Inhibition der spezifischen Bindung von [³H]2-f-LIGRL-NH₂ betrug 0,12 µM. Dargestellt sind MW ± SD jeweils aus einem Duplikat.

Die Inhibition der spezifischen Bindung von [³H]2-f-LIGRL-NH₂ an PAR2 durch 0,5 und 5 µM Teleocidin A2 lag unter 4 % und wurde somit als nicht relevant angesehen. Als Referenzsubstanz wurde murines PAR2 Peptid SLIGRL-NH₂ (0,12 µM) getestet, welches das radioaktiv markierte [³H]2-f-LIGRL-NH₂ von der Bindestelle des Rezeptors verdrängt. Die Ergebnisse zeigten, dass Teleocidin A2 das radioaktiv markierte PAR2 Peptid nicht von seiner Bindungsstelle am PAR2 verdrängen kann.

IV.4 Zielprotein unabhängige Wirkungen von Teleocidin A2

Phorbolster wie PMA sowie Teleocidine sind allgemein für ihre Tumor-fördernde Wirkung bekannt (Fisher *et al.*, 1982), die mit der Aktivierung von Protein Kinase C (PKC) Isoformen klar assoziiert werden konnte (Fujiki *et al.*, 1981). Das Isomer Teleocidin A1 aus *Streptomyces* ist identisch mit Lyngbyatoxin A, einem toxischen Sekundärmetaboliten aus dem marinen Cyanobakterium *Moorea producens* (Osborne *et al.*, 2001; Engene *et al.*, 2012). Als Inhibitor der PAR2 induzierten Signalweiterleitung in der Zelle sollte Teleocidin A2 in den relevanten inhibitorischen Konzentrationen keine unspezifischen zytotoxischen oder proliferativen Effekte auf die Zellen zeigen. Basierend auf den aus der Literatur bekannten Wirkungen der Teleocidine, wurden potenzielle PAR2 Zielprotein unabhängige Effekte von

¹¹ Der Bindungstest wurde bei der Firma CEREP (Celle l'Evescault, France) in Auftrag gegeben.

Teleocidin A2 in der metastatischen Zelllinie MDA-MB 231 analysiert und dazu a) ein Viabilitätstest zur Untersuchung möglicher pro-proliferativer oder zelltoxischer Eigenschaften und b) ein zellbasierter PKC Aktivitätstest durchgeführt.

IV.4.1 Wirkung von Teleocidin A2 auf die Zellviabilität

Die Untersuchung der Viabilität nach Behandlung der Zellen mit Teleocidin A2 erfolgte durch die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen auf Basis des ATP Gehalts anhand des Viabilitätsassays CellTiter-Glo® (III.2.4) (Abbildung IV.10).

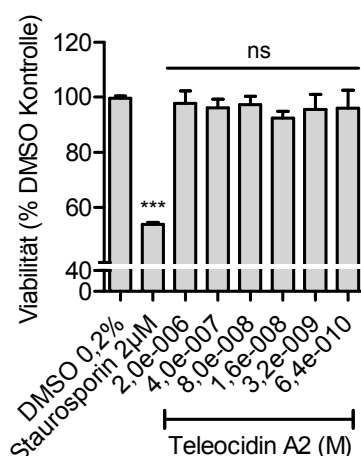


Abbildung IV.10: Kontrolle der Zytotoxizität von Teleocidin A2 in MDA-MB 231

In eine 384-Well Platte ausgesäte Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Teleocidin A2 (0,64 nM – 2µM) und Staurosporin (2 µM) als Zytotoxizitätskontrolle sowie 0,2% DMSO als Lösemittelkontrolle 24 h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl lebender Zellen wurde mit Hilfe von CellTiter-Glo® Reagenz ermittelt und die gemessene relative Lumineszenz Einheit (RLU) der DMSO Kontrolle auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und einem Dunnett's Post-hoc-Test. ns, nicht statistisch signifikant, ***P < 0,0001 versus DMSO Kontrolle.

Innerhalb der getesteten Kontaktzeit (24 h) der Zellen mit Teleocidin A2, in Konzentrationsabstufungen von 2 µM – 0,64 nM, zeigte sich keine Auswirkung der getesteten Substanz auf die Zellviabilität. Das Apoptose auslösende und Proteinkinase inhibierende Alkaloid Staurosporin wurde als Kontrolle verwendet und reduzierte die Viabilität von MDA-MB 231 auf etwa 50%. Teleocidin A2 zeigte weder eine gesteigerte Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die auf proliferative Effekte des Naturstoffs hindeuten könnte, noch eine reduzierte Zellzahl nach 24 h, welche auf zytotoxische Effekte hindeuten könnte.

IV.4.2 Einfluss der PKC auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung

Ziel des Versuchs war die Untersuchung eines Einflusses der Inhibition zellulärer PKC auf die PAR2 inhibierende Wirkung von Teleocidin A2 in MDA-MB 231. Dazu wurden mit Ca²⁺ Indikator beladene Zellen zunächst mit dem kompetitiven PKC Inhibitor Gö6983 (Gschwendt *et al.*, 1996) behandelt und anschließend 1) mit PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ bei EC₅₀

stimuliert, um die Freisetzung von Ca^{2+} über den PAR2 Rezeptor zu aktivieren. Des Weiteren wurden die Zellen 2) zunächst mit Gö6983 inkubiert, anschließend mit 20 nM Teleocidin A2 behandelt und dann mit SLIGKV-NH₂ bei EC₅₀ stimuliert.

Der PKC Inhibitor Gö6983 zeigte keine Beeinflussung des PAR2 abhängigen Ca^{2+} Signals. Jedoch kam es zu einer von Gö6983 konzentrationsabhängigen Aufhebung der Teleocidin A2 induzierten Inhibition der PAR2 stimulierten Ca^{2+} Freisetzung (Abbildung IV.11).

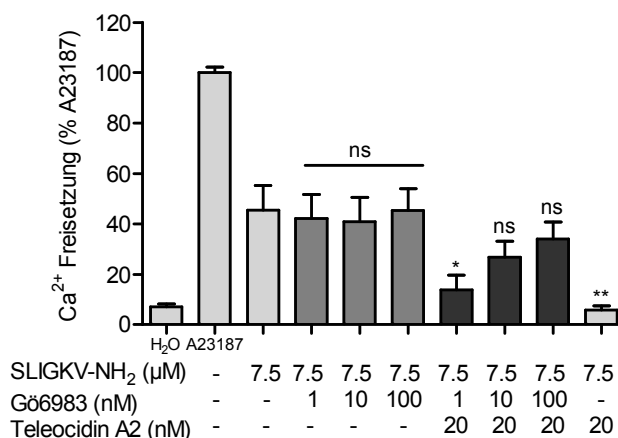


Abbildung IV.11: Wirkung des PKC Inhibitors Gö6983 auf die Teleocidin A2 vermittelte Inhibition des PAR2 abhängigen Ca^{2+} Signals

Mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladene Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Gö6983 (1, 10, 100 nM) inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von Teleocidin A2 (20 nM) und anschließend die Stimulation der Zellen mit SLIGKV-NH₂ (7,5 μM). Der Kationen Ionophor A23187 diente als Kontrolle für die maximale Fluoreszenz und die maximale RFU der Ca^{2+} Kinetik wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und einem Dunnett's Post-hoc-Test versus SLIGKV-NH₂ (7,5 μM). ns, nicht statistisch signifikant, *P < 0,05, **P < 0,001 versus SLIGKV-NH₂.

Die Stimulation der Zellen mit SLIGKV-NH₂ bei EC₅₀ führte zu einer Ca^{2+} Ausschüttung von $45,5 \pm 9,8$ %. Diese konnte mit 20 nM Teleocidin A2 auf $5,9 \pm 1,5$ % reduziert werden. Die Vorabinkubation mit 1 nM Gö6983 vor Zugabe von 20 nM Teleocidin A2 steigerte die PAR2 abhängige Ca^{2+} Ausschüttung auf $13,9 \pm 5,8$ %, mit 10 nM Gö6983 auf $26,7 \pm 6,3$ % und mit 100 nM Gö6983 auf $33,9 \pm 6,9$ %.

Die Daten deuteten darauf hin, dass die Inhibition der PAR2 vermittelten Ca^{2+} Mobilisierung durch die Zugabe eines PKC Inhibitors zu den Zellen beeinflusst werden kann und die PKC eine potenzielle Rolle in dem Mechanismus der Teleocidin A2 vermittelten Unterdrückung der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Antwort spielt. Teleocidin A2 unterdrückte die PAR2 abhängige Ca^{2+} Ausschüttung mit höhere Selektivität als andere G_q gekoppelte Rezeptoren aus der Familie der GPCRs, jedoch ist der Mechanismus dieser Wirkung unbekannt. Zur weiterführenden Aufklärung sollte die Aktivierung der PKC in einem zellbasierter ELISA genauer untersucht werden.

IV.4.3 Teleocidin A2 und PAR2 abhängige Aktivierung der PKC in Tumorzellen

Der Versuch diente zunächst der Untersuchung der PAR2 sowie der PAR1 abhängigen Stimulation der zellulären PKC in der Zelllinie MDA-MB 231. In III.1.1 und III.1.2 konnte die PAR2 sowie PAR1 abhängige Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern in MDA-MB 231 nachgewiesen werden. Eine wichtige Funktion des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} ist die Regulation der PKC in Kooperation mit DAG; die aktive PKC phosphoryliert nachgeschaltete zelluläre Effektorproteine. Die Abhängigkeit der Teleocidin A2 vermittelten Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Ausschüttung von dem PKC Inhibitor Gö6983 gibt Hinweise auf eine mögliche Interaktion von Teleocidin A2 mit zellulärer PKC (IV.4.2). Somit war das weitere Ziel, die Phosphorylierung von MARCKS und die damit im Zusammenhang stehende Aktivierung zellulärer PKC in MDA-MB 231 nach Behandlung der Zellen mit Teleocidin A2 zu untersuchen.

Ein zelluläres Effektorprotein der PKC ist endogen-myristyliertes-Alanin-reiches C Kinase Substrat (MARCKS) (Heemskerk *et al.*, 1993). Die Aktivierung zellulärer PKC in MDA-MB 231 wurde anhand des PathScan® Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) untersucht. Der ELISA detektiert die spezifische Phosphorylierung von MARCKS an Ser 152 und Ser 156 durch die PKC (Thelen *et al.*, 1991). PMA diente als Positivkontrolle für die Aktivierung der PKC (Abbildung IV.12).

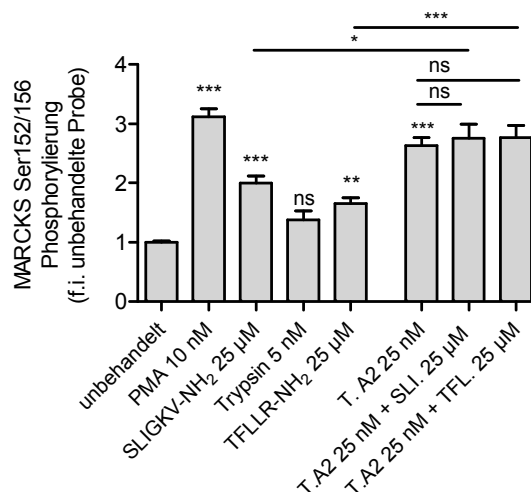


Abbildung IV.12: PAR2, PAR1 und Teleocidin A2 abhängige MARCKS Phosphorylierung in MDA-MB 231¹²

Die Zellen wurden mit 10 nM PMA als Positivkontrolle, 25 µM SLIGKV-NH₂, 5 nM Trypsin, 25 µM TFLLR-NH₂ und 25 nM Teleocidin A2 ohne/sowie mit 25 µM SLIGKV-NH₂ oder 25 µM TFLLR-NH₂ jeweils 10 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Phosphorylierung von MARCKS an Ser152/156 in Zelllysaten mittels PathScan® Phospho-MARCKS (Ser152/156) Sandwich ELISA Kit und Absorptionmessung bei 450 nm gemessen. Das Level der MARCKS Phosphorylierung in unbehandelten Zellen wurde als Experiment interner Standard normalisiert und gleich 1 gesetzt (f.i. = fold increase). Dargestellt sind die MW ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und dem Dunnett's Post-hoc-Test versus Kontrolle der unbehandelten Zellen, bzw. mittels Tukey's Post-hoc-Test. *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001 versus f.i. unbehandelte Zellen.

¹² Die Daten wurden von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

Die Phosphorylierung von MARCKS war, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, nach Behandlung mit 25 μM PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ 2-fach ($1,99 \pm 0,12$), nach Behandlung mit 5 nM Trypsin 1,4-fach ($1,37 \pm 0,15$) und nach Behandlung mit 25 μM PAR1 Peptid TFLLR-NH₂ 1,7-fach ($1,65 \pm 0,10$) erhöht. Die TFLLR-NH₂/PAR1 abhängige Phosphorylierung war, verglichen mit der SLIGKV-NH₂ abhängigen Phosphorylierung bei gleicher Peptidkonzentration, reduziert (0,3-fach). Die Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS ließ auf die PAR2 und PAR1 induzierte Aktivierung der PKC schließen.

Des Weiteren wurden die Zellen mit 25 nM Teleocidin A2 stimuliert, einer Konzentration, die die PAR2 abhängige Ca²⁺ Ausschüttung effektiv inhibiert. Die Menge an phosphoryliertem MARCKS in Zelllysaten war, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, nach Behandlung mit der Positivkontrolle PMA (10 nM) 3,1-fach ($3,12 \pm 0,14$) und nach Behandlung mit 25 nM Teleocidin A2 2,6-fach ($2,64 \pm 0,13$) erhöht. Somit zeigte sich eine stärkere PKC Aktivierung durch Stimulation mit dem Phorbolster PMA im Vergleich zur Stimulation mit Teleocidin A2.

Gleichzeitig wurde der Effekt von Teleocidin A2 auf die PAR2 sowie die PAR1 stimulierte PKC abhängige MARCKS Phosphorylierung untersucht. In den Ca²⁺ Mobilisierungsassays konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von MDA-MB 231 mit Teleocidin A2 (Inkubationszeit 10-15 min) zu einer, verglichen mit PAR1, selektiven Inhibition des SLIGKV-NH₂/PAR2 abhängigen Ca²⁺ Signals führte. Mittels pMARCKS ELISA wurde der Einfluss einer gleichzeitigen Inkubation mit PAR2 oder PAR1 Peptid und Teleocidin A2 auf die zelluläre PKC Aktivität in MDA-MB 231 evaluiert. Das Phospho-MARCKS Protein Level war, im Vergleich zur Kontrolle, SLIGKV-NH₂/PAR2 abhängig 2-fach ($1,99 \pm 0,12$) erhöht. Mit Teleocidin A2 und SLIGKV-NH₂ behandelte Zellen zeigten eine deutliche Steigerung der Menge an phosphoryliertem MARCKS ($2,76 \pm 0,24$ fach) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit 25 μM PAR1 Peptid TFLLR-NH₂ führte zur 1,7-fachen ($1,65 \pm 0,10$) Steigerung des pMARCKS Level. Die Teleocidin A2 abhängige PKC Aktivität (2,6-fach erhöhtes pMARCKS Level) wurde durch die PAR2 und PAR1 Peptide SLIGKV-NH₂ und TFLLR-NH₂ nicht signifikant beeinflusst.

Teleocidin A2 konnte PKC in MDA-MB 231 in nanomolaren Konzentrationen, die relevant für die Inhibition der PAR2 vermittelten Ca²⁺ Freisetzung sind, wirksam aktivieren.

IV.5 PAR2 stimulierte Migration von Tumorzellen

Die Migration und Invasivität von Tumorzellen sind dafür entscheidend, dass entartete Zellen in Lymph- und Blutgefäße eindringen, zirkulieren und Metastasen in entfernten Geweben ausbilden können.

Das Ziel des Versuchs war der Nachweis der PAR2 stimulierten Chemokinese in MDA-MB 231. Anschließend wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren von zellulären Effektorproteinen (PKC, RhoA/ROCK1/2, Rac1) auf die PAR2 stimulierte Chemokinese evaluiert, um die Regulation der PAR2 abhängigen Migration genauer zu charakterisieren. Mit Hilfe des OrisTM Zellmigrationsassays (II.2.7) wurde die Chemokinese der Zellen durch Einwanderung in eine definierte zellfreie Zone, abhängig von Agonisten und Inhibitoren, untersucht. Zur Detektion wurden die lebenden Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und die Anzahl der migrierten Zellen mittels einer Partikelanalyse in ImageJ quantifiziert.

IV.5.1 Stimulation der Migration von MDA-MB 231 abhängig von PAR2

Zunächst wurde die Migration der MDA-MB 231 Zellen nach deren Stimulation mit PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ und der PAR2 spezifischen Protease Trypsin untersucht. Als Positivkontrolle wurde humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) verwendet (Price *et al.*, 1999). Abbildung IV.13 A zeigt die mikroskopische Detektion markierter unbehandelter MDA-MB 231 Zellen zum Zeitpunkt 0 h (t=0) sowie nach 48 h und mit 25 µM SLIGKV-NH₂ behandelte Zellen nach 48 h. Im Vergleich zur basalen Migration der Zellen nach 48 h wanderten PAR2 stimulierte Zellen in deutlich höherer Anzahl in die freie Fläche ein. Die Stimulations-unabhängige basale Migration von MDA-MB 231 lässt sich darauf zurückführen, dass es sich um eine metastasierende Zelllinie aus einem Adenokarzinom handelt. Abbildung IV.13 B zeigt die Quantifizierung der Anzahl der migrierten Zellen anhand der Partikelanalyse. Die jeweilige basale Migration unbehandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt.

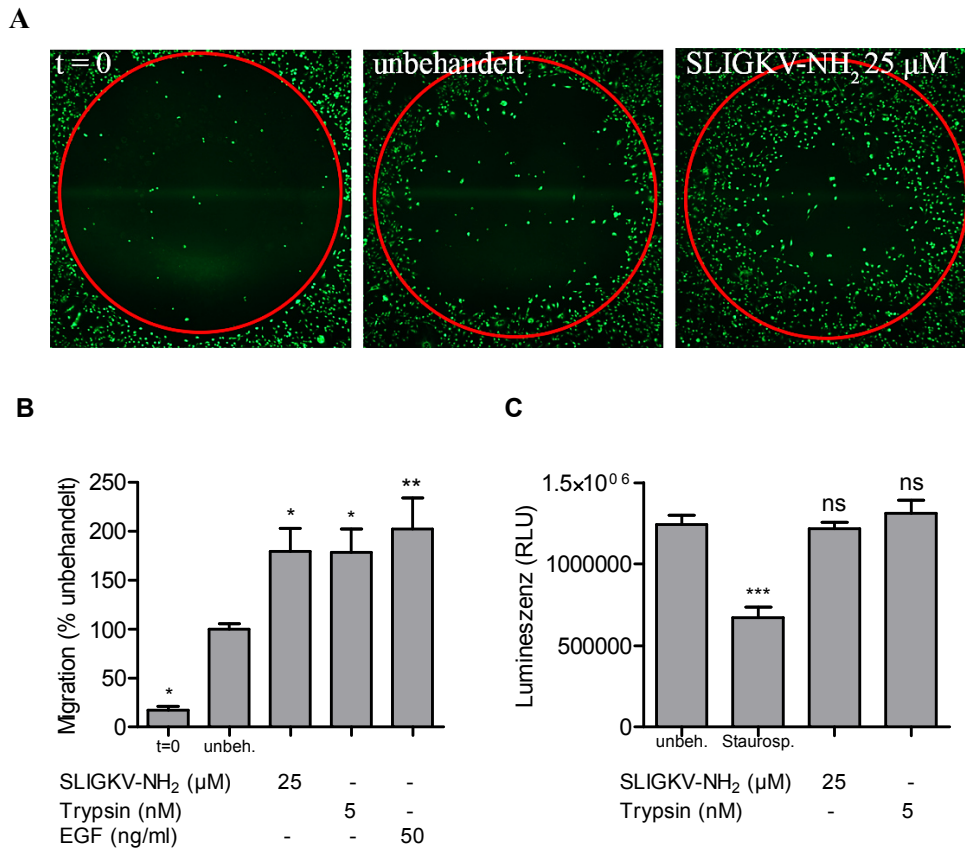


Abbildung IV.13: PAR2 stimulierte Migration von MDA-MB 231

(A) Mikroskopische Aufnahmen Track It™ Green gefärbter MDA-MB 231 Zellen zum Zeitpunkt 0 h (t=0), sowie nach 48 h mit und ohne 25 µM SLIGKV-NH₂. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit Aussaatstoppern ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Stopper wurden nicht-adhärenente Zellen durch einen Waschschritt entfernt. Die Stimulation erfolgte mit 25 µM SLIGKV-NH₂, 5 nM Trypsin und 50 ng/ml EGF (48 h). Die Aufnahme der Bilder erfolgte unter 5-facher Vergrößerung. (B) Quantifizierung der Anzahl migrierter Zellen mittels Partikelanalyse in ImageJ. Die jeweilige basale Migration unbehandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA und dem Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. *P < 0,05, **P < 0,001 versus unbehandelte Probe. (C) Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt. Staurosporin (2µM) diente als Zytotoxizitätskontrolle. Dargestellt sind MW ± SEM aus 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. *P < 0,05, **P < 0,001 versus unbehandelte Probe.***P < 0,0001 versus unbehandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Die Inkubation mit 50 ng/ml EGF resultierte in einer erhöhten Wanderung der Zellen (202 ± 32 %). Das PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ (25 µM) und Trypsin (5 nM) erhöhten die Migrationsaktivität auf 179 ± 23 % und 178 ± 23 %. Um ausschließen zu können, dass der Effekt der PAR2 vermittelten Migration der Zellen nicht proliferationsabhängig ist, wurde parallel unter den gleichen Bedingungen ein Viabilitätstest (CellTiter-Glo® (II.2.2)) durchgeführt. SLIGKV-NH₂ (25 µM) und Trypsin (5 nM) zeigten nach einer Kontaktzeit von 48 h keine signifikante Veränderung in der Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung IV.13 C). Die Stimulation von PAR2 hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum bzw. die Proliferation von MDA-MB 231.

IV.5.2 Rolle der Protein Kinase C in der PAR2 abhängigen Migration

Als Antwort auf die Aktivierung von PAR2 mit PAR2 aktivierendem Peptid und Trypsin konnte in MDA-MB 231 die Ausschüttung von Ca^{2+} und die Stimulierung der Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS nachgewiesen werden. Das Ziel dieses Versuchs war es, die Rolle der PKC in der PAR2 stimulierten Migration anhand des kompetitiven und selektiven PKC Inhibitors Gö6983 zu charakterisieren. Dazu wurden die Zellen mit 100 nM PKC Inhibitor inkubiert und anschließend mit 25 μM SLIGKV-NH₂ stimuliert, um die Migration der Zellen anzuregen (Abbildung IV.14 A).

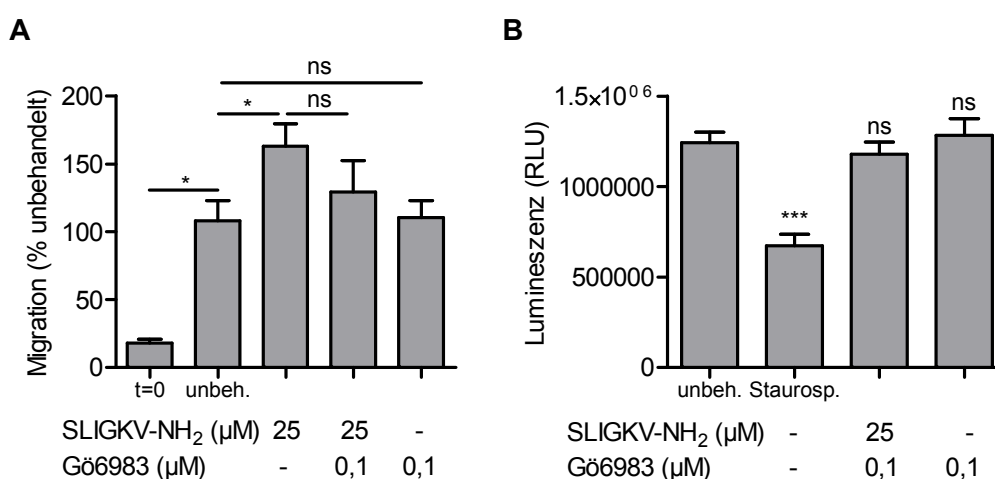


Abbildung IV.14: Testung des PKC Inhibitors Gö6983 in der PAR2 abhängigen Migration

(A) MDA-MB 231 Zellen wurden mit 100 nM PKC Inhibitor 30 min inkubiert und dann mit 25 μM SLIGKV-NH₂ stimuliert (48 h). Die Detektion der migrierten Zellen erfolgte wie zuvor in Abbildung IV.13 dokumentiert. Die jeweilige basale Migration un behandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Tukey's Post-hoc-Test. (B) Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt. Staurosporin (2 μM) diente als Zytotoxizitätskontrolle. Die Anzahl lebender Zellen nach 48 h Kontaktzeit wurde mittels CellTiter-Glo® Reagenz und Detektion der Lumineszenz ermittelt (II.2.2). Dargestellt sind MW \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einfaktoriellen ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die un behandelte Probe. ***P < 0,0001 versus un behandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Gö6983 bewirkte nach 48 h eine leichte Reduzierung der PAR2/SLIGKV-NH₂ abhängigen Migration. Die PAR2 stimulierte Migration wurde durch 100 nM Gö6983 von 163 ± 16 % auf 129 ± 23 % herab gesenkt. Aufgrund stark variierender Daten konnte jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Wurden die Zellen ausschließlich mit Gö6983 inkubiert, hatte dies keine signifikante Auswirkung im Vergleich zu den un behandelten Zellen. Mit Hilfe eines Viabilitätstests wurde überprüft und anhand gleicher Bedingungen gezeigt, dass Gö6983 die Anzahl lebender Zellen nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung IV.14 B).

Der pMARCKS ELISA (s.III.2.6) diente als Kontrolle für die Wirkung des PKC Inhibitors Gö6983 auf die zelluläre Aktivität der PKC in MDA-MB 231. Die SLIGKV-NH₂ (25 μM)

stimulierte und PAR2 abhängige PKC Aktivität wurde mit 100 nM des PKC Inhibitors negativ reguliert (Abbildung IV.15).

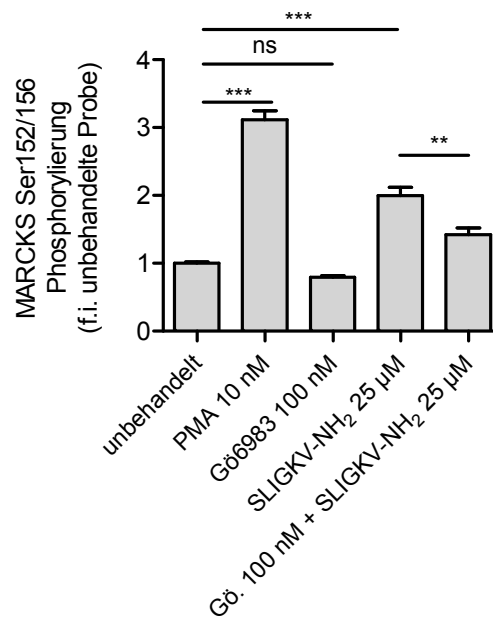


Abbildung IV.15: Einfluss des PKC Inhibitors Gö6983 auf die PAR2 abhängige MARCKS Phosphorylierung

MDA-MB 231 Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70-80 % mit 10 nM PMA als Positivkontrolle, 100 nM Gö6983 und/oder 25 µM SLIGKV-NH₂ 10 min behandelt. Anschließend wurde die Phosphorylierung von MARCKS wie in Abbildung IV.12 beschrieben, detektiert. Das pMARCKS Level in unbehandelten Zellen wurde als Experiment interner Standard normalisiert und gleich 1 gesetzt (f.i. = fold increase). Dargestellt sind die MW ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Tukey's Post-hoc-Test. *P < 0,05, ***P < 0,0001.

Die SLIGKV-NH₂ abhängige Phosphorylierung von MARCKS wurde durch die Behandlung der Zellen mit Gö6983 verringert und von 2 facher Aktivität ($1,99 \pm 0,12$) auf 1,4 fache Aktivität ($1,43 \pm 0,09$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle herabgesetzt. Die basale Phosphorylierung von MARCKS in der unbehandelten Kontrolle war nach Behandlung der Zellen mit Gö6983 nicht signifikant reduziert. Die Ergebnisse des pMARCKS ELISA und der Migrationsstudie zeigten, dass die PAR2 stimulierte PKC Aktivität durch Zugabe des PKC Inhibitors unterdrückt werden konnte, diese Inhibition der PKC sich jedoch nur moderat auf die PAR2 abhängige Migration auswirkte.

In MDA-MB 231 führte die Stimulation von PAR2 mit Trypsin und SLIGKV-NH₂ zu einer gesteigerten Chemokinese der Zellen. Die Untersuchungen mit dem PKC Inhibitor ließen vermuten, dass der klassische G_q gekoppelte Signalweg, der zur Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem ER und der folgenden Aktivierung der PKC führt, nur eine kleine Rolle in der PAR2 stimulierten Chemokinese von MDA-MB 231 spielt.

IV.5.3 Regulation der PAR2 abhängigen Migration über die GTPasen Rac1 und RhoA

Ziel des Versuchs war es, mit Hilfe der Inhibitoren Y27632 und EHop-016 die Regulation der PAR2 abhängigen Migration durch die Rho GTPasen RhoA und Rac1 zu charakterisieren. Zunächst wurde die Auswirkung der Inhibition der RhoA Effektor kinase ROCK auf die PAR2 stimulierte Migration in MDA-MB 231 untersucht (Abbildung IV.16 A). „Rho-associated coiled-coil forming protein kinase“ (ROCK) ist ein Effektorprotein der GTPase RhoA, das eine Schlüsselrolle in der Organisation und Ausbildung von Stressfasern und Adhäsionspunkten spielt (Amano *et al.*, 1997).

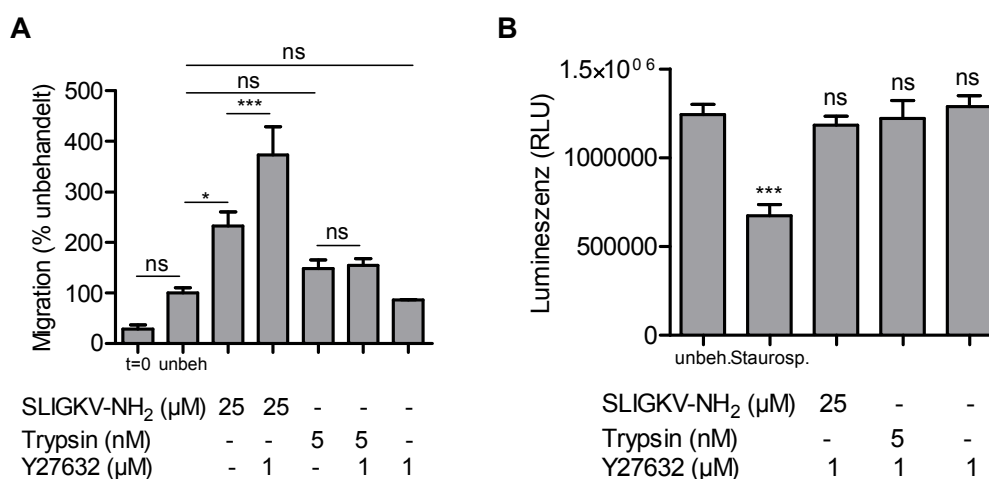


Abbildung IV.16: Testung des ROCK Inhibitors Y27632 in der PAR2 abhängigen Migration

(A) MDA-MB 231 Zellen wurden mit 1 μM ROCK Inhibitor 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 25 μM SLIGKV-NH₂ (48 h). Die Detektion der Zellen erfolgte wie zuvor in Abbildung IV.13 dokumentiert. Die jeweilige basale Migration unbehandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und anschließendem Tukey's Post-hoc-Test. (B) Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt. Staurosporin (2μM) diente als Zytotoxizitätskontrolle. Dargestellt sind MW ± SEM aus 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. ***P < 0,0001 versus unbehandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Nach Inkubation der Zellen mit dem ROCK Inhibitor Y27632 (1 μM) (Ishizaki *et al.*, 2000) wurde ein starker Anstieg der SLIGKV-NH₂ (25 μM) stimulierten Migration von 232 ± 27 % auf 373 ± 55 % detektiert. Im Gegensatz dazu resultierte die Zugabe von 1 μM Y27632 und 5 nM Trypsin in einem nicht signifikanten Anstieg der migratorischen Aktivität (um 15,5 % im Vergleich zur Trypsin stimulierten Migration). Der Inhibitor alleine beeinträchtigte die basale Migration nicht signifikant. Der Viabilitätstest, durchgeführt mit den gleichen Bedingungen konnte zeigen, dass die Kombination von Y27632 und SLIGKV-NH₂ oder Trypsin innerhalb einer Kontaktzeit von 48 h keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von MDA-MB 231 hatte (Abbildung IV.16 B). Dies schließt einen stimulierenden Effekt auf das Zellwachstum aus.

Auch die GTPase Rac1 ist laut verschiedener Studien in die Signalkaskade der PAR2 regulierten Migration involviert (Su *et al.*, 2009). Durch die Inkubation von MDA-MB 231

mit dem spezifischen Rac1 Inhibitor EHop-016 (2 μ M) (Montalvo-Ortiz *et al.*, 2012) konnte die PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ (25 μ M) sowie die Trypsin (5 nM) stimulierte Migration auf das Level der basalen Migration herabgesenkt werden (Abbildung IV.17).

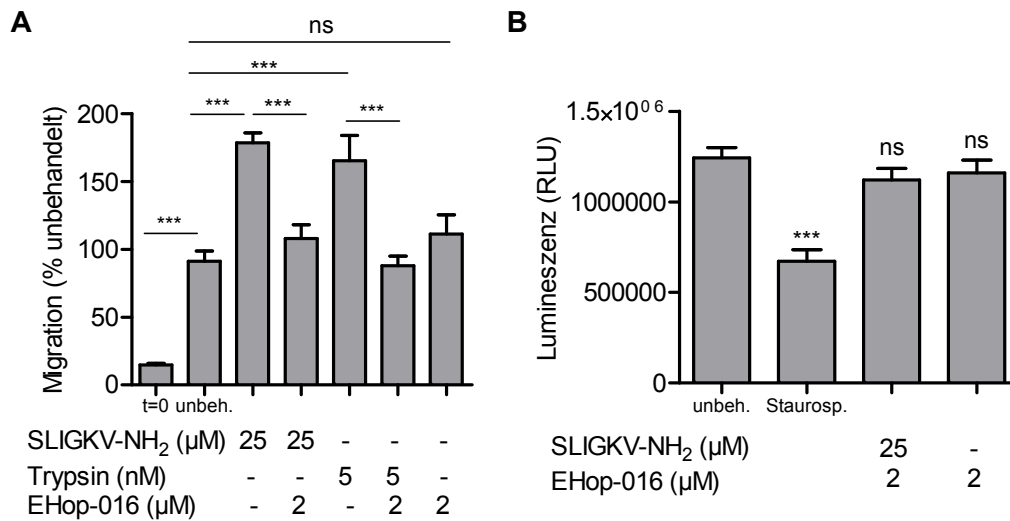


Abbildung IV.17: Testung des Rac1 Inhibitors EHop-016 in der PAR2 abhängigen Migration

(A) MDA-MB 231 Zellen wurden mit 2 μ M Rac1 Inhibitor 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 25 μ M SLIGKV-NH₂ (48 h). Die Detektion der Zellen erfolgte wie zuvor in Abbildung IV.13 dokumentiert. Die jeweilige basale Migration unbehandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und anschließendem Tukey's Post-hoc-Test. (B) Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt. Staurosporin (2 μ M) diente als Zytotoxizitätskontrolle. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. ***P < 0,0001 versus unbehandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Die PAR2 Peptid stimulierte Migration wurde mit EHop-016 auf 108 ± 10 % und die Trypsin stimulierte Migration auf $87,7 \pm 7,4$ % herab gesenkt. Der Inhibitor EHop-016 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale migratorische Aktivität der Zellen. Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Die Inkubation mit dem Rac1 Inhibitor bewirkte eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Reduzierung der Anzahl lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (Abbildung IV.17 B).

Die Experimente zur Charakterisierung der Rolle der Rho GTPasen RhoA und Rac1 konnten zeigen, dass die PAR2 stimulierte Migration 1) durch die Inhibition der kleinen GTPase Rac1 signifikant unterdrückt wurde, jedoch 2) durch die Inhibition der RhoA Effektorkinase ROCK1/2 verstärkt wurde.

IV.6 Inhibition der PAR2 stimulierten Migration durch Teleocidin A2

Teleocidin A2 antagonisiert spezifisch die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung in den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und A549. Mit Hilfe des Migrationsassay sollte untersucht werden, ob zusätzlich die PAR2 abhängige Migration durch Teleocidin A2 unterdrückt

werden kann. Dazu wurde die Inhibition der PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ sowie der Protease Trypsin aktivierten Migration von MDA-MB 231 untersucht (Abbildung IV.18A).

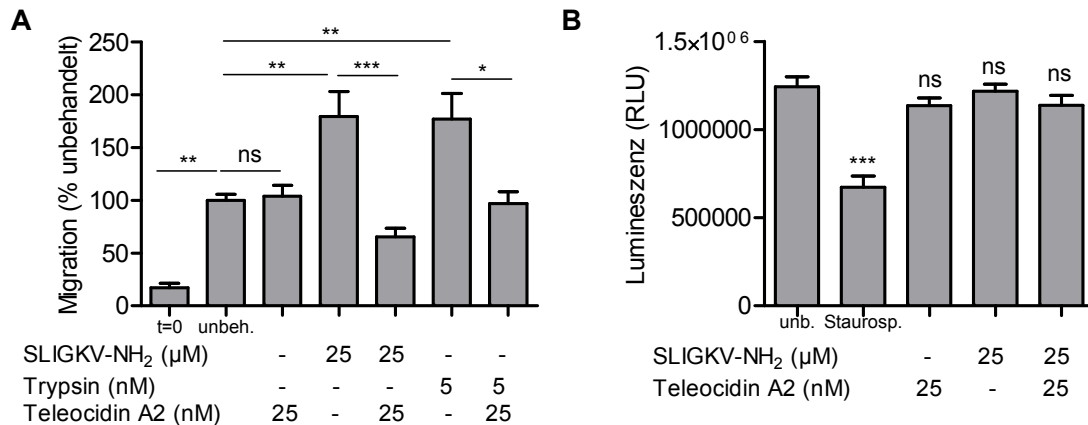


Abbildung IV.18: Testung von Teleocidin A2 in der PAR2 abhängigen Migration

(A) MDA-MB 231 Zellen wurden mit 25 nM Teleocidin A2 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 25 μM SLIGKV-NH₂ oder 5 nM Trypsin (48 h). Die Detektion erfolgte wie zuvor in Abbildung IV.13 dokumentiert. Die jeweilige basale Migration unbehandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Tukey's Post-hoc-Test. (B) Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt, Staurosporin diente als Zytotoxizitätskontrolle. Dargestellt sind MW ± SEM aus 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. *P < 0,05, ***P < 0,0001 versus unbehandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Die Behandlung der Zellen mit 25 nM Teleocidin A2 reduzierte die SLIGKV-NH₂ (25 μM) stimulierte Migration auf 65,5 ± 8,0 % der basalen Migration. Auch die Trypsin (5 nM) stimulierte Migration konnte mit Teleocidin A2 (25 nM) inhibiert werden (auf 96,8 ± 11,4 %). Teleocidin A2 beeinflusste die basale Migration der MDA-MB 231 Zellen bei alleiniger Inkubation nicht signifikant (104 ± 10 %).

Um ausschließen zu können, dass der inhibitorische Effekt auf die PAR2 vermittelte Migration nicht auf einem zytotoxischen Effekt beruht, der in einer Reduzierung der lebenden Zellen resultiert, wurde parallel unter den gleichen Bedingungen ein Viabilitätstest durchgeführt. Nach einer Kontaktzeit von 48 h zeigte 25 nM Teleocidin A2 keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der lebenden Zellen. Die Luciferaseaktivität (RLU) unbehandelter Zellen betrug 1,24x10⁶ RLU und die Teleocidin A2 und/oder SLIGKV-NH₂ behandelte Zellen 1,14x10⁶ RLU. Dagegen reduzierte das Apoptose auslösende und Proteinkinase inhibierende Alkaloid Staurosporin die Viabilität der MDA-MB 231 Zellen auf etwa 6,73x10⁵ RLU (Abbildung IV.18 B).

Zur Untersuchung der Spezifität von Teleocidin A2 auf die PAR2 stimulierte Migration wurde der Naturstoff gegen die durch den Wachstumsfaktor EGF aktivierte Migration getestet. EGF stimulierte die Migration der MDA-MB 231 Zellen signifikant (202 ± 31 %). Die Inkubation mit Teleocidin A2 bewirkte jedoch vergleichbar mit der Inhibition der PAR2

abhängigen Migration eine Reduzierung der Migration auf $96,3 \pm 12,3$ % der basalen Migration (Abbildung IV.19A).

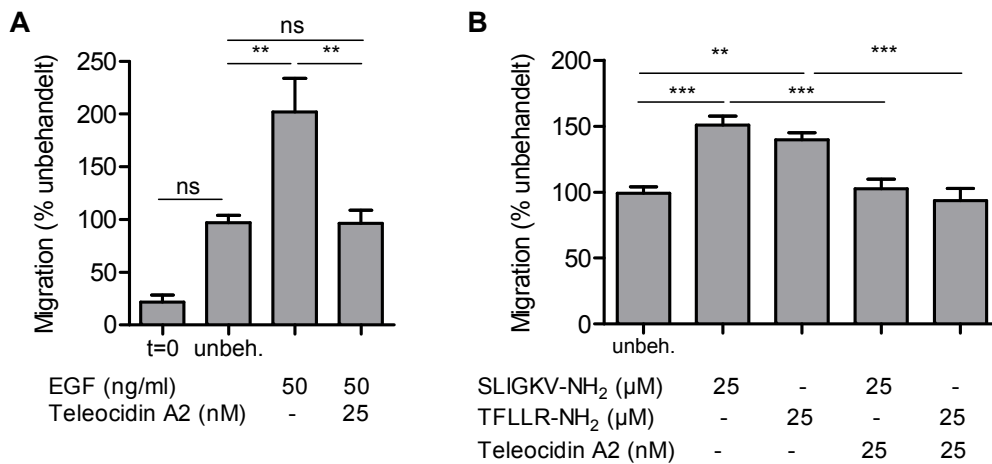


Abbildung IV.19: Testung von Teleocidin A2 in der EGF und PAR1 abhängigen Migration

(A) MDA-MB 231 Zellen wurden mit 25 nM Teleocidin A2 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 50 ng/ml EGF (48 h) (A) oder mit 25 µM SLIGKV-NH₂ bzw. mit 25 µM TFLLR-NH₂ (48 h) (B). Die Detektion der Zellen erfolgte wie zuvor in Abbildung IV.13 dokumentiert. Die jeweilige basale Migration un behandelter Zellen wurde für jedes unabhängige Experiment gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus drei (A) bzw. sechs (B) unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Tukey's Post-hoc-Test. **P < 0,001, ***P < 0,0001, ns nicht statistisch signifikant.

Zur Evaluierung der spezifischen Aktivität von Teleocidin A2 hinsichtlich der Migration sollte weiterhin untersucht werden, ob 1) die Migration von MDA-MB 231 über PAR1 angeregt werden kann und wenn dies der Fall ist, 2) Teleocidin A2 eine inhibitorische Wirkung auf die PAR1 stimulierte Migration hat. Abbildung IV.19 B zeigt die Aktivierung der PAR1 stimulierten Migration mit 25 µM PAR1 Peptid TFLLR-NH₂ im Vergleich zur Stimulation mit PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂. Die PAR2 stimulierte Migration war in dieser Versuchsreihe auf 150 ± 7 % und die PAR1 stimulierte Migration auf 140 ± 5 % im Vergleich zur basalen Migration erhöht. Die Inkubation mit Teleocidin A2 bewirkte eine Reduzierung der PAR1 stimulierten Migration auf $93,6 \pm 8,9$ % der basalen Migration. Dieser inhibitorische Effekt war vergleichbar mit der Inhibition der PAR2 stimulierten Migration.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass Teleocidin A2 die Migration von MDA-MB 231, stimuliert über die zwei strukturell verschiedenen PAR2 Agonisten SLIGKV-NH₂ und Trypsin, wirksam inhibieren konnte. Jedoch konnte der Migrationsassay keine spezifische Wirkung von Teleocidin A2 auf die PAR2 abhängige Migration nachweisen. Die PAR1 sowie die EGF stimulierte Migration war nach Inkubation der Zellen mit Teleocidin A2 verringert. Bei genauerer Beobachtung der mit Teleocidin A2 behandelten MDA-MB 231 Zellen unter dem Mikroskop fiel eine veränderte Morphologie der Zellen auf. Um diesen beobachteten Effekt genauer zu evaluieren, wurden nachfolgend Versuche zur Visualisierung der Aktinstrukturen nach Inkubation der Zellen mit Teleocidin A2 durchgeführt.

IV.7 Einfluss von PAR2 und Teleocidin A2 auf das Aktinzytoskelett

Die PAR2 abhängige Chemokinese von MDA-MB 231 stimuliert durch SLIGKV-NH₂ und Trypsin konnte anhand des Migrationsassays nachgewiesen werden und wurde in Kapitel III.5.1 ausführlich behandelt. Die Experimente zur Charakterisierung der Rolle der Rho GTPasen RhoA und Rac1 zeigten außerdem, dass die PAR2 stimulierte Migration durch die Inhibition der kleinen GTPase Rac1 signifikant unterdrückt wurde, jedoch durch die Inhibition der RhoA Effektor kinase ROCK1/2 verstärkt wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass PAR2 Mitglieder aus der Superfamilie der kleinen GTPasen reguliert (Greenberg *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2009).

Die Versuche zur Färbung der Aktinstrukturen in MDA-MB 231 dienten 1) der Charakterisierung des Effekts einer PAR2 Stimulation mit SLIGKV-NH₂ auf die Umordnung des Aktinzytoskeletts unter Anwendung der Inhibitoren Y27632 und EHop-016 sowie 2) der Untersuchung des Effekts von Teleocidin A2. Die Färbung von F-Actin erfolgte mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt an Phalloidin (II.2.8). Zur Lokalisierung des Zellkerns wurde die DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole) gefärbt.

IV.7.1 PAR2 stimulierte Reorganisation der Aktinfasern in MDA-MB 231

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) fördert die Migration von MDA-MB 231 (IV.6) und wurde in diesem Experiment als Kontrolle für die GTPase regulierte Umordnung des Aktinzytoskeletts verwendet. EGF reguliert die kleinen GTPasen Rac1, Cdc42 und nachgeschaltet RhoA (Ridley *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 2003). Die Behandlung mit EGF (50 ng/ml, 30 min) führte zu einer Umordnung der Aktinfilamente an der Zellmembran (Abbildung IV.20). Zu erkennen waren Lamellipodien aus polymerisierten, netzartig angeordneten Aktinfasern am Leitsaum (engl. leading edge) der Zelle und formierte Stressfasern im hinteren Zellkörper. Diese Aktinanordnung wurde in mehreren Zellen beobachtet und lässt auf migrierende Zellen durch die Stimulation mit EGF schließen. Der Rho Aktivator Calpeptin wurde als weitere Kontrolle für die GTPase regulierte Umordnung des Aktinzytoskeletts verwendet (Abbildung IV.20). Calpeptin aktiviert RhoA, RhoB und RhoC in unterschiedlichen Zelltypen und fördert die Ausbildung von Stressfasern (Schoenwaelder und Burridge, 1999). In der Zelllinie MDA-MB 231 resultierte die Behandlung mit Calpeptin (0,1 mg/ml) in einer erhöhten Anzahl an Zellen mit dünnen und länglichen Aktinfilamentbündeln an der Zellmembran, sogenannten Filopodien.

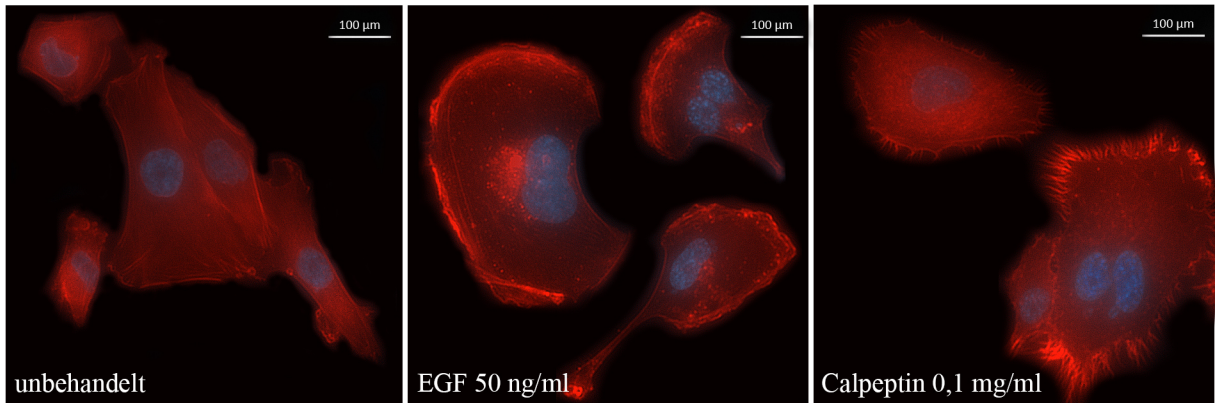


Abbildung IV.20: Effekt von EGF und Calpeptin auf das Actinzytoskelett von MDA-MB 231

Die Zellkulturen wurden mit 50 ng/ml EGF und 0,1 mg/ml Calpeptin 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend fixiert und mit Alexa Fluor 546 Phalloidin und DAPI gefärbt. Unbehandelte Zellen wurden zur Kontrolle mit DMSO (0,5%) behandelt. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und 40-100 facher Vergrößerung. Abgebildet ist ein beispielhaftes Resultat.

Abbildung IV.21 dokumentiert den Effekt der Stimulation von PAR2 mit SLIGKV-NH₂ auf MDA-MB 231, sowie die Auswirkung einer Inhibition von ROCK1/2 mit Y27632 oder Rac1 mit EHop-016 auf die PAR2 regulierte Aktinreorganisation.

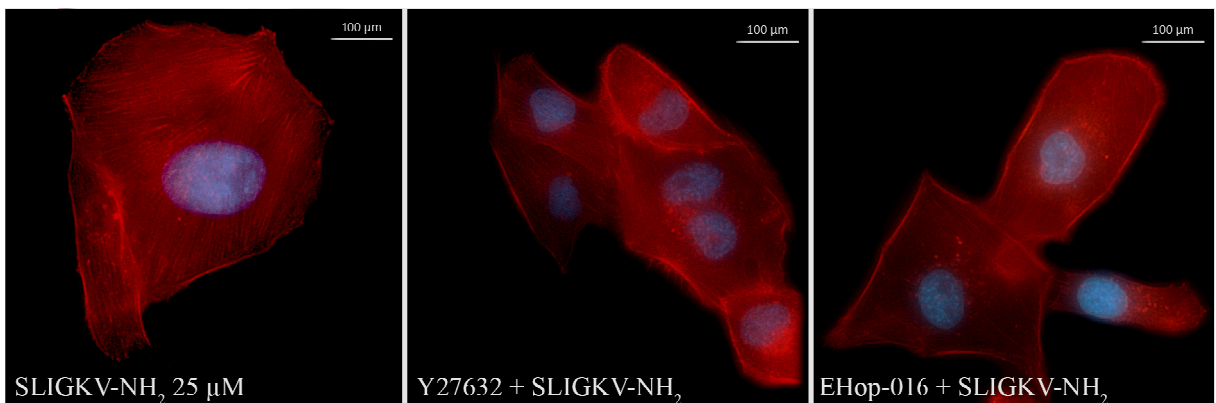


Abbildung IV.21: PAR2 stimulierte Umordnung des Aktinzytoskeletts in MDA-MB 231

Die Zellkulturen wurden mit 25 µM SLIGKV-NH₂ sowie 1 µM Y27632 90 min oder mit 2 µM EHop-016 30 min und anschließender Stimulation mit 25 µM SLIGKV-NH₂ 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend fixiert und mit Alexa Fluor 546 Phalloidin und DAPI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und 40-100 facher Vergrößerung. Abgebildet ist ein beispielhaftes Resultat.

Die Stimulation von MDA-MB 231 mit 25 µM SLIGKV-NH₂ (30 min) resultierte in einer veränderten Struktur der Aktinfasern. Zu beobachten war eine Zunahme der Anzahl an Stressfasern in etwa in der Hälfte der Zellen, was darauf hindeutete, dass PAR2 Einfluss auf das Aktinzytoskelett haben könnte. Wurden die Zellen vor der Stimulation mit SLIGKV-NH₂ (30 min), mit einem der beiden Inhibitoren Y27632 (1 µM, 60 min) oder EHop-016 (2 µM, 30 min) behandelt, nahm die Anzahl der Zellen mit ausgeprägten Stressfasern ab. Die durch SLIGKV-NH₂ ausgelöste Anordnung des Aktins in den Zellen konnte durch die Inhibitoren unterdrückt werden. EHop-016 ist ein spezifischer Inhibitor der GTPase Rac1 und Y27632

ein Inhibitor des RhoA Effektorproteins ROCK, das maßgeblich an der Formierung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten beteiligt ist.

Anhand der Anfärbung der Aktinfasern von MDA-MB 231 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von PAR2 als eine weitere Zellantwort die Umordnung der Aktinstrukturen im Zytoskelett bewirkt. Die als Folge der Inhibition von Rac1 und ROCK1/2 reduzierte Anzahl an ausgeprägten Stressfasern durch SLIGKV-NH₂, deutete weiterhin darauf hin, dass der PAR2 stimulierte Effekt auf das Aktinzytoskelett Rac1 und/oder RhoA abhängig reguliert wird.

IV.7.2 Teleocidin A2 abhängige Reorganisation der Aktinfasern in MDA-MB 231

In III.6.3 konnte die Inhibition der PAR2 stimulierten Migration durch Teleocidin A2 gezeigt werden. Bei genauerer Beobachtung von MDA-MB 231 unter dem Mikroskop fiel eine veränderte Morphologie der Zellen auf, die mit Teleocidin A2 inkubiert wurden. Dieser Versuch diente der Beantwortung der Frage, ob Teleocidin A2 die Anordnung der Aktinfasern in der Zelle beeinflusst und wie sich die Substanz hinsichtlich PAR2 abhängiger Reorganisation der Aktinfilamente verhält (Abbildung IV.22).

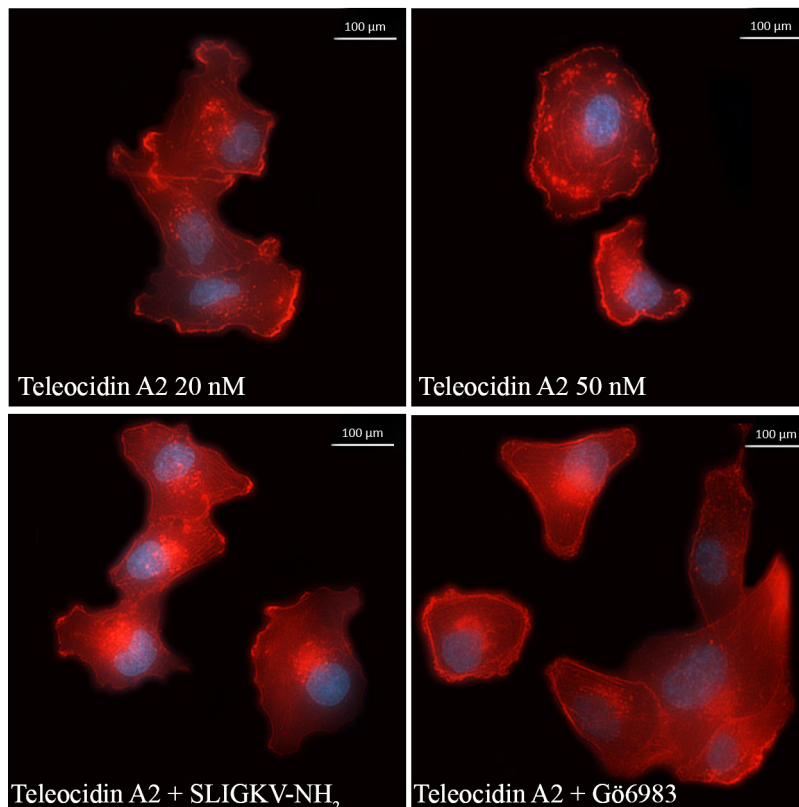


Abbildung IV.22: Effekt von Teleocidin A2 auf das Actinzytoskelett von MDA-MB 231

Die Zellkulturen wurden mit 20 und 50 nM Teleocidin A2 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Teleocidin A2 (20 nM, 30 min) zu den Zellen wurden diese mit SLIGKV-NH₂ stimuliert. Die Behandlung der Zellen mit Gö6983 (100 nM) erfolgte vor Zugabe von Teleocidin A2 (20 nM) zu den Zellen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Alexa Fluor 546 Phalloidin und DAPI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und 40-100 facher Vergrößerung. Abgebildet ist ein beispielhaftes Resultat.

Bei Behandlung mit 20 nM Teleocidin A2 war nach 10 und 30 min, sowie nach 2 h eine signifikante Veränderung in der Anordnung der Aktinfasern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Telocidin A2 (20 nM) führte in 80-90 % der Zellen zu einer insgesamt stärkeren lokalen Konzentration der Aktinfasern. Vor allem im Bereich der gesamten Zellmembran kam es zu einer verstärkten Anreicherung von Aktinfasern und Membranausstülpungen. Durch 50 nM Teleocidin A2 konnte der Effekt verstärkt werden. Es kam zusätzlich zu einer punktförmigen Konzentrierung des Aktins verteilt im Zytoplasma. Die zuvor beschriebene PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ abhängige Organisation des Aktinzytokeletts war durch vorausgehende Inkubation mit 20 nM Teleocidin A2 nicht zu erkennen. Stattdessen war der gleiche beschriebene Effekt wie bei der alleinigen Behandlung der Zellen mit Teleocidin A2 zu beobachten.

Mit dem Ziel, die Rolle der PKC in der Teleocidin A2 aktivierten Reorganisation der Aktinfasern zu charakterisieren, wurden Untersuchungen mit dem PKC Inhibitor Gö6983 durchgeführt. Gö6983 wurde in drei Konzentrationen (1, 10, 100 nM) zu den Zellen gegeben (15 min) und die Zellen anschließend mit 20 nM Teleocidin A2 (30 min) behandelt. Dokumentiert in Abbildung IV.22 ist der Effekt von 100 nM Gö6983 auf die Teleocidin A2 abhängige Aktinanordnung, die Daten für 1 und 10 nM sind nicht gezeigt. Der PKC Inhibitor beeinflusste die durch Teleocidin A2 veränderte Anordnung der Aktinfasern konzentrationsabhängig. Diese Beobachtung wies darauf hin, dass die Reorganisation der Aktinstruktur durch Teleocidin A2 möglicherweise ein nachgeschalteter Effekt der PKC Aktivierung durch Teleocidin A2 in MDA-MB 231 sein könnte.

Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen, dass Teleocidin A2 einen starken Effekt auf die Anordnung der Aktinstrukturen im Zytoskelett von MDA-MB 231 ausübt, der sich vor allem in lokalen Aktinverdichtungen im Bereich der Plasmamembran äußerte. Teleocidin A2 unterdrückte die PAR2 abhängige Ausprägung von Stressfasern, zeigte jedoch in Kombination mit PAR2 aktivierendem Peptid SLIGKV-NH₂ sowie alleine den gleichen Effekt auf die Aktinfaseranordnung.

IV.8 Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung PAR2 inhibierender Teleocidine und Indolactam Derivate

Der Naturstoff Teleocidin A2 zeigte eine potente und spezifische Inhibition der G_q Protein gekoppelten und PAR2 abhängigen Freisetzung von Ca^{2+} in den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und A549 (IV.2.1). Im Vergleich zu den G_q gekoppelten Rezeptoren, PAR1 und P2Y, konnte die PAR2 regulierte Ca^{2+} Ausschüttung mit signifikant höherer Wirkung unterdrückt werden, sodass vermutet wurde, dass Teleocidin A2 mit PAR2 eine spezifische Interaktion eingeht. Ein Ligandenbindungstest zeigte jedoch, dass Teleocidin A2 nicht mit dem PAR2 aktivierenden Liganden an seiner orthosterischen Bindestelle konkurriert. Teleocidin A2 stimulierte außerdem die Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS in MDA-MB 231. Dieses Ergebnis stimmt mit bekannten Daten aus der Literatur überein.

Die hier durchgeführten Experimente dienten der Untersuchung einer strukturabhängigen Wirkung PAR2 inhibierender Teleocidine und chemisch neu synthetisierter Indolactam V Derivate. Untersucht werden sollte, ob Verbindungen aus der Klasse der Teleocidine eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) hinsichtlich der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung zeigen. Zur Ermittlung der Spezifität wurden anschließend ausgewählte Verbindungen, die eine potente Wirkung zeigten, hinsichtlich ihrer Wirkung auf PAR1 oder P2Y untersucht. Indolactam V entspricht dem Grundgerüst der Teleocidine und wurde als Leitstruktur für die Synthese und Entwicklung neuer, potenziell PAR2 selektiver Verbindungen gewählt. Chemisch neu synthetisierte und derivatisierte Indolactame sollten auf ihre Wirksamkeit und Spezifität gegenüber PAR2 getestet werden.

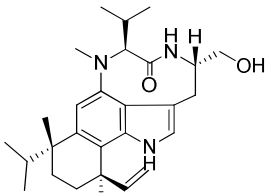
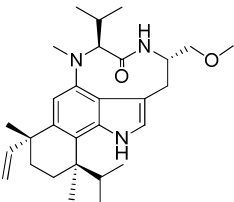
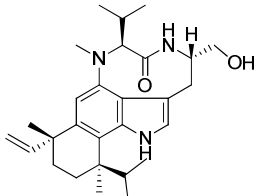
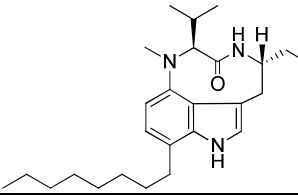
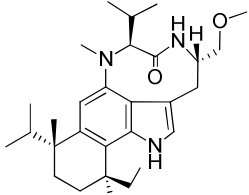
Potente Teleocidin und Indolactam Derivate sollten anschließend auf ihre PKC aktivierende Wirkung untersucht werden, um zu charakterisieren, ob eine Reduzierung der PKC stimulierenden Aktivität bei gleichbleibender Wirkung auf PAR2 durch strukturelle Veränderungen am Molekülgrundgerüst erreicht werden kann.

IV.8.1 Wirkung von Teleocidinen auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Ausschüttung

Zur Charakterisierung der Wirkung und Spezifität der Teleocidin Derivate auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung wurden diese im Ca^{2+} Mobilisierungsassay gegen das PAR2 aktivierende Peptid, SLIGKV-NH₂, das PAR1 aktivierende Peptid TFLLR-NH₂ oder gegen ATP bei EC₅₀ in MDA-MB 231 getestet. Mit Hilfe dieses zellbasierten Assays konnte in den Kapiteln IV.2.1 und IV.2.2 gezeigt werden, dass Teleocidin A2 spezifisch die PAR2 induzierte Ca^{2+} Mobilisierung, ausgelöst durch SLIGKV-NH₂ und Trypsin, inhibiert.

Anhand der Experimente zur Inhibition der TFLLR-NH₂/PAR1 oder ATP/P2Y vermittelten Ca²⁺ Mobilisierung sollte evaluiert werden, ob die für Teleocidin A2 beobachtete Spezifität auch auf andere, ausgewählte Derivate aus der Substanzklasse der Indolalkaloide übertragbar ist. Die ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) der Teleocidine (nachfolgend aufgeführt als IMD1-10), für die Inhibition der PAR2, P2Y und PAR1 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung sind in Tabelle IV.3 zusammengefasst.

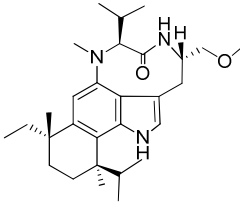
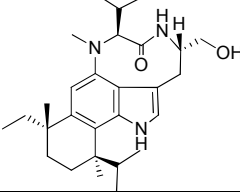
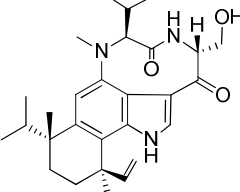
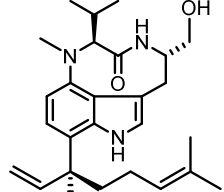
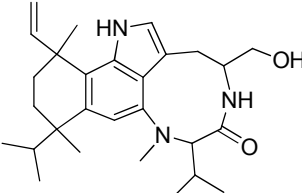
Tabelle IV.3: Teleocidin Derivate unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit und Spezifität in der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Ausschüttung

ID	Name	Struktur	IC ₅₀ PAR2 (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ P2Y (MW ± SEM; n ≥ 3) ¹³	IC ₅₀ PAR1 (MW ± SEM; n ≥ 3) ¹⁴
IMD1	Teleocidin B4 C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂		16,9 ± 2,5 nM (n=3)	87,4 ± 13,3 nM (* (n=3)	33,4 ± 10,1 nM (ns) (n=3)
IMD2	Olivoretin C C ₂₉ H ₄₃ N ₃ O ₂		> 1 μM (n=3)	> 10 μM (n=3)	<i>n.b.</i>
IMD3	O- Demethyl- olivoretin C C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂		28,1 ± 4,6 nM (n=3)	470 ± 65 nM (** (n=3)	33,7 ± 10,8 nM (ns) (n=3)
IMD4	7-Octyl- indolactam V C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₂		>200 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
IMD5	Olivoretin C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₂		>500 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>

¹³ Die Daten zur Inhibition der P2Y abhängigen Ca²⁺ Freisetzung wurden von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

¹⁴ Die Daten zur Inhibition der PAR1 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung wurden von Ina-Maria Albrecht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

Ergebnisse

ID	Name	Struktur	IC ₅₀ PAR2 (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ P2Y (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ PAR1 (MW ± SEM; n ≥ 3)
IMD6	Olivoretin C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₂		> 1 μM (n=3)	> 10 μM (n=3)	<i>n.b.</i>
IMD7	Teleocidin B C ₂₈ H ₄₃ N ₃ O ₂		4,29 ± 0,99 nM (n=3)	18,0 ± 2,5 nM (**) (n=3)	11,9 ± 2,8 nM (ns) (n=3)
IMD8	8-oxo- Teleocidin B C ₂₈ H ₃₉ N ₃ O ₃		>400 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
IMD9	Teleocidin A2 C ₂₇ H ₃₉ N ₃ O ₂		18,1 ± 1,7 nM (n=9)	182 ± 82 nM (ns) (n=3)	371 ± 58 nM (**) (n=5)
IMD 10	Teleocidin B (nicht- definiertes Epimer) C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₂		33,2 ± 6,5 nM (n=3)	164 ± 34 nM (*) (n=3)	<i>n.b.</i>

Zur Bestimmung der IC₅₀ der PAR2, P2Y oder PAR1 Rezeptor abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung in MDA-MB 231 wurden steigende Konzentrationen des jeweiligen Teleocidin Derivats gegen die EC₅₀ von SLIGKV-NH₂, ATP oder TFLLR-NH₂ im Ca²⁺ Indikatorassay getestet. Dargestellt sind MW ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Triplikaten. n, Anzahl der unabhängigen Experimente. *n.b.*, nicht bestimmt. Fett hervorgehobene Resultate kennzeichnen potente (<30 nM) und spezifische Derivate. Die statistische Analyse der Spezifität einzelner Derivate erfolgte anhand eines ungepaarten Student's t-Test. *P < 0,05, **P < 0,001. ns, nicht statistisch signifikant.

Das Ausgangsderivat Teleocidin A2 (**IMD9**) inhibierte die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung potent mit einer IC₅₀ von **18 nM**. Die Verbindungen **2** und **6** sind Olivoretine, bei denen die Hydroxygruppe am C₁₄ durch eine Methoxygruppe ersetzt ist. Sie zeigten eine stark verringerte inhibitorische Aktivität gegenüber PAR2 mit einer IC₅₀ > 1 μM. Die hinsichtlich PAR2 unwirksamen Verbindungen **IMD2** und **6** zeigten ebenso keine Wirkung bezüglich der Inhibition der P2Y, ATP stimulierten Ca²⁺ Mobilisierung in MDA-MB 231 Zellen (IC₅₀ > **10 μM**). Aus diesem Grund wurden sie nicht gegen PAR1 getestet. Die Aktivität von **IMD5**, ebenfalls ein Olivoretin mit einer Methoxygruppe an C₁₄, lag im dreistellig nanomolaren Bereich (> **500 nM**). **IMD8** ist ein Teleocidin der B-Reihe, das am C₈

mit einer zusätzlichen Carbonylgruppe substituiert ist. Es zeigte eine inhibitorische Wirkung $> 400 \text{ nM}$. Bei **IMD4** ($\text{IC}_{50} > 200 \text{ nM}$) handelt es sich um das synthetische 7-Octyl-indolactam V, substituiert mit einer Hydroxygruppe am C_{14} und einem hydrophoben Heptylrest an C_7 . Die Derivate **IMD1**, **3**, **7** und **10** inhibierten die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung im zweistellig nanomolaren Bereich und ihre Wirkung war vergleichbar mit der von Teleocidin A2. **IMD1**, **7** und **10** sind Teleocidine der B Reihe und bei **IMD3** handelt es sich um O-Demethylolivoretin C, das am C_{14} anstatt einer Methoxy- eine Hydroxygruppe besitzt.

Die IC_{50} der Verbindungen **IMD1**, **3**, **7** und **9** für die Inhibition der P2Y Rezeptor vermittelten Ca^{2+} Freisetzung korrelierten nicht mit den IC_{50} für die Inhibition des PAR2 induzierten Ca^{2+} Signals. Dies bedeutet, dass die Spanne zwischen IC_{50} PAR2-SLIGKV- NH_2 abhängige versus IC_{50} P2Y-ATP abhängige Ca^{2+} Mobilisierung bei den Verbindungen **IMD3** ($\Delta \text{IC}_{50} 442 \text{ nM}$) und **9** ($\Delta \text{IC}_{50} 161 \text{ nM}$) größer war als bei den Verbindungen **IMD10** ($\Delta \text{IC}_{50} 131 \text{ nM}$), **1** ($\Delta \text{IC}_{50} 87 \text{ nM}$) und **7** ($\Delta \text{IC}_{50} 14 \text{ nM}$). Ebenso waren Unterschiede in der Inhibition der PAR1 abhängigen Antwort zu beobachten. **IMD1**, **3** und **7** (IC_{50} PAR1: 33 nM ; 34 nM ; 12 nM) inhibierten PAR1 weitaus potenter als Teleocidin A2 ($\text{IC}_{50} 371 \text{ nM}$) und zeigten im Gegensatz zu Teleocidin A2 keinen eindeutigen spezifischen Effekt für PAR2.

Die Teleocidin Derivate zeigten eine Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung abhängig von ihrer Struktur. Teleocidin A2 (**IMD9**), Teleocidin B4 (**IMD1**), ein weiteres Teleocidin B (**IMD7**) und O-Demethyl-olivoretin C (**IMD3**) wurden als potenteste Verbindungen für die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung charakterisiert. Ihre Gemeinsamkeit ist eine freie Hydroxygruppe am C_{14} , die für die biologische Aktivität essenziell zu sein scheint. Teleocidin A2, mit offener terpenoider Seitenkette, war die spezifischste Verbindung in Bezug auf die Inhibition von PAR2. Die B-Teleocidine, bei denen die terpenoide Seitenkette zu einem Ring geschlossen ist, inhibierten PAR2 weniger spezifisch und zeigten keinen eindeutigen Unterschied für die Inhibition von PAR1 und PAR2.

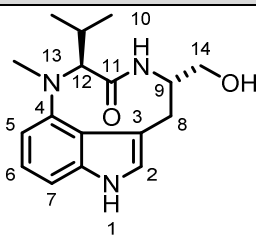
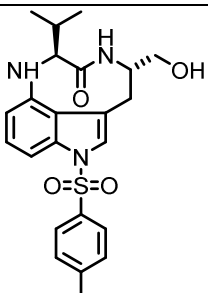
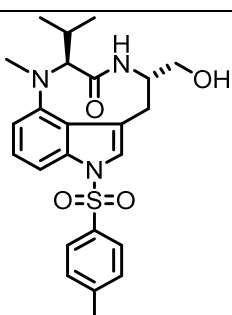
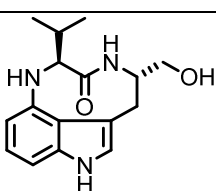
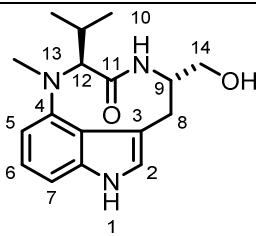
IV.8.2 Wirkung von Indolactam V und Indolactam Derivaten auf die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung

Das Ziel der Versuche war die Charakterisierung der Wirkung von Indolactam V (IL-V) und Indolactam V Derivaten auf die PAR2 abhängige Ca²⁺ Ausschüttung und die Evaluierung der Spezifität. Die Eigenschaft verschiedener Verbindungen aus der Naturstoffklasse der Teleocidine, die PAR2 vermittelte Ca²⁺ Ausschüttung in MDA-MB 231 potent, spezifisch und strukturabhängig zu inhibieren, war der Ausgangspunkt für die chemische Synthese neuer Derivate. IL-V entspricht dem Grundgerüst der Teleocidine und diente als Leitstruktur für die Derivatisierung neuer, Teleocidin verwandter IL-V Derivate¹⁵. Anhand der Untersuchungen zur strukturabhängigen Wirkung der Teleocidine konnte eine freie Hydroxygruppe am C₁₄ des Moleküls als essentielle Gruppe für die biologische Wirksamkeit identifiziert werden. Ansatzpunkte für die Substitution an Indolactam V waren daher der Stickstoff an Position 13 (N₁₃), sowie der Stickstoff an Position 1 (N₁) (s. Tabelle IV.4).

Zur Charakterisierung der Wirkung von Indolactam V (IL-V) und der IL-V Derivate auf die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung wurden diese zunächst im Ca²⁺ Mobilisierungsassay gegen das PAR2 aktivierende Peptid, SLIGKV-NH₂ (EC₅₀ 7,5 µM) in MDA-MB 231 getestet (II.2.1). Anhand der Experimente zur Inhibition der TFLLR-NH₂/PAR1 oder ATP/P2Y vermittelten Ca²⁺ Mobilisierung sollte evaluiert werden, ob die für bestimmte Teleocidin Derivate ermittelte Spezifität auch auf potente, chemisch synthetisierte IL-V Derivate zutrifft. Die ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) der IL-V Derivate mit der ID JES, nachfolgend im Text aufgeführt als dreistellige Ziffer, für die Inhibition der PAR2, P2Y und PAR1 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung sind in Tabelle IV.2 zusammengefasst.

¹⁵ Die Synthese von Indolactam V und Indolactam V Derivaten wurde von Jan Erik Stein im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz am Institut für Organische Chemie an der Universität zu Köln durchgeführt.

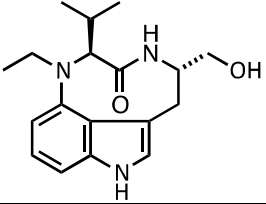
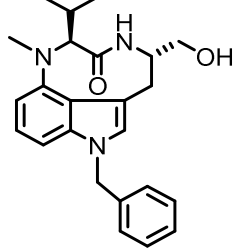
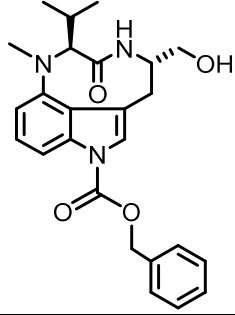
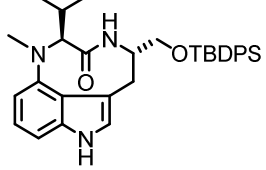
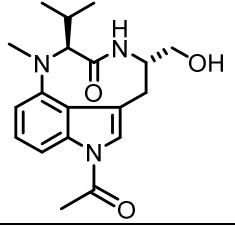
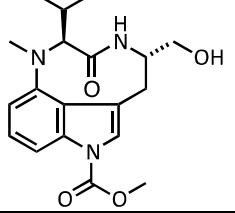
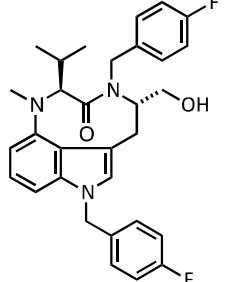
Tabelle IV.4: Indolactam V Derivate unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit und Spezifität in der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Ausschüttung

ID	Summenformel/ Masse [g/mol]	Substanz	IC ₅₀ PAR2 (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ P2Y (MW ± SEM; n ≥ 3) ¹⁶	IC ₅₀ PAR1 (MW ± SEM; n ≥ 3) ¹⁷
JES313	Indolactam V C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₂ 301,38 g/mol		104 ± 34 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES303	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₄ S 441,54 g/mol		> 1 μM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES305	C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₄ S 455,57 g/mol		791 ± 48 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES307	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₂ 287,36 g/mol		> 1 μM (n=3)	>10 μM (n=3)	<i>n.b.</i>
JES339	Indolactam V C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₂ 301,38 g/mol		72,1 ± 4,4 nM (n=3)	960 ± 76 nM (***) (n=3)	318 ± 52 nM (*) (n=4)

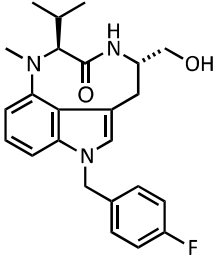
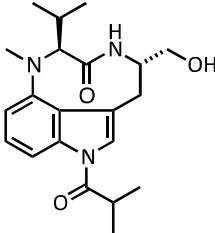
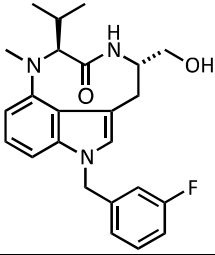
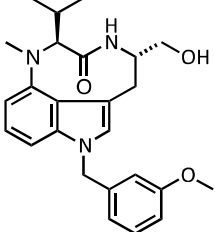
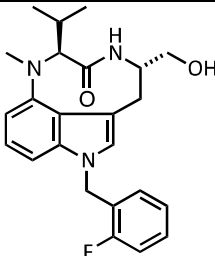
¹⁶ Die Daten zur Inhibition der P2Y abhängigen Ca²⁺ Freisetzung wurden von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

¹⁷ Die Daten zur Inhibition der PAR1 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung wurden von Ina Maria Albrecht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

Ergebnisse

ID	Summen- formel/ Masse [g/mol]	Substanz	IC ₅₀ PAR2 (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ P2Y (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ PAR1 (MW ± SEM; n ≥ 3)
JES354	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₂ 315,41 g/mol		205 ± 52 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES342	C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₂ 391,51g/mol		78,8 ± 18,3 nM (n=3)	1,04 ± 0,28 μM (* (n=3)	<i>n.b.</i>
JES345	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄ 435,52 g/mol		345 ± 66nM (n=3)	4,56 ± 0,54 μM (** (n=3)	<i>n.b.</i>
JES375	C ₃₃ H ₄₁ N ₃ O ₂ Si 539,78 g/mol	 TBDPS: tert.- Butyldiphenylsilyl	>10μM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES388	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃ 343,42 g/mol		26,1 ± 8,0nM (n=3)	728 ± 40 nM (*** (n=3)	278 ± 14 nM (*** (n=3)
JES401	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄ 359,42 g/mol		25,3 ± 6,3 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	308 ± 69 nM (* (n=3)
JES403	C ₃₁ H ₃₃ F ₂ N ₃ O ₂ 517,62 g/mol		2,45 ± 0,43 μM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>

Ergebnisse

ID	Summenformel/ Masse [g/mol]	Substanz	IC ₅₀ PAR2 (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ P2Y (MW ± SEM; n ≥ 3)	IC ₅₀ PAR1 (MW ± SEM; n ≥ 3)
JES405	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂ 409,51 g/mol		24,0 ± 5,9 nM (n=4)	<i>n.b.</i>	148 ± 22 nM (**) (n=3)
JES406	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₃ 371,48 g/mol		206 ± 56 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
JES411	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂ 409,50 g/mol		26,3 ± 6,1 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	151 ± 17 nM (**) (n=3)
JES412	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₃ 421,53 g/mol		45,1 ± 8,9 nM (n=4)	<i>n.b.</i>	154 ± 18 nM (**) (n=3)
JES414	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O ₂ 409,50 g/mol		205 ± 54 nM (n=3)	<i>n.b.</i>	156 ± 35 nM (ns) (n=3)

Zur Bestimmung der IC₅₀ der PAR2, PAR1 oder P2Y Rezeptor abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung in MDA-MB 231 wurden steigende Konzentrationen des jeweiligen Derivats gegen die EC₅₀ von SLIGKV-NH₂, TFLLR-NH₂ und ATP im Ca²⁺ Indikatorassay getestet. Dargestellt sind MW ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Triplikaten. n, Anzahl der unabhängigen Experimente. *n.b.*, nicht bestimmt. Fett hervorgehobene Resultate kennzeichnen potente (<30 nM) und spezifische Derivate. Die statistische Analyse der Spezifität einzelner Derivate erfolgte anhand eines ungepaarten Student's t-Test. *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001. ns, nicht statistisch signifikant.

Charakterisierung von JES303, 305, 307 und 313 (IL-V)

Die Ca^{2+} Ausschüttung über PAR2 wurde, wie zuvor beschrieben, mit der EC_{50} von SLIGKV-NH₂ (7,5 μM) stimuliert. Unter den Verbindungen **303**, **305**, **307** und **313** zeigte IL-V (**313**) mit **104 nM** die potenteste Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung. Die Entfernung der Methylgruppe des IL-V an N₁₃ (**303**, **307**) resultierte in dem Verlust der Wirkung gegenüber PAR2 ($\text{IC}_{50} > 1 \mu\text{M}$) und ebenso im Verlust der Wirkung gegenüber P2Y ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$, Derivat **307**), dessen Ca^{2+} Freisetzung mit ATP stimuliert wurde. IL-V (**313**) war in der Lage das P2Y abhängige Ca^{2+} Signal zu unterdrücken (IC_{50} **452 nM**) und zeigte eine PAR2 spezifische Aktivität. Die Einführung einer Toluolsulfonsäureschutzgruppe an der Position N₁ des IL-V (**305**) führte zu einer Erhöhung der IC_{50} (**791 nM**) hinsichtlich PAR2 Inhibition.

Charakterisierung von JES339 (IL-V), 354, 375, 342, 345 und 388

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in einer zweiten unabhängigen Synthese neues IL-V (**339**) synthetisiert und IL-V an N₁₃ (**354**), an C₁₄ (**375**) sowie an N₁ (**342**, **345**, **388**) mit verschiedenen Resten substituiert. Die Verlängerung der Methylgruppe am N₁₃ (**354**) zu einer Ethylgruppe führte wiederum zu einer erhöhten IC_{50} gegenüber PAR2 (**205 nM**) im Vergleich zu IL-V. Der Austausch der Methylgruppe am N₁₃ mit einem Wasserstoffatom oder einer Ethylgruppe ging mit einer herabgesenkten Wirksamkeit einher. Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass die Methylgruppe eine wichtige Rolle hinsichtlich der biologischen Aktivität der IL-V Grundstruktur besitzt.

Die Verbindung **375** trägt am C₁₄ anstatt der freien Hydroxygruppe eine relativ große Silylschutzgruppe, die in der Abfolge der Synthese von IL-V eingesetzt wird. **375** zeigte, vergleichbar mit den in IV.1 beschriebenen Olivoretinen, die anstatt einer Hydroxy- eine Methoxygruppe am C₁₄ aufweisen, keine Wirkung auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). Das neu synthetisierte IL-V (**339**) zeigte eine stärkere Wirksamkeit bezüglich der PAR2 Inhibition; die IC_{50} betrug **72 nM** im Vergleich zu 104 nM aus der ersten Testung (**313**). Die Derivatisierung von IL-V am N₁ mit einem Benzyl (**342**) oder einem Acetylrest (**388**) bewirkte eine im Vergleich zu IL-V gleichbleibende (**342**; IC_{50} **79 nM**) oder gesteigerte (**388**; IC_{50} **26 nM**) Wirkung auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung. **345** trägt anstatt einer Benzyl-, eine Benzyloxycarbonylgruppe am N₁ und zeigte dadurch eine deutlich schwächere Wirkung auf PAR2 (**345**; IC_{50} **345 nM**).

IL-V (**339**) und die gegen PAR2 wirksamsten Derivate **342** und **388**, sowie das Benzyloxycarbonyl- substituierte Derivat **345** wurden auf ihre Spezifität gegenüber PAR2 untersucht. Alle gegen P2Y Rezeptoren getestete Derivate zeigten signifikant erhöhte IC_{50} in

Bezug auf die Inhibition der ATP regulierten, P2Y abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung in MDA-MB 231. Die Verschiebung der Wirkung hinsichtlich der Inhibition der ATP ausgelösten Ca^{2+} Mobilisierung im Vergleich zu der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung korrelierte dabei bei IL-V (**339**) und den untersuchten Derivaten **342**, **345** und **388**.

Die verringerte Wirkung der Derivate **339**, **342**, **345** und **388** auf die Inhibition der P2Y im Vergleich zu der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung wird durch die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven, dargestellt in Abbildung IV.23, verdeutlicht. Die entsprechenden IC_{50} Werte sind in Tabelle IV.4 aufgeführt. IL-V und 388 wurden zusätzlich gegen PAR1 getestet und zeigten ebenso eine im Vergleich zu PAR2 eindeutig geringere Wirkung gegenüber PAR1.

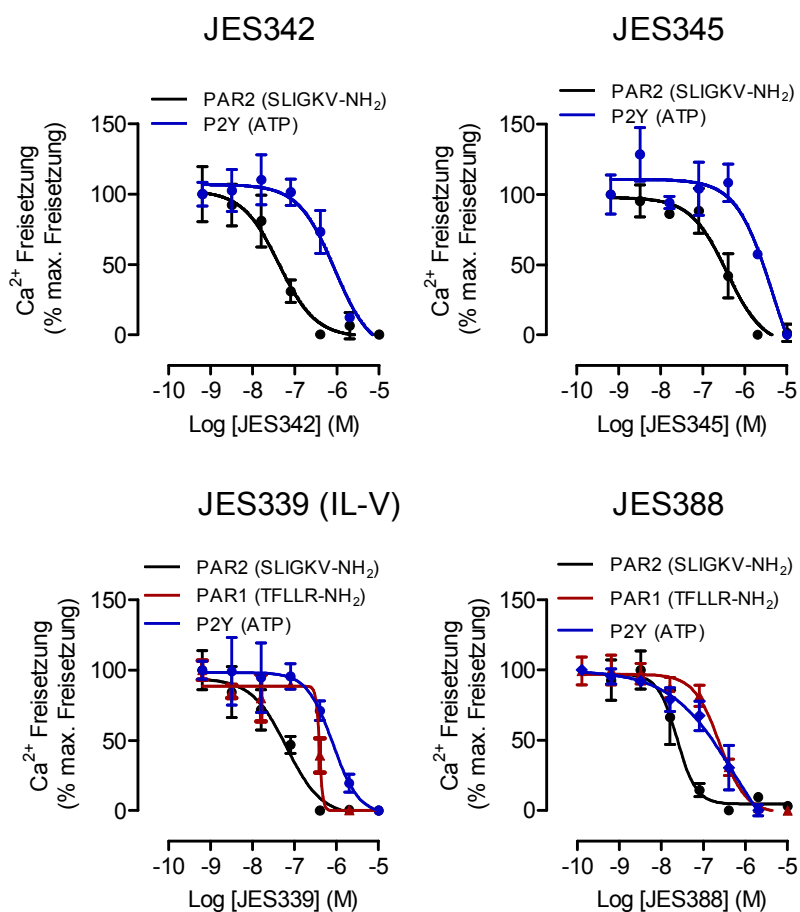


Abbildung IV.23: Inhibition der PAR2, PAR1 und P2Y abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung durch IL-V Derivate

Konzentrationsabhängige Inhibition der Ca^{2+} Freisetzung. MDA-MB 231 Zellen wurden mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladen, dann 15 min mit den verschiedenen Derivaten behandelt und anschließend mit PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂, PAR1 Peptid TFLLR-NH₂ oder P2Y Rezeptor Agonist ATP bei EC_{50} stimuliert. Zur Ermittlung einer Konzentrations-Wirkungskurve wurden die maximalen RFU-Werte der Ca^{2+} Kinetik in Prozent der maximalen Ca^{2+} Freisetzung gegen die jeweilige logarithmische Konzentration des Derivats aufgetragen. Die Ergebnisse repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SD}$ aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Charakterisierung von JES401, 403, 405, 406, 411, 412 und 414

Basierend auf der potenten Wirkung der am N₁ substituierten Derivate 342 und 388 wurde IL-V am N₁ mit weiteren Substituenten variiert. Die IL-V Derivate **403**, **405**, **411** und **414** tragen am N₁ einen fluorierten Benzylrest, der entweder ein Fluormolekül in ortho- (**414**), meta- (**411**) oder para- (**403**, **405**) Position besitzt. Abhängig von der Position des Fluormoleküls zeigten sich Unterschiede in der IC₅₀ bezogen auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung; die jeweiligen IC₅₀ lagen bei **205 nM (414)**, **26 nM (411)** und **24 nM (405)**. Eine zusätzliche Derivatisierung an Position N₁₀ in direkter Nähe zur Hydroxygruppe am C₁₄ mit einem fluorierten Benzylrest (**403**) verursachte einen Verlust der Aktivität (IC₅₀ = **2,5 µM**). Das Derivat **412** besitzt am N₁ einen m-Methoxybenzylrest, dies resultierte in einem 2-fachen Anstieg der IC₅₀ (**45 nM**) im Vergleich zu den in meta- und para- Position fluorierten Benzylringen. Zusätzlich gute Wirksamkeit erzielte die Einführung eines hydrophilen Carbonsäureesters (**401**) (IC₅₀ = **25 nM**). Dagegen resultierte die Einführung eines leicht hydrophoberen Carbonsäureamids mit zwei, im Vergleich zum Acetylrest in **388**, weiteren Methylgruppen nur in einer inhibitorischen Aktivität im dreistellig nanomolaren Bereich (IC₅₀ **406** = **206 nM**).

Die gegen PAR2 wirksamen Verbindungen **401**, **405**, **411** und **412** sowie auch die weniger potente Verbindung **414** wurden zur Charakterisierung ihrer PAR2 spezifischen Aktivität im Ca²⁺ Mobilisierungsassay getestet. Dazu wurde die TFLLR-NH₂ stimulierte PAR1 abhängige Ca²⁺ Freisetzung nach Inkubation der Zellen mit den Derivaten gemessen. Die getesteten Derivate zeigten eine unterschiedliche Selektivität gegenüber PAR2; die IC₅₀ in Bezug auf die PAR1 stimulierte Ca²⁺ Freisetzung war für **401** 12 fach, für **405** und **411** etwa 6 fach und für **412** 3,5 fach erhöht, verglichen mit den IC₅₀ für die PAR2 stimulierte Ca²⁺ Freisetzung. **414** zeigte keinen spezifischen Effekt auf die PAR2 abhängige Ca²⁺ Freisetzung in MDA-MB 231. Die Unterschiede in der Spezifität bezogen auf die PAR2 und PAR1 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung werden durch die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven, dargestellt in Abbildung IV.24, verdeutlicht. Die entsprechenden IC₅₀ Werte sind in Tabelle IV.4 aufgeführt.

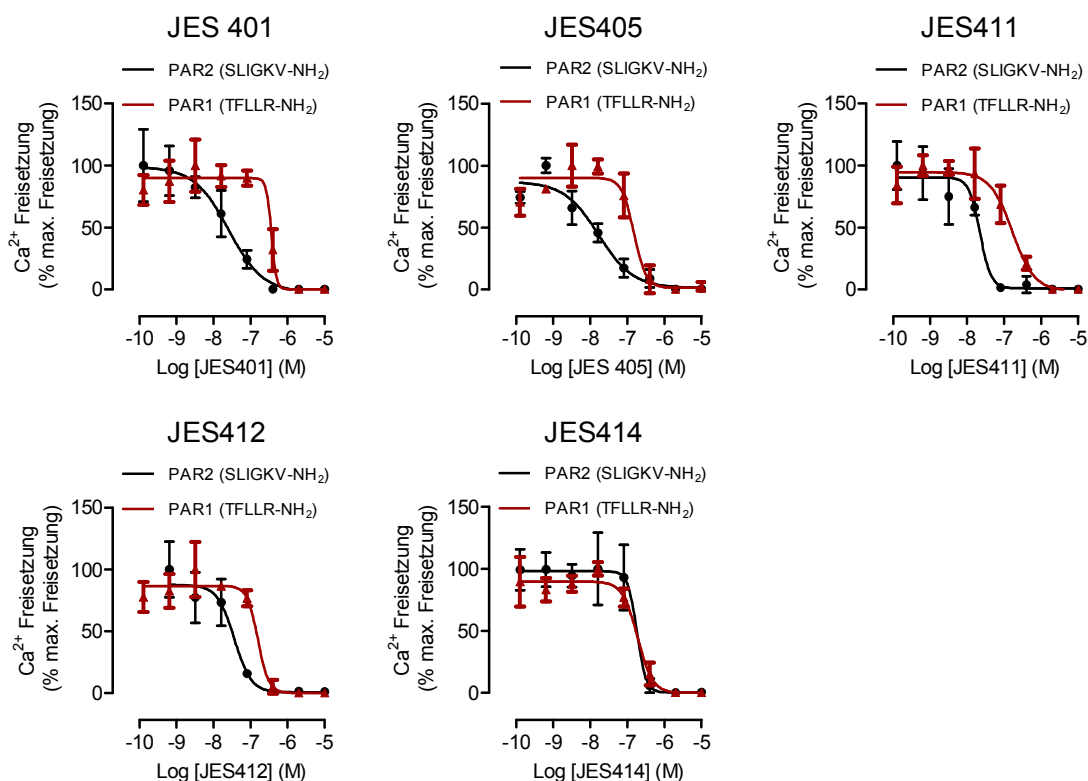


Abbildung IV.24: Inhibition der PAR2 und PAR1 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung durch die IL-V Derivate 401, 405, 411, 412 und 414

Konzentrationsabhängige Inhibition der Ca^{2+} Freisetzung. MDA-MB 231 Zellen wurden mit Fluo-8 Ca^{2+} Indikator beladen, dann 15 min mit den verschiedenen Derivaten behandelt und anschließend mit PAR2 Peptid SLIGKV-NH₂ oder PAR1 Peptid TFLLR-NH₂ bei EC₅₀ stimuliert. Zur Ermittlung einer Konzentrations-Wirkungskurve wurden die maximalen RFU-Werte der Ca^{2+} Kinetik in Prozent der maximalen Ca^{2+} Freisetzung gegen die jeweilige logarithmische Konzentration des Derivats aufgetragen. Die Ergebnisse repräsentieren MW \pm SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Substituierte Derivate von IL-V zeigten in Ca^{2+} Mobilisierungsstudien eine wirksame Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung, abhängig von den unterschiedlichen Derivatisierungen an verschiedenen Positionen des IL-V Moleküls. Für die IL-V Derivate **388**, **401**, **405** und **411** konnten IC₅₀ von **25 nM** ermittelt werden, die in ihrem Konzentrationsbereich vergleichbar waren mit den IC₅₀ der wirksamen Teleocidin Naturstoffderivate. Verglichen mit IL-V (IC₅₀ 70 nM), dem Grundbaustein der Teleocidine und der Ausgangsstruktur für alle Derivatisierungen, konnte mit IL-V Derivaten, die an der Position N₁ entweder mit einer Acetylgruppe (**388**), einem Carbonsäureester (**401**) oder einem para- (**405**) bzw. meta- (**411**) Fluorbenzylrest substituiert wurden, eine Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf PAR2 erreicht werden. Die IL-V Derivate zeigten außerdem eine spezifische Wirkung auf die PAR2 induzierte Ca^{2+} Mobilisierung in MDA-MB 231. Die Inhibition der Ca^{2+} Freisetzung aktiviert durch PAR1 und/oder P2Y war verglichen mit PAR2 signifikant schwächer, der Unterschied in der Wirkung fiel jedoch nicht für jedes Derivat gleich aus. Ein IL-V Derivat (**414**) zeigte keinen selektiven Effekt auf PAR2.

IV.9 Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die Zellviabilität

Mit Hilfe eines Viabilitätsassays (III.2.4) in gesunden (HMEC) und metastatischen (MDA-MB 231) Brustepithelzellen sollte untersucht werden, ob in Bezug auf die Inhibition der PAR2 vermittelten Signalweiterleitung wirksame Teleocidine und chemisch synthetisierte IL-V Derivate, unspezifische zytotoxische oder proliferative Effekte verursachen. Innerhalb einer Kontaktzeit von 24 h zeigte keine der potenten Teleocidin Verbindungen (**IMD1**, **3**, **4**, **7** und **10**) wie schon zuvor für Teleocidin A2 beobachtet (IV.4.1), zytotoxische oder wachstumsfördernde Effekte in MDA-MB 231 bei Testkonzentrationen bis zu 2 μ M (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Resultate der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung nicht durch mögliche zelltoxische Effekte beeinflusst wurden.

Der Effekt von Teleocidin und IL-V Derivaten, die als wirksame PAR2 Inhibitoren charakterisiert werden konnten, auf die Viabilität von MDA-MB 231 und HMEC wurde im Rahmen einer längeren Kontaktzeit (48 h) untersucht. Dazu wurde die Anzahl lebender Zellen, basierend auf dem ATP Gehalt, nach der Behandlung mit 25 nM (Konzentration, die die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung im Fall aller hier getesteter Derivate wirksam unterdrückte) des jeweiligen Derivats bestimmt (Abbildung IV.25).

Im Gegensatz zu Teleocidin A2 und den **IMD** Derivaten **1** und **3** zeigten die IL-V Derivate **JES339**, **388**, **342**, **401**, **405**, **411**, **412** und **414** keine signifikante Auswirkung auf die Viabilität von MDA-MB 231 (Abbildung IV.25 A, B). Die Behandlung von MDA-MB 231 mit Teleocidin A2 und den Derivaten **IMD1** und **3** führte zu einer Reduzierung der Anzahl lebender Zellen von 100 % der unbehandelten Zellen auf etwa 75-80 %. Auch in HMEC Zellen konnte eine leichte zytotoxische Wirkung durch Teleocidin A2 und **IMD1** und **3** gezeigt werden, in dem die Anzahl lebender Zellen von 100 % auf etwa 75 % reduziert wurde. Die Verbindungen **JES342**, **401**, **405** und **411** verursachten eine moderate Reduzierung der Anzahl an lebenden Zellen, die jedoch schwächer ausfiel, als bei den Teleocidinen; die Viabilität lag bei etwa 90 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dagegen zeigten **IL-V** und die Derivate **JES388**, **412** und **414** auch auf HMEC Zellen keine signifikante Zytotoxizität (Abbildung IV.25 B, D).

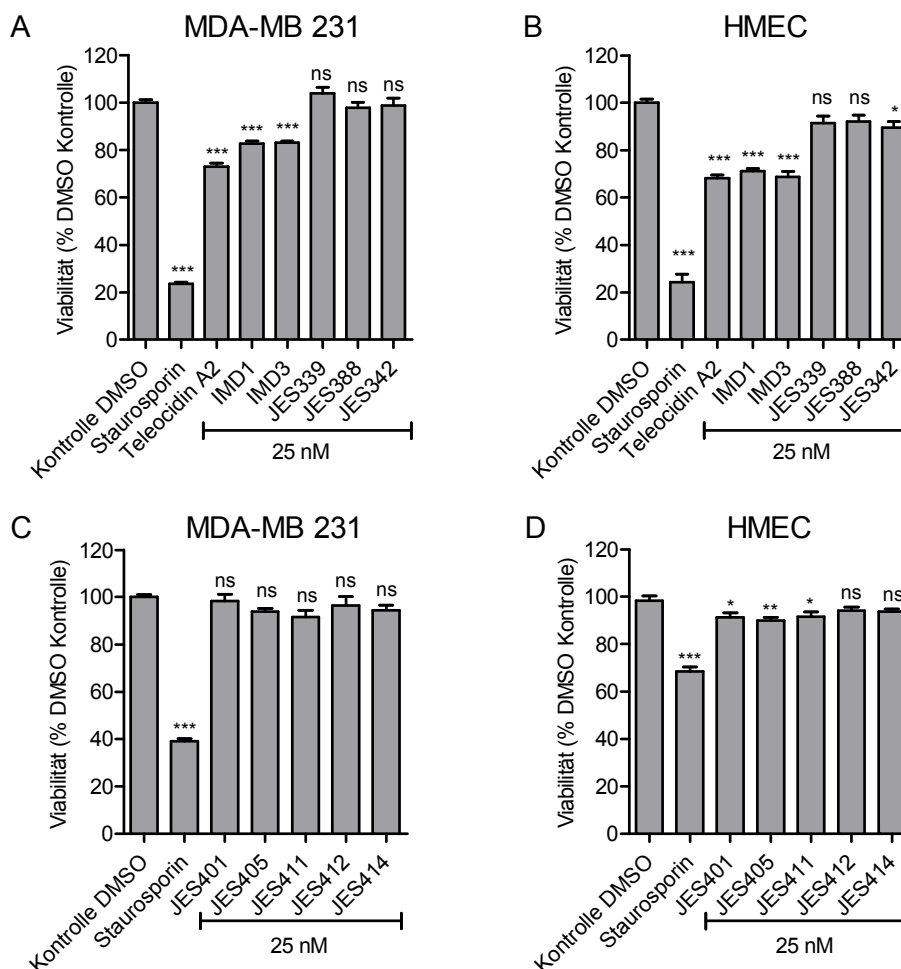


Abbildung IV.25: Die Wirkung von Teleocidin und Indolactam V Derivaten auf die Viabilität von MDA-MB 231 und HMEC bei einer Kontaktzeit von 48 h¹⁸

Die Zellen wurden mit 25 nM des jeweiligen Derivats und Staurosporin (2 μ M) als Zytotoxizitätskontrolle sowie 0,2% DMSO als Lösemittelkontrolle für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl lebender Zellen wurde ermittelt und die gemessene RLU der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt in Vierfachbestimmung. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test gegen die unbehandelte Probe. *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001 versus unbehandelte Zellen, ns nicht statistisch signifikant.

Die weitgehend gegen PAR2 equipotenten Teleocidine und IL-V Verbindungen wiesen eine unterschiedliche Wirkung auf die Viabilität normaler und kanzerogener Zellen auf und im Gegensatz zu den Naturstoffen zeigten die synthetisierten Verbindungen keinen Effekt auf MDA-MB 231 und lediglich einen sehr moderaten Effekt auf HMEC Zellen.

IV.10 Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die PKC

Das Ziel dieses Versuchs war es festzustellen, wie sich strukturelle Veränderungen am Grundgerüst von IL-V auf die Aktivierung der PKC in MDA-MB 231 auswirkten und ob sich Telocidine und IL-V Derivate in ihrer PKC stimulierenden Wirkung unterscheiden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Teleocidin A2 PKC in MDA-MB 231 potent (25 nM) stimuliert

¹⁸ Die Daten wurden von Lisa Thelen und Ina Maria Albrecht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

(IV.4.3) und die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Ausschüttung durch die Inhibition der PKC mit einem kompetitiven Inhibitor beeinflusst werden kann. Anhand der Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS (pMARCKS) wurde mittels Sandwich ELISA (III.2.6) die Aktivierung der PKC durch Teleocidin Derivate, IL-V und IL-V Derivate in MDA-MB 231 untersucht. Tabelle IV.5 zeigt den Spiegel an pMARCKS in MDA-MB 231, nach Inkubation der Zellen mit den Teleocidinen **IMD1**, **3** und **7**, Teleocidin A2, IL-V und IL-V Derivaten. Die Substanzen wurden entweder bei gleicher Konzentration (25 nM) oder basierend auf den individuellen IC_{50} für die Inhibition von PAR2 zu den Zellen gegeben.

Tabelle IV.5: Die Aktivierung der Protein Kinase C abhängig von Teleocidin und Indolactam V Derivaten¹⁹

ID		Konzentration	MARCKS Phosphorylierung (fold increase) (n=3)
PMA		10 nM	3,12 ± 0,14
IMD1		25 nM	2,14 ± 0,14 (ns)
IMD3		25 nM	2,52 ± 0,15 (ns)
IMD7		25 nM	2,49 ± 0,23 (ns)
IMD9	Teleocidin A2	25 nM	2,64 ± 0,13
JES339	Indolactam V	25 nM	1,14 ± 0,15 (***)
IMD9	Teleocidin A2	IC_{50} (PAR2)	2,70 ± 0,13
JES388		IC_{50} (PAR2)	1,29 ± 0,05 (***)
JES401		IC_{50} (PAR2)	1,44 ± 0,09 (***)
JES405		IC_{50} (PAR2)	1,66 ± 0,06 (***)
JES411		IC_{50} (PAR2)	2,02 ± 0,05 (**)
JES412		IC_{50} (PAR2)	1,96 ± 0,15 (***)
JES414		IC_{50} (PAR2)	2,93 ± 0,14 (ns)

MDA-MB 231 wurden bei einer Zelldichte von 70-80 % mit 10 nM PMA und 25 nM oder der IC_{50} für die PAR2 Inhibition der jeweiligen Verbindung behandelt. Anschließend wurde die Phosphorylierung von MARCKS an Ser152/156 in Zelllysaten bestimmt. Der pMARCKS Spiegel in unbehandelten Zellen wurde als Experiment interner Standard normalisiert und gleich 1 gesetzt (f.i. = fold increase). Dargestellt sind die MW ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Fett hervorgehobene Resultate kennzeichnen Derivate mit niedriger PKC Aktivierung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test versus Teleocidin A2. ns, nicht statistisch signifikant, ***P < 0,0001 versus Teleocidin A2.

Die Teleocidin Derivate zeigten bei einer Konzentration von 25 nM einen starken stimulierenden Effekt auf die PKC, der pMARCKS Spiegel war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen 2,1 - 2,7 fach erhöht. Teleocidin A2 hatte die stärkste Wirkung auf die PKC, die Derivate **IMD 3** und **7** waren equipotent und **IMD 1** zeigte einen 2,1 fach erhöhten pMARCKS Spiegel und somit die schwächste Phosphorylierung des PKC Substrats. Im Vergleich dazu führte die Behandlung der Zellen mit dem Phorbol ester PMA (10 nM) zu einer 3,1 fachen Steigerung der basalen PKC Aktivität. IL-V (25 nM) zeigte eine im

¹⁹ Die Daten wurden von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

Vergleich zu den Teleocidin Derivaten signifikant geringere PKC Aktivierung in MDA-MB 231. Der pMARCKS Spiegel war lediglich 1,14 fach erhöht.

Zur weiteren Untersuchung der chemisch synthetisierten IL-V Derivate wurde die MARCKS Phosphorylierung in MDA-MB 231, basierend auf den individuellen IC_{50} Werten der jeweiligen IL-V Derivate für die Inhibition von PAR2, charakterisiert. Alle IL-V Derivate zeigten eine deutlich reduzierte Wirkung auf die PKC Aktivität im Vergleich zu **Teleocidin A2** mit 2,7 fach erhöhten pMARCKS Spiegel. Die in Bezug auf die PAR2 Inhibition equipotenten Derivate **JES388**, **401**, **405** und **411** zeigten eine unterschiedliche Aktivität auf die PKC, der pMARCKS Spiegel waren bei **388** 1,3 fach, bei **401** 4,4 fach, bei **405** 1,7 fach und bei **411** 2 fach erhöht. Das in Bezug auf PAR2 weniger potente Derivat **412** (IC_{50} 45 nM) zeigte einen 2 fach erhöhten Spiegel und das im dreistellig nanomolaren Bereich wirksame und unspezifische **414** (IC_{50} PAR2: 205 nM; IC_{50} PAR1: 156 nM) zeigte eine PKC Aktivierung, die vergleichbar mit den für Teleocidin A2 ermittelten Werten war (2,9 fach erhöhter pMARCKS Spiegel).

Zusammenfassend konnten die Daten zeigen, dass die chemisch synthetisierten IL-V Derivate das zelluläre PKC Substrat MARCKS weniger stark phosphorylieren als die Teleocidin Naturstoffderivate. In Bezug auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung equipotent wirksame IL-V und Teleocidin Verbindungen zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Wirkung auf die Aktivität der PKC (Tabelle IV.6).

Tabelle IV.6: Zusammenfassung potenter und spezifischer Indolactam V Derivate mit reduzierter PKC Aktivität

ID	IC_{50} PAR2 (nM)	n	IC_{50} PAR1 (nM)	n	MARCKS Phosphorylierung (f.i. unbeh. Probe)	n
Teleocidin A2	18,1 ± 1,7 nM	9	371 ± 58 nM	5	2,70 ± 0,13	3
IMD 1	16,9 ± 2,5 nM (ns)	3	33,4 ± 10,1 nM (***)	3	2,14 ± 0,14 (*)	3
IMD 3	28,1 ± 4,6 nM (ns)	3	33,7 ± 10,8 nM (***)	3	2,52 ± 0,15 (ns)	3
Indolactam V	72,1 ± 4,4 nM (ns)	3	318 ± 52 nM (ns)	4	1,14 ± 0,15 (***)	3
JES388	26,1 ± 8,0 nM (ns)	3	278 ± 14 nM (ns)	3	1,29 ± 0,05 (***)	3
JES401	25,3 ± 6,3 nM (ns)	3	308 ± 69 nM (ns)	3	1,44 ± 0,09 (***)	3
JES405	24,0 ± 5,9 nM (ns)	4	148 ± 22 nM (*)	3	1,66 ± 0,06 (***)	3
JES411	26,3 ± 6,1 nM (ns)	3	151 ± 17 nM (ns)	3	2,02 ± 0,05 (**)	3
JES412	45,1 ± 8,9 nM (ns)	4	154 ± 18 nM (ns)	3	1,96 ± 0,15 (***)	3
JES414	205 ± 54 nM (***)	3	156 ± 35 nM (ns)	3	2,93 ± 0,14 (ns)	3

Gezeigt sind die MW ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in biologischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Dunnett's Post-hoc-Test versus Teleocidin A2. ns, nicht statistisch signifikant, *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001 versus Teleocidin A2.

Legende

IC_{50} PAR2	IC_{50} PAR1/Spezifität	MARCKS Phosph. (f.i.)
< 30 nM (potent)	> 150 nM/Ja	< 1,9
> 30 nM	/	< 2,2
> 100 nM	Nein	> 2,5

V. Diskussion

V.1 Inhibition PAR2 abhängiger Signalwege durch Teleocidin A2

Die bisherigen, aus der Literatur bekannten Studien legen nahe, dass PAR2 für den Fortschritt neoplastischer Erkrankungen verantwortlich ist und prometastatische Prozesse fördert (Ramachandran *et al.*, 2012). PAR2 abhängige Signale wirken *in vitro* auf die Proliferation, Migration und Invasion einer Reihe unterschiedlicher Tumorzellen. Erhöhte PAR2 Expressionslevel in isoliertem, malignen Tumorgewebe aus einem Mammakarzinom wurden mit einem erhöhten PAR2 abhängigen, metastatischen Potenzial korreliert und gehen mit einer verschlechterten Prognose einher (Rydén *et al.*, 2010). Diese Tatsache begründet den Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Inhibition von PAR2.

Der Naturstoff Teleocidin A2 ging aus einem zellbasierten Screening als potenzielle PAR2 inhibierende Substanz hervor. Anhand von zellbasierten Testsystemen konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Teleocidin A2 potent (IC₅₀ 14-26 nM) und spezifisch (bis zu 20 fach erhöht im Vergleich zu PAR1 und P2Y) die PAR2 abhängige, G_q gekoppelte Ca²⁺ Mobilisierung inhibiert, die PAR2 stimulierte Chemokinese wirksam unterdrückt und auf die Reorganisation der Aktinstruktur im Zytoskelett wirkt.

V.1.1 Stimulation der endogenen Ca²⁺ Mobilisierung

PAR2 aktiviert klassische, G-Protein gekoppelte Signalwege, die nachfolgend die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER induzieren (Kaufmann *et al.*, 2011). Aktuelle Ansätze zur Identifizierung neuer GPCR Wirkstoffe basieren verstärkt auf funktionalen zellbasierten Testsystemen, die sich auch innerhalb eines Hochdurchsatzverfahrens (HTS) anwenden lassen. Sie detektieren die Akkumulation intrazellulärer Moleküle wie cAMP oder Ca²⁺. Der intrazelluläre Ca²⁺ Spiegel wird vorwiegend mit Ca²⁺ Ionen sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen gemessen, die bei Ca²⁺ Bindung stark erhöhte Emissionen zeigen (Eglen *et al.*, 2007). Das Ca²⁺ Monitoring im HTS Format ist eines der meist genutzten Assay Verfahren zur Identifizierung neuer Leitstrukturen von GPCRs (Emkey und Rankl, 2009).

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes²⁰ wurde zunächst die Ca²⁺ Mobilisierung in humanen und murinen PASMC untersucht. Studien attestierten PAR2 eine funktionelle Rolle in der vaskulären Remodelierung und Verdickung der Gefäßmuskulatur in der pulmonalen Hypertonie. Tryptase aus Mastzellen, die in Plasmaproben von IPAH Patienten erhöht ist, sowie aktiver FXa treten als mögliche PAR2 aktivierende endogene Agonisten in der IPAH ein (Kwapiszewska *et al.*, 2012; Delbeck *et al.*, 2011). Die selektive Inhibition von FXa mit

²⁰ Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stephan Rosenkranz, Herzzentrum der Universität zu Köln

dem direkten FXa Inhibitor Rivaroxaban (Xarelto[®]) (Abrams und Emerson, 2009) führte zur Verhinderung pathophysiologischer Merkmale in der experimentellen pulmonalen Hypertonie (PAH) bei Ratten (Delbeck *et al.*, 2011). Faktor Xa wurde eingebunden in den TF-FVIIa-FXa Komplex als PAR2 oder auch PAR1 aktivierende Serinprotease beschrieben (Ruf *et al.*, 2003), vermittelte jedoch auch in seiner freien Form eine potente (20 nM), schützende Wirkung auf die Barrierenfunktion von Endothelzellen, die durch PAR2 Antikörper unterdrückt werden konnte (Rana *et al.*, 2012).

In den hier durchgeführten Untersuchungen aktivierte löslicher Faktor Xa in Konzentrationen bis zu 3 U/ml weder in murinen mPASC, isoliert aus den pulmonalen Arterien der Lunge männlicher Wildtyp (WT) und PAR2^{-/-} Mäuse (Freyhaus *et al.*, 2015), noch in humanen PASC eine Ca²⁺ Mobilisierung. Die Stimulierung mit Trypsin und SLIGRL-NH₂ rief hingegen einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Level hervor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass PAR2 funktional auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Die Stimulation von PASC mit relativ geringen Konzentrationen Tryptase (7 nmol/L) führte zur Phosphorylierung von ERK1/2 sowie zur proliferativen Antwort der Zellen (Kwapiszewska *et al.*, 2012). In den hier durchgeführten Experimenten führte die Stimulation muriner PASC mit Tryptase (50 nM) lediglich zu einem schwachen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration. Die Serinprotease aus Mastzellen wurde im Vergleich zu Trypsin als weniger potenter, partieller Agonist des PAR2 abhängigen Ca²⁺ Signals beschrieben. Sie ist in der Lage, die aminoternale Domäne des Rezeptors an einer weiteren Schnittstelle (Arg41/Ser42) proteolytisch zu spalten. Dadurch kann es, besonders in hohen Konzentrationen zu einer potenziellen Deaktivierung des Rezeptors kommen, die mit der Inhibition nachgeschalteter Ca²⁺ Signale einhergehen. (Zhao *et al.*, 2014; Molino *et al.*, 1997).

Agonisten von GPCR und insbesondere von Proteinase aktivierten Rezeptoren können einen bestimmten Signalweg bevorzugen und dadurch funktional selektiv wirken (engl. biased signaling) (Hollenberg *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Abhängig von den Liganden kann sich die induzierte Konformationsänderung eines GPCRs unterscheiden und dies beeinflusst wiederum die selektive Kopplung intrazellulärer Effektormoleküle (Shukla *et al.*, 2014). Löslicher FXa oder Tryptase verursachten in den Experimenten dieser Arbeit keine (FXa) oder lediglich eine moderate (Tryptase) G_q gekoppelte Ca²⁺ Freisetzung in das Zytoplasma. Möglich wäre, dass FXa sowie Tryptase potenziell PAR2 und ERK1/2 abhängig proliferative Effekte unterstützen. Als ein Beispiel für eine selektive Funktionalität einer PAR2 aktivierenden Protease kann die Elastase aus Neutrophilen genannt werden, die MAPK stimuliert, jedoch keinen Einfluss auf intrazelluläre Ca²⁺ Spiegel nimmt (Hollenberg *et al.*, 2014).

Die Studien zur Untersuchung der PAR2 und PAR1 Agonist abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung in murinen glatten Muskelzellen konnten zeigen, dass PAR2 in mPASMCMC PAR2^{-/-} nicht funktional exprimiert wird. In mPASMCMC PAR2^{-/-} ergab die Stimulierung mit SLIGRL-NH₂ und Trypsin eine signifikant reduzierte Ca^{2+} Freisetzung im Vergleich zu mPASMCMC WT. Es wurde jedoch auch deutlich, dass PAR1 im Vergleich zu PAR2, auf mPASMCMC WT Zellen verstärkt funktional exprimiert zu sein scheint. Die Stimulation mit TFLLR-NH₂ (PAR1) resultierte in keinem nennenswerten Wirkungsunterschied zwischen mPASMCMC WT und PAR2^{-/-}, was darauf hin deutet, dass TFLLR-NH₂ einerseits selektiv PAR1 aktiviert und die Rezeptorfunktionalität von PAR1 durch das Ausschalten von PAR2 nicht beeinflusst wird. Dahingegen war die Wirkung von Thrombin in mPASMCMC PAR2^{-/-} leicht reduziert, jedoch konnte die statistische Analyse mittels ungepaartem Student's t-Test keinen signifikanten Effekt nachweisen. Jedoch ist auch aus der Literatur bekannt, dass es abhängig von PAR1, proteolytisch aktiviert von Thrombin, zu einer Transaktivierung von PAR2 in Endothelzellen kommen kann (O'Brien *et al.*, 2000). Diese Transaktivierung wäre dementsprechend in mPASMCMC PAR2^{-/-} unterdrückt.

Des Weiteren erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der Aktivierung von PAR2 mit der PAR2 aktivierenden Protease Trypsin und dem synthetischen Ligand SLIGKV-NH₂ in Tumor- und Endothelzellen. Die Zelllinien wurden basierend auf der pathophysiologischen Relevanz von PAR2 im assoziierten Krankheitsbild ausgewählt; PAR2 ist in der metastatischen Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 verstärkt exprimiert und reguliert promigratorische und proinvasive Signale (Su *et al.*, 2009; Matej *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2006; Hjortoe *et al.*, 2004). In NSCLC A549 Zellen ist PAR2 exprimiert; der Rezeptor schränkt die Apoptose der Zellen ein (Huang *et al.*, 2013) und vermittelt stimulierende Effekte ausgelöst durch die proteolytische Aktivität von kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) (Michel *et al.*, 2014). PAR2 stimuliert weiterhin die Sekretion proangiogener VEGF Moleküle in die TME und kann so die Proliferation Tumor-naher Endothelzellen regulieren. PAR2 ist dabei aber auch auf diesen Zellen verstärkt vor allem unter hypoxischen Bedingungen exprimiert (Svensson *et al.*, 2011; Mirza *et al.*, 1996); aus diesem Grund wurde die Rezeptoraktivierung und subsequente Ca^{2+} Mobilisierung in HUVEC untersucht.

Anhand der Kinetik der Ca^{2+} Mobilisierung, beispielhaft gezeigt in hPASMCMC (Abbildung III.2) und MDA-MB 231 (Abbildung III.3 A) zeigte sich eine transiente Phase der Ca^{2+} Freisetzung mit einem raschen Anstieg der Ca^{2+} Konzentration innerhalb der ersten 20-30 s nach Injektion von Trypsin oder SLIGKV-NH₂ und einem Abfall der Ca^{2+} Level innerhalb von 90-120 s.

Der Einstrom von Ca^{2+} in das Zytoplasma erfolgt aus dem ER über IP_3 regulierte Ca^{2+} Ionenkanäle und über speichervermittelt regulierte Kanäle (SOCs) über die Plasmamembran (Parekh und Putney, 2005; Putney *et al.*, 2001). Die Signaltermination wird eingeleitet durch die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne des Rezeptors von GRKs und Effektorinasen wie PKC, die GTPase Aktivität der G_α Untereinheit und die Dephosphorylierung von IP_3 durch Phosphatasen (Soh *et al.*, 2010). Ca^{2+} sensorische Proteine wie Calmodulin gleichen den Ca^{2+} Spiegel aus. Der Abtransport von Ca^{2+} aus dem Zytosol wird über Ca^{2+} ATPasen wie SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) reguliert, die zytosolisches Ca^{2+} zurück in die intrazellulären Speicher transportieren (Brini und Carafoli, 2009). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiporter in der Plasmamembran gewährleisten den Rücktransport von überschüssigem Ca^{2+} aus der Zelle.

Die endogene Rezeptor aktivierende Protease Trypsin zeigte auf MDA-MB 231, A549, HUVEC, hPASC und mPASC eine eindeutig potentere Aktivierung (500-1500 fach) der Ca^{2+} Mobilisierung als SLIGKV-NH₂. Dieser Effekt stimmt mit den publizierten Daten überein (Suen *et al.*, 2012). Der durch die Protease befreite N-terminale Ligand liegt im Gegensatz zu dem freien Liganden SLIGKV-NH₂ lokal und an den Rezeptor gebunden in der Nähe der Bindungstasche vor und hat dadurch einen potenteren Effekt auf die Rezeptoraktivierung.

In MDA-MB 231, A549, HUVEC, hPASC und mPASC zeigten sich Zell-abhängige unterschiedliche Affinitäten, bzw. EC_{50} von Trypsin und SLIGKV-NH₂, die auf eine abweichende Anwesenheit funktionaler PAR2 Rezeptoren hindeuten. PAR2 scheint in den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und A549 im Vergleich zu den Primärzelllinien HUVEC und hPASC sowie mPASC WT verstärkt exprimiert zu werden. Einzig für HUVEC (EC_{50} Trypsin 112 nM) wurden abweichende Trypsin EC_{50} Werte von etwa 10 nM publiziert (Suen *et al.*, 2012), in einer anderen Studie mit SLIGRL-NH₂ wurden EC_{50} von etwa 30 μM gemessen (Mirza *et al.*, 1996). Außerdem belegt eine weitere Literaturstelle, dass PAR2 in HUVEC erst unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird (Svensson *et al.*, 2011).

In metastatischen MDA-MB 231 war die PAR2 Expression im Gegensatz zu primären, nicht kanzerogenen Brustepithelzellen (HMEC) signifikant erhöht (analysiert mittels qPCR). Dies spiegelte sich in der Aktivierung der Ca^{2+} Mobilisierung ausgelöst durch SLIGKV-NH₂ und Trypsin wieder.

Diese Daten sind konform mit publizierter Literatur; PAR2 mRNA und Proteinspiegel waren hochreguliert in metastatischen Brustgeweben und etablierten Brusttumorzelllinien im Vergleich zu gesundem, normalen Brustepithel und immortalisierten nicht kanzerogenen Brustzelllinien (Su *et al.*, 2009). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass PAR2 in

aggressiven, metastatischen Tumorzellen verstärkt exprimiert wird und dadurch PAR2 regulierte Signale verstärkt angeschaltet werden können. Die Ergebnisse unterstützen weiterhin die Eigenschaft von PAR2 als potenzielles therapeutisches Zielprotein zu fungieren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Botenstoff Ca^{2+} PAR2 stimulierte, protumorigene Antworten stimuliert: Unter anderem wird die Invasion hepatozellulärer Karzinomzellen durch eine Ca^{2+} abhängige Aktivierung von p42/p44 MAPKinase vermittelt (Kaufmann *et al.*, 2011). Weiterhin ist Ca^{2+} unter PAR2 in die NF κ B abhängige Transkription und Sekretion immunregulatorischer Zytokine involviert (Macfarlane *et al.*, 2005). Die Funktion von Ca^{2+} in der PAR2 stimulierten Signalweiterleitung in MDA-MB 231 und A549 bedarf an dieser Stelle einer weiteren Aufklärung.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung von MDA-MB 231 mit 25 μM SLIGKV-NH₂, 5 nM Trypsin und 25 μM TFLLR-NH₂ zu der Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS führte. Dies lässt auf die PAR2 und PAR1 induzierte Aktivierung der PKC schließen. Diese Daten bestätigen, dass die PKC über PAR2 sowie PAR1, G_q gekoppelt, Ca^{2+} und DAG abhängig aktiviert wird und weisen auf den klassischen Signalweg G_q-PLC-IP₃/ Ca^{2+} /DAG/PKC hin.

Phosphoryliertes MARCKS Protein wurde in aktuelleren Studien als potentieller Faktor in der Tumorprogression beschrieben. Erhöhte pMARCKS Level stehen im Zusammenhang mit einer reduzierten Überlebensrate bei Lungenkrebspatienten (Chen *et al.*, 2014a), verstärktem Tumorwachstum und metastatischem Status in Lungen- und Mammakarzinomen, sowie mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Paclitaxel (Chen *et al.*, 2015). Die Aktivierung von MARCKS über einen PKC abhängigen Weg scheint außerdem zum Teil die Migration und Metastase invasiver Lungenkarzinom- und Gallengangskarzinomzelllinien zu fördern (Chen *et al.*, 2014b; Techasen *et al.*, 2010). MARCKS verlinkt in unphosphoryliertem Zustand Aktinfilamente an der Zellmembran. Die Phosphorylierung durch PKC oder die Bindung an den Ca^{2+} Calmodulin Komplex reduziert die Assoziation mit Aktin und der Plasmamembran und führt dazu, dass pMARCKS in das Zytoplasma gelangt und die Aktinfilamente in einem weniger geordneten, flexibleren Status vorliegen. Daher wird MARCKS Proteinen eine regulierende Funktion in Bezug auf das Zytoskelett zugeschrieben (Arbuzova *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit nachgewiesene PAR2-PKC induzierte Phosphorylierung von MARCKS stellt vor diesem Hintergrund einen weiteren potenziell prometastatisch wirkenden Signalweg dar, der über die Aktivierung von PAR2 in MDA-MB 231 stimuliert wird. Die exakte Rolle von pMARCKS in MDA-MB 231 vor allem hinsichtlich der Migration und der Regulation der Aktinfilamente bedarf jedoch weiteren, genaueren Untersuchungen.

V.1.2 Spezifische Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung durch Teleocidin A2

Trotz mehrerer Ansätze ist die potente Inhibition von PAR2 bisher nicht gelungen und die bis dato identifizierten PAR2 inhibierenden Substanzen sind in ihrer Potenz, ihrer Selektivität und in ihrer reinen antagonistischen Wirkung stark limitiert. Erreichte IC₅₀ *in vitro* lagen lediglich in millimolaren bis mikromolaren Konzentrationen: ENMD-1068 2,5-5 mM; K14585 5-10 µM; GB88 2 µM; C391 1,3 µM (Kelso *et al.*, 2006; Kanke *et al.*, 2009; Suen *et al.*, 2012; Boitano *et al.*, 2015).

Indolalkaloide der A-Reihe der Teleocidine mit offener terpenoider Seitenkette wurden in einem dieser Arbeit vorausgehenden, zellbasierten Screening von ausgewählten Naturstoffen als potenziell PAR2 inhibierende Verbindungen gefunden²¹. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Teleocidin A2 die PAR2 stimulierte intrazelluläre Mobilisierung von Ca²⁺, konzentrationsabhängig mit hoher Wirksamkeit (IC₅₀ 15-25 nM) unterdrückt. Die antagonistische Wirkung war für drei verschiedene Zelllinien, MDA-MB 231, A549 und HUVEC bei Aktivierung der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung mit SLIGKV-NH₂ vergleichbar (s. Tabelle IV.1 im Ergebnisteil). Die Teleocidin A2 Konzentration, die zur 50% igen Inhibition der Trypsin abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung in MDA-MB 231 führte, lag zwischen 10 und 30 nM und war somit mit den IC₅₀ Werten für die Inhibition der SLIGKV-NH₂ abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung vergleichbar. Die Daten konnten eindrucksvoll zeigen, dass Teleocidin A2 die Ca²⁺ Mobilisierung ausgelöst durch zwei strukturell verschiedene PAR2 Agonisten signifikant und gleichsam potent unterdrückt.

Dies steht im positiven Kontrast zu dem PAR2 Peptid-mimetischen Antagonisten K14585 (IC₅₀ 5-10 µM), der lediglich PAR2 Peptid stimulierte Antworten und keine Trypsin stimulierte Signale blockiert (Kanke *et al.*, 2009). In einem weiteren Gegensatz zu bisher publizierten PAR2 Antagonisten, induziert Teleocidin A2 keine signifikanten agonistischen Antworten auf die intrazelluläre Mobilisierung von Ca²⁺ in MDA-MB 231 und HMEC bis Konzentrationen von 1 µM. Der kürzlich publizierte PAR2 Antagonist C391 (IC₅₀ Ca²⁺: 1,3 µM) wirkt bereits partiell agonistisch ab Konzentrationen von 10-30 µM (Boitano *et al.*, 2015).

Anschließend an die Studien zur Inhibition der PAR2 induzierten Ca²⁺ Mobilisierung gliederten sich Experimente zur Untersuchung der Spezifität der Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 an. Dazu wurde Teleocidin A2 gegen die endogen exprimierten GPCRs PAR1 und P2Y getestet. PAR1 diente der Untersuchung der Wirkung von Teleocidin A2 auf einen weiteren Rezeptor aus der Familie der PAR. Purinerge P2Y Rezeptoren werden durch

²¹ Das Screening wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Nicole Teusch durchgeführt.

Nukleotide (ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-Glucose) aktiviert und dienen als Spezifitätskontrolle für einen Liganden aktivierten GPCR. PAR1 und bestimmte ATP und/oder UTP regulierte Untergruppen aus der P2Y Rezeptorfamilie koppeln wie PAR2 an G_q Proteine, sodass die zytosolische Ca^{2+} Konzentration nach der Rezeptoraktivierung als Messparameter gewählt werden konnte. Anhand der hier durchgeführten Versuche wurde die Funktionalität von PAR1 und P2Y in MDA-MB 231 und A549 Zellen nachgewiesen: ATP, TFLLR-NH₂ und Thrombin stimulierten konzentrationsabhängig die intrazelluläre Mobilisierung von Ca^{2+} in beiden Zelllinien. Eine Zusammenfassung ermittelter EC_{50} Werte der Ca^{2+} Mobilisierung der Zelllinien MDA-MB 231, HUVEC und A549, mit denen die Zellen in den Inhibitorstudien stimuliert wurden, sowie der gemessenen IC_{50} für die Inhibition der PAR2, PAR1 und P2Y abhängigen Ca^{2+} Ausschüttung findet sich in Tabelle IV.1 im Ergebnisteil.

Die Evaluierung der Wirkung von Teleocidin A2 auf die Inhibition der Ca^{2+} Ausschüttung über die Rezeptoren PAR1 und P2Y konnte eine signifikant reduzierte inhibitorische Wirksamkeit demonstrieren. PAR1 wurde auf MDA-MB 231 20-fach und auf A549 10-fach signifikant reduziert inhibiert im Vergleich zu PAR2. P2Y wurde auf MDA-MB 231 8-fach, jedoch auf A549 lediglich 3-fach signifikant reduziert inhibiert. Aus diesen Daten ging hervor, dass die inhibitorische Wirksamkeit von Teleocidin A2 auf andere Rezeptoren als PAR2, nicht konstant gleich reduziert war. Die EC_{50} Werte für TFLLR-NH₂ und ATP, gemessen in MDA-MB 231 im Vergleich zu A549, deuten darauf hin, dass sich die Expression beider Rezeptoren auf der Zelloberfläche unterscheidet. Dies kann eine mögliche Erklärung für den Wirkunterschied von Teleocidin A2 auf die Rezeptoren zwischen den beiden Zelllinien sein. Des Weiteren sollte angeführt werden, dass der Rezeptorklasse der purinergen P2Y Rezeptoren 8 Subtypen angehören (Erb und Weisman, 2012). Aufgrund dessen handelt es sich um eine heterogene Gruppe an Rezeptoren, deren G_q Protein gekoppelte Ca^{2+} Freisetzung mit Teleocidin A2 unterdrückt wird.

Die Untersuchung der Teleocidin A2 vermittelten Inhibition der Trypsin versus Thrombin abhängigen intrazellulären Ca^{2+} Mobilisierung konnte die spezifische inhibitorische Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 im Vergleich zu PAR1 unterstreichen. Die Daten belegten, dass auch für den Fall der Rezeptor-aktivierenden Proteasen eine spezifische inhibitorische Wirkung bestand.

Der anti-thrombozytische PAR1 Antagonist Vorapaxar (SCH 530348, Merck), zugelassen durch die FDA 2014, ist der erste vermarktete Wirkstoff aus der Familie der PAR (French *et al.*, 2015). Die Testung von Vorapaxar in Bezug auf die Inhibition der Trypsin versus Thrombin abhängigen intrazellulären Ca^{2+} Freisetzung zeigte eindeutig die potente (IC_{50} etwa 10 nM) und spezifische Wirkung von Vorapaxar auf PAR1 in dem hier verwendeten

funktionalen Assay. Vorapaxar bindet spezifisch an PAR1 auf humanen Blutplättchen mit einer Affinität in niedrigen, nanomolaren Konzentrationen (K_i 8,1 nM) (Hawes *et al.*, 2015).

Die hier durchgeführten Studien konnten erstmals zeigen, dass Teleocidin A2 die PAR2 stimulierte intrazelluläre Mobilisierung induziert durch zwei strukturell verschiedene Agonisten potent und spezifisch gegenüber den GPCR PAR1 und P2Y inhibiert. Die PAR1 und P2Y induzierte Ca^{2+} Mobilisierung in MDA-MB 231 und A549 wurde zwar von Teleocidin A2 unterdrückt, jedoch mit einem signifikanten Wirkverlust im Vergleich zu den für PAR2 gemessenen IC_{50} . Die hier demonstrierten Daten führten zu der Annahme, dass Teleocidin A2 aufgrund seiner spezifischen Wirkung auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Freisetzung gezielt mit bestimmten Rezeptordomänen von PAR2 interagiert. Die genaue Wechselwirkung von Teleocidin A2 mit PAR2 sollte ein Ziel weiterführender Studien sein.

V.1.3 Analyse der Bindung von Teleocidin A2 an PAR2

Anhand der Untersuchung der Ca^{2+} Mobilisierung in den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und A549 konnte ein potenter und spezifischer Effekt von Teleocidin A2 auf die PAR2 induzierte Ca^{2+} Antwort ermittelt werden. Aufgrund des spezifischen Effekts wurde eine direkte Interaktion von Teleocidin mit PAR2 vermutet. Liganden-Bindungstechnologien erfordern meist die Verwendung radioaktiver Liganden, die mit hoher Selektivität und Affinität an den untersuchten GPCR binden und können einen sicheren Beweis dafür erbringen, dass ein Molekül direkt mit dem Rezeptor in Wechselwirkung tritt. Kanke *et al.* entwickelten einen radioaktiv markierten PAR2 Liganden, [3H]2-furoyl-LIGRL-NH₂, der in einem zellbasierten Liganden-Bindungstest von Trypsin, bzw. von dem proteolytisch gespaltenen Aminoterminus oder von PAR2 aktivierenden Peptiden von dem Rezeptor verdrängt wurde. Die Verdrängung von [3H]2-furoyl-LIGRL-NH₂ durch agonistische, nicht-markierte Peptide stimmte mit ihrer agonistischen Wirkung in Bezug auf die intrazelluläre Mobilisierung von Ca^{2+} überein. Sie wurde von unwirksamen Peptiden nicht beeinflusst, sodass von einer spezifischen Interaktion mit PAR2 ausgegangen wurde (Kanke *et al.*, 2005).

Teleocidin A2 wurde in dieser Arbeit in einem solchen Assay, durchgeführt von der Firma CEREP (Celle l'Evescault, Frankreich) auf die Interaktion mit PAR2 in Konkurrenz mit dem spezifischen Liganden [3H]2-furoyl-LIGRL-NH₂ analysiert. In Konzentrationen, die die PAR2 abhängige Mobilisierung von Ca^{2+} potent (500 nM) und maximal (5 μ M) inhibieren, wurde mit Teleocidin A2 keine Inhibition der spezifischen Bindung von [3H]2-furoyl-LIGRL-NH₂ detektiert. Basierend auf diesem Ergebnis wurde vermutet, dass Teleocidin A2 nicht mit der direkten Bindung von SLIGKV-NH₂ oder dem proteolytisch gespaltenen Aminoterminus an PAR2 in Konkurrenz tritt.

Die genaue Analyse der strukturellen Liganden-Rezeptor Interaktion kann nur durch Co-Kristallisation des Liganden-Rezeptor-Komplex oder durch 3D-Strukturanalysen erreicht werden. Für Vorapaxar in Verbindung mit PAR1 konnte eine ungefähre Interaktion des PAR1 Antagonisten mit einzelnen Aminosäuren des Rezeptors erhalten werden (Zhang *et al.*, 2012). Die Kristallisation von GPCRs ist jedoch aufgrund niedriger endogener Expressionslevel der Rezeptoren, ihrer hohen Flexibilität und ihrer funktionalen Extraktion aus der Membran nicht trivial. Die Kristallisation und Strukturaufklärung des β 2-adrenergen Rezeptors wurde 2012 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Generell sind nicht radioaktive Ansätze in Studien zur Liganden-Rezeptor Interaktion gering verbreitet. Grund hierfür ist, dass sich das Anhängen fluoreszierender Gruppen an Moleküle ohne Beeinflussung der Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor unter anderem durch die sterische Hinderung als chemisch komplex herausgestellt hat. Eine wenige fluoreszierende Derivate von natürlichen Teleocidinen oder Indolactam V konnten synthetisiert werden (Nakagawa, 2012; Sugimoto *et al.*, 2008), jedoch besaßen diese Analoga eine schwache biologische Aktivität in Bezug auf das beschriebene Zielprotein PKC (Irie *et al.*, 1989). Dennoch konnte in zellbasierten Aufnahmestudien beobachtet werden, dass die Behandlung von Hela Zellen mit fluoreszierenden Indolactam V Analoga zu einer Verteilung dieser innerhalb des Zytoplasmas führte (Irie *et al.*, 1989). Nakae *et al.*, 2006 beobachteten, dass GFP (Green fluorescent protein) fusionierte PKC α und PKC θ in transfizierten Zellen durch die Behandlung mit PMA (100 nM), Teleocidin A (100 nM) und einem weiteren Teleocidin Analog aus *Streptomyces* an die Plasmamembran transloziert wurde. Basierend auf diesen Literaturdaten kann angenommen werden, dass Teleocidin A2 Plasmamembran-gängig sein könnte und die PAR2 und G_q Protein abhängige Signalkaskade potenziell an der zytosolischen Seite der Plasmamembran unterdrückt. Ausgehend von dieser Überlegung, sollte in Betracht gezogen werden, dass Teleocidin A2 und die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Indolactam V Derivate PAR2 potenziell indirekt inhibieren. Es ist nicht auszuschließen, dass die Inhibition durch Wechselwirkungen mit nachgeschalteten Signalproteinen, wie G_q Proteinen, PLC oder Membranphospholipiden oder PKC eintritt. Daten aus dieser Arbeit konnten in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass die Teleocidin A2 (20 nM) abhängige Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung in MDA-MB 231 durch den PKC Inhibitor Gö6983 aufgehoben werden konnte. Dies kann darauf hinweisen, dass eine Interaktion von Teleocidin A2 mit zellulärer PKC möglicherweise an dem Inhibitionsmechanismus beteiligt ist. Erste Rückschlüsse auf eine Interaktion der Verbindungen mit anderen Zielproteinen der Zelle als PKC, konnten Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit photolabilen Teleocidin Derivaten liefern (Irie *et al.*, 1993; Nakagawa, 2012). Hinzu zufügen sind ältere Studien, die demonstrieren konnten,

dass Verbindungen aus der Substanzklasse der Teleocidine mit Lipiddoppelschichten von Membranen interagieren können (Nam *et al.*, 1989) und die Aktivität von Phospholipase A2 steigern können (Nam *et al.*, 1990).

V.1.4 Zielprotein unabhängige Wirkungen von Teleocidin A2

Das Ziel eines potenten und selektiven PAR2 Inhibitors ist die Ausschaltung von PAR2 und die damit im Zusammenhang stehende Unterdrückung Rezeptor-abhängiger Signalwege. Dabei sind potenzielle unspezifische Nebenwirkungen der Substanz nicht erwünscht. Teleocidine wurden jedoch als toxische Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces* sowie aus dem marinen Cyanobakterium *Moorea producens* beschrieben. Metabolite aus dem Cyanobakterium, unter anderem das Lyngbyatoxin A, können akute dermale Läsionen bei Schwimmern verursachen (Osborne *et al.*, 2001).

Die Experimente der Arbeit legten dar, dass eine zytotoxische Wirkung von Teleocidin A2 auf MDA-MB 231, bei einer Kontaktzeit von 24 h in den für die Inhibition von PAR2 relevanten nanomolaren Konzentrationsbereichen ausgeschlossen werden kann (III.4.1). Anhand des durchgeführten Viabilitätstests konnte ebenso keine Teleocidin A2 abhängige proliferationsfördernde Wirkung auf MDA-MB 231 nachgewiesen werden.

Teleocidinen wurden in der Vergangenheit hauptsächlich tumorpromovierende Eigenschaften zugeordnet (Imamoto *et al.*, 1993). Die Interaktion von Teleocidinen mit PKC Isoformen ist laut diverser Studien in den Mechanismus der Teleocidin induzierten Tumorprogression involviert, jedoch ist die exakte effektive Konzentration nicht hinreichend bekannt. Sie wurde zum größten Teil in biochemischen Assays evaluiert und variiert zwischen nanomolaren bis mikromolaren Konzentrationen. In radioaktiven PKC Assays konnte die Aktivierung von PKC mit 100 nM eines nicht definierten Teleocidin Derivats (Arcoleo und Weinstein, 1985) sowie mit 1-10 μ M Teleocidin A2 (Imamoto *et al.*, 1993) nachgewiesen werden. In einem zellbasierten Assay aktivierte das die Teleocidin Grundstruktur repräsentierende Indolactam V in einer Konzentration von 200 nM das zelluläre PKC Substrat MARCKS (Meseguer *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der spezifische PKC Inhibitor Gö6983 inhibitorisch und konzentrationsabhängig (1, 10, 100 nM) auf die Teleocidin A2 (20 nM) abhängige Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung in MDA-MB 231 wirkt. Daher wurde angenommen, dass eine Teleocidin A2 abhängige Interaktion mit zellulärer PKC möglicherweise an dem Inhibitionsmechanismus von Teleocidin A2 beteiligt sein könnte. Ein genereller PKC vermittelter Effekt kann auch mit der Inhibition der Ca^{2+} Mobilisierung vermittelt über die

GPCR PAR1 und P2Y einhergehen, erklärt jedoch nicht die signifikant gesteigerte inhibitorische Wirkung gegenüber PAR2.

Der Phorbolster und PKC Aktivator PMA ist laut älteren Studien in der Lage die Bradykinin (Peptidhormon) abhängige Bildung von IP₃ und die Freisetzung von Ca²⁺ zu blockieren (Luo *et al.*, 1995). Ähnlich zu der durch Gö6983 erreichten Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Teleocidin A2, resultierte die Behandlung der Zellen mit dem PKC Inhibitor Staurosporin (1 µM) in der Inhibition des PMA vermittelten Effekts. Diese Daten lassen darauf schließen, dass ein potenzieller, genereller Effekt einer PKC Aktivierung durch PMA und Teleocidine auf die Ca²⁺ Freisetzung über GPCR bestehen könnte.

Die Untersuchung von Teleocidin A2 im zellbasierten MARCKS Sandwich-ELISA konnte zeigen, dass Teleocidin A2 in nanomolaren Konzentrationen (25 nM) eine signifikante Phosphorylierung von MARCKS in MDA-MB 231 hervor rief. Teleocidine und Phorbolster aktivieren cPKC und nPKC, jedoch nicht aPKC (Yanagita *et al.*, 2007). MARCKS wird ebenso ausschließlich durch aktive cPKC und nPKC phosphoryliert (Herget *et al.*, 1995), sodass angenommen werden konnte, dass die Phosphorylierung von MARCKS auf der Teleocidin A2 vermittelten Aktivierung von cPKC oder nPKC beruhte. So zeigte auch Teleocidin A2 eine signifikante Aktivierung des potenziell prometastatisch wirkenden MARCKS Protein (vergleiche Kapitel V.1.1).

Teleocidin A2 führte in den hier durchgeführten Studien zur intrinsischen agonistischen Aktivität nicht zur intrazellulären Mobilisierung von Ca²⁺. Zusammenfassend deutete dies darauf hin, dass Teleocidin A2 die PKC Ca²⁺ unabhängig aktiviert. Teleocidin A2 konnte die PAR2 abhängige Ca²⁺ Ausschüttung selektiv gegenüber PAR1 unterdrücken. Dagegen konnte anhand des pMARCKS ELISA gezeigt werden, dass Teleocidin A2 die PAR2 sowie PAR1 abhängige PKC Aktivität nicht verringert sondern vergleichbar verstärkt hat. Dabei war der Grad der PKC Aktivität mit dem in ausschließlich mit Teleocidin A2 behandelten Zellen vergleichbar. Möglich wäre, dass Teleocidin A durch Inhibition der Ca²⁺ Mobilisierung die PAR2/Ca²⁺/DAG abhängige PKC Aktivierung reduziert, dieser Effekt aber durch die gleichzeitige PKC Aktivierung über einen Ca²⁺ unabhängigen Mechanismus nicht nachweisbar war.

Der molekulare Mechanismus der Tumorpromotion durch Substanzen die der Klasse der Teleocidine angehören, ist potenziell PKC vermittelt, jedoch nicht hinreichend aufgeklärt (Imamoto *et al.*, 1993). Tumorpromotoren binden an C1 Domänen in den regulatorischen Regionen von PKC. Sie können dort den sekundären Botenstoff DAG imitieren (Irie *et al.*, 2004), dabei ist ihre Bindung jedoch weniger transient, sodass es zu einer verlängerten Aktivierung der PKC kommt. Dies resultiert in der Dephosphorylierung der PKC und ihrer

subsequenten Degradation (Hansra *et al.*, 1999). Die chronische Stimulation von Zellen mit PKC Aktivatoren führte deshalb eher zu einer Herabregulation von Mitgliedern aus der PKC Genfamilie (Meseguer *et al.*, 2000). Neuere Studien kamen zu dem Schluss, dass PKC eine potenzielle tumorsuppressive Rolle einnimmt, da gezeigt werden konnte, dass sich Funktionsverlustmutationen, die sich negativ auf die PKC Aktivität auswirkten, positiv auf die Tumorentwicklung auswirkten (Antal *et al.*, 2015). So kann angenommen werden, dass eine wiederholte Applikation mit Phorbolestern und Teleocidinen die Herabregulation von PKC und somit eine auf längere Sicht reduzierte PKC Aktivität fördern und diese Mechanismen zu der tumorpromovierenden Wirkung beitragen.

Zusammenfassend bedeutet die potente Aktivierung von PKC Isoformen durch Teleocidin A2 einen unerwünschten und negativen Nebeneffekt für die Verwendung von Teleocidin A2 als potente PAR2 inhibierende Verbindung. Daher sollte ein Hauptfokus des medizinisch chemischen Ansatzes zur Identifizierung neuer, chemisch synthetisierter PAR2 inhibierender Indolactam V Derivate, auf die Reduzierung der PKC Aktivierung gelegt werden.

V.1.5 PAR2 stimulierte Migration von Tumorzellen und der Einfluss von PAR2 auf das Aktinzytoskelett

Die Auswahl der Zelllinie MDA-MB 231 für die Untersuchung der PAR2 stimulierten Migration und der Charakterisierung des Effekts von Teleocidin A2 auf die Zellmotilität begründete sich auf den Experimenten zur PAR2 stimulierten Ca^{2+} Mobilisierung mit Trypsin und SLIGKV-NH₂ sowie auf der PAR2 Expressionsanalyse mittels qPCR. Die Daten aus beiden Experimenten weisen auf eine, in Übereinstimmung mit den Literaturdaten, erhöhte Expression von PAR2 in MDA-MB 231 hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit legten eindeutig eine erhöhte Chemokinese von MDA-MB 231 nach Stimulation mit der PAR2 aktivierenden Protease Trypsin (5 nM) und dem synthetischen Peptid SLIGKV-NH₂ (25 nM) dar. Anhand eines Viabilitätstests konnte nachgewiesen werden, dass es in MDA-MB 231, PAR2 abhängig nicht zu einer verstärkten Proliferation kam und die beobachtete Chemokinese dadurch nicht auf einen proliferativen Effekt, ausgelöst durch die PAR2 Agonisten, zurückzuführen war.

Jedoch muss angeführt werden, dass eine PAR2 abhängige Proliferation von Tumorzelllinien von dem untersuchten Zelltyp abhängig ist und variieren kann. So zeigen MDA-MB 231 Zellen nach der Stimulation mit PAR2 Agonisten keine Proliferation. Übereinstimmend mit den Resultaten aus dieser Arbeit, fanden Su *et al.* eine Trypsin und SLIGKV-NH₂ hochregulierte Migration, jedoch konnten sie ebenso keinen Effekt der Agonisten auf die Zellproliferation nachweisen. Dagegen konnte in intrahepatischen Gallengangskarzinomzellen (Nakanuma *et al.*, 2010), pankreatischen Tumorzellen (Xie *et al.*, 2015) sowie

Kolonkarzinomzellen (Wu *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013) eine PAR2 abhängige Proliferation detektiert werden.

Die gesteigerte Zellmotilität ist im Allgemeinen ein Kennzeichen von metastasierenden Zellen. In einer ganzen Reihe unterschiedlicher Tumorzellen, darunter vor allem in aggressiven Mammakarzinomzellen, nimmt PAR2 eine kritische Rolle in der Regulation und Stimulation der Zellmigration ein. PAR2 Agonisten zeigen keine Wirkung als Chemoattraktans, sondern wirken vielmehr chemotaktisch (Shi *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass in Transwellkammern, in denen Zellen durch eine Membran aus der oberen Kammer in die untere Kammer migrieren können, Trypsin und SLIGKV-NH₂ die Migration von MDA-MB 231 in Richtung eines Lockstoffs steigerten, jedoch eingesetzt als Lockstoff keine Wirkung auf die gerichtete Wanderung ausübten (Su *et al.*, 2009).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene, PAR2 abhängige Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS, legte nahe, dass die PKC in der PAR2 regulierten Signalkaskade in MDA-MB 231 aktiviert wird. Die Untersuchung des PKC Inhibitors Gö6983 im pMARCKS ELISA konnten zeigen, dass die PAR2 (SLIGKV-NH₂) und PKC abhängige Phosphorylierung von MARCKS in MDA-MB 231 durch den Inhibitor bei 100 nM signifikant unterdrückt wurde. Weiterhin zeigten hingegen die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem PKC Inhibitor Gö6983 im Migrationstest, dass die Inhibition der PKC, die PAR2 stimulierte Migration von MDA-MB 231 nicht signifikant unterdrückte. Diese Daten ließen die Annahme entstehen, dass die Inhibition der PKC in der PAR2 regulierten Signalkaskade keine sehr ausschlaggebende Wirkung auf die PAR2 abhängige Migration von MDA-MB 231 hat.

Der Einfluss der PKC auf die PAR2 stimulierte Migration von Tumorzelllinien wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht. Insbesondere in Studien zur Untersuchung der Rolle von PAR2 in der Darmkrebszelllinie SW620 wurde PKC als Regulator der Zellmigration charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine PAR2 stimulierte Migration von der PKC α und einer subsequenten Aktivierung von ERK1/2 abhängt (Wu *et al.*, 2013). In Mammakarzinomzelllinien, darunter vor allem die in Hinblick auf PAR2 gut charakterisierte Zelllinie MDA-MB 231, wurden dagegen vielmehr PAR2 abhängige ERK1/2 oder GTPase (Rac1 und RhoA) Signale dokumentiert, die in den Mechanismus der Migration involviert sind (Morris *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2009).

Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit der Einfluss eines Rac1 (EHop-016) und eines ROCK1/2 (Y27632) Inhibitors auf die PAR2 stimulierte Migration und Organisation von Aktinstrukturen im Zytoskelett von MDA-MB 231 untersucht. Die Anfärbung von F-Aktin in MDA-MB 231 mit Alexa Fluor Phalloidin konnte eine PAR2 abhängige Formation distinkter

Stressfasern im Zytoplasma nachweisen. Dieser PAR2 stimulierte Effekt auf das Aktinzytoskelett wurde durch die Vorinkubation mit dem ROCK1/2 Inhibitor Y27632 reduziert, sodass von einer Funktion von RhoA und ROCK1/2 in der PAR2 regulierten Signalkaskade in MDA-MB 231 ausgegangen werden konnte.

In verschiedenen Zelltypen wurde abhängig von PAR2 eine G-Protein und RhoA GTPase regulierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Form von Filopodien, Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten dokumentiert (Greenberg *et al.*, 2003; Klarenbach *et al.*, 2003). Die RhoA vermittelte Formation von Stressfasern könnte dabei über eine Aktivierung von $G_{12/13}$ laufen (Suen *et al.*, 2014). Die Kinase ROCK ist ein nachgeschaltetes Effektorprotein von RhoA und reguliert die Ausbildung von Stressfasern und Adhäsionspunkten (Amano *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse der Testung von Y27632 im Migrationstest konnten des Weiteren zeigen, dass die Inhibition von ROCK1/2 mit Y27632 in einer signifikanten Steigerung der PAR2/SLIGKV-NH₂ stimulierten Chemokinese von MDA-MB 231 resultierte. Ein Viabilitätstest legte dar, dass die Proliferation von MDA-MB 231 unter der Bedingung Y27632/SLIGKV-NH₂ nicht beeinflusst war, sodass ein stimulierender Effekt auf das Zellwachstum ausgeschlossen werden konnte. Der beobachtete, stark promigratorische Effekt wurde dagegen bei Y27632 und Trypsin nicht nachgewiesen. Eine Erklärung hierfür könnten die eingesetzten Konzentrationen von Trypsin und SLIGKV-NH₂ sein, die der EC₅₀ (Trypsin) bzw. der EC₈₀ (SLIGKV-NH₂) der jeweiligen Aktivierung der intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung entsprachen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich PAR2 Agonisten in der Stimulation nachgeschalteter Signalwege unterscheiden können. Dieses Phänomen wird als funktionale Selektivität eines Agonisten bezeichnet (Hollenberg *et al.*, 2014). Ein möglicher, jedoch rein hypothetischer Grund für den Unterschied der Wirkung von SLIGKV-NH₂ und Trypsin in Kombination mit Y27632, wäre daher eine funktionale Selektivität von SLIGKV-NH₂ und Trypsin aufgrund ihrer Struktur bezüglich der Aktivierung von RhoA.

In bestimmten Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass sich eine verstärkte Aktivierung der GTPase RhoA inhibitorisch auf die Zellmigration auswirkte (McHardy *et al.*, 2004). Unter anderem wurde gezeigt, dass ein hoher Spiegel an aktiver ROCK1/2 Kinase in MDA-MB 231, der abhängig von der Aktivität der GTPase RhoA war, in der gesteigerten Phosphorylierung von Cofilin und der Stabilisation eines extensiven und wenig flexiblen Netzwerks aus Aktinfilamenten resultierte (Brew *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung von Cofilin durch die LIMKinase, einem Effektorprotein von ROCK1/2, führte wiederum zu der Deaktivierung des Aktin-destabilisierenden Proteins Cofilin (Scott und Olson, 2007). Chen *et al.* zeigten 2005 in diesem Zusammenhang, dass die übermäßige Deaktivierung von Cofilin

zu einer eingeschränkten Depolymerisierung von Aktinfilamenten und zu ihrer Stabilisation führen kann. Diese Stabilisation von Aktinfilamenten wiederum könnte sich inhibitorisch auf die Beweglichkeit der Zellen auswirken.

MDA-MB 231 charakterisieren sich durch die konstitutive Aktivierung und Überexpression von RhoA (Pillé *et al.*, 2005). Aus diesem Grund kann theoretisch angenommen werden, dass es in dieser Zelllinie durch eine Aktivierung von PAR2 zu einer stark erhöhten RhoA abhängigen ROCK1/2 Aktivierung kommen könnte, die potenziell in einem starren und weniger flexiblen Aktinnetzwerk resultiert. Sobald dann ein Großteil der aktiven ROCK1/2 Kinase (konstitutiv und PAR2 aktiviert) durch Y27632 inhibiert wird, könnte es dadurch zu einer erhöhten Flexibilität von Aktin und einer erhöhten Migration, auch über die nachfolgend beschriebenen Signalwege, kommen. Ein mit dem in dieser Arbeit beobachteten, vergleichbarer Effekt konnte in Lipoprotein A (LPA) stimulierten MDA-MB 231, die ebenso mit Y27632 behandelt wurden, nachgewiesen werden (Harrison *et al.*, 2013).

Eine Aktivierung von PAR2 mit nachgeschalteter Signalweiterleitung über das Adapterprotein β -Arrestin kann außerdem die Deaktivierung der LIMK und die Aktivierung der Phosphatase Chronophin (CIN) regulieren. Dies resultiert in der Dephosphorylierung und Aktivierung des Aktin-destabilisierenden Proteins Cofilin in Brustkrebszellen (Zoudilova *et al.*, 2007) und steht somit der ROCK1/2 abhängigen Aktivierung der LIMK entgegen. Die Colokalisierung von β -Arrestin, CIN, LIMK und Cofilin vereinfacht die lokale Generation freier F-Aktin Enden in Membranvorstülpungen und wirkte sich stimulierend auf die Zellbeweglichkeit und Tumormetastase aus (Zoudilova *et al.*, 2010).

Letztendlich wurde die Rolle der GTPase Rac1 in der PAR2 regulierten Migration untersucht. In den hier durchgeführten Studien reduzierte der Rac1 Inhibitor EHop-016 die PAR2 abhängige SLIGKV-NH₂ und Trypsin abhängige Chemokinese von MDA-MB 231 signifikant. Die Daten legen nahe, dass die GTPase Rac1 eine entscheidende Rolle in der PAR2 regulierten Migration von MDA-MB 231 einnimmt. Die Inhibition von Rac1 mit EHop-016 resultierte in einer diffusen Färbung von Aktinstrukturen vergleichbar mit der in nicht stimulierten Zellen. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass Rac1 in die Signalweiterleitung von PAR2 involviert ist, die zu der PAR2 abhängigen Reorganisation der Aktinfasern im Zytoplasma von MDA-MB 231 führt. So wurde geschlussfolgert, dass die PAR2 stimulierte Chemokinese von MDA-MB 231 vornehmlich über Rac1 angestoßen wird.

Die G_i, c-Src-Tyrosinkinase regulierte Aktivierung von Rac1 in Brustkrebszellen führte PAR2 abhängig zu einer gesteigerten Aktivierung von JNKinasen und der Phosphorylierung von Paxillin. Das Adapterprotein Paxillin rekrutiert weitere Enzyme in Adhäsionspunkte und nimmt so Einfluss auf die Beweglichkeit von Zellen (Schaller, 2001; Su *et al.*, 2009).

V.1.6 Inhibition der PAR2 stimulierten Migration durch Teleocidin A2 und der Einfluss von Teleocidin A2 auf das Aktinzytoskelett

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkung des Naturstoffs Teleocidin A2 auf die PAR2 regulierte Signalkaskade wurde der Effekt von Teleocidin A2 auf die PAR2 stimulierte Migration von MDA-MB 231 untersucht. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass Teleocidin A2 (25 nM) die SLIGKV-NH₂ und Trypsin stimulierte Chemokinese signifikant unterdrückt und die Inhibition nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurückzuführen war.

Der Wachstumsfaktor EGF reguliert die GTPasen Rac1 und Cdc42 sowie nachgeschaltet die GTPase RhoA und stimuliert die Zellmigration (Kurokawa *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2003; Ridley *et al.*, 1992). EGF fungierte als Kontrolle und führte zu der Formation von Lamellipodien aus netzartig angeordneten Aktinfasern am Leitsaum der Zelle und ausgeprägten Stressfasern im hinteren Zellkörper, sowie außerdem zu einer signifikanten Steigerung der Chemokinese von MDA-MB 231 Zellen.

Die PAR1 stimulierte Migration von Tumorzellen wurde beschrieben (Shi *et al.*, 2004) und konnte mittels der hier durchgeführten Versuche für MDA-MB 231 verifiziert werden. Anhand der Untersuchungen zur Inhibition der EGF und PAR1 stimulierten Migration mit Teleocidin A2 sollte ein spezifischer Effekt von Teleocidin A2 auf die PAR2 stimulierte Migration evaluiert werden. Die Resultate der Behandlung von MDA-MB 231 mit Teleocidin A2 zeigten, dass sowohl die EGF, als auch die TFLLR-NH₂/PAR1 stimulierte Migration von Teleocidin A2 signifikant supprimiert wurden. Demnach zeigte Teleocidin A2 keinen detektierbar spezifischen Effekt auf die PAR2 abhängige Migration.

Eine Studie konnte belegen, dass Indolalkaloide (Teleocidin und Lyngbyatoxin A) und Phorbolster (PMA) die EGF stimulierte Tyrosin-spezifische Phosphorylierung des enzymgekoppelten EGFR blockieren. Die spezifische Bindung radioaktiv-markierter EGF Moleküle wurde dabei nicht beeinflusst (Friedman *et al.*, 1984), sodass es wahrscheinlich ist, dass Teleocidin A2 EGF nicht von seiner orthosterischen Bindestelle verdrängt. Price *et al.*, 1999 beschreiben die Regulation der EGF stimulierten Migration von MDA-MB 231, abhängig von Phospholipase C und Phosphatidylinositol 3'-Kinase. PLC ist auch in die Signalkaskade G_q gekoppelter PAR2 und PAR1 Rezeptoren involviert. Dadurch stellt PLC ein mögliches Zielprotein dar, das als Angriffspunkt von Teleocidin A2 auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran in Frage kommen könnte. Die Aufklärung der genauen Zielstruktur, über die Teleocidin A2 intrazelluläre Signalkaskaden modulieren kann, bedarf allerdings einer weiteren intensiven Analyse.

Des Weiteren konnten die Daten dieser Arbeit demonstrieren, dass Teleocidin A2 in der Lage ist, den PAR2 aktivierten Effekt auf das Aktinzytoskelett in Form von prominenten Stressfasern aufzuheben. Die Daten führten darüber hinaus zu der Annahme, dass Teleocidin A2 die Motilität und Chemokinese von MDA-MB 231 einschränkt, in dem es auf das Aktinzytoskelett wirkt und eine Reorganisation der Aktinstrukturen hervor ruft. Die Anfärbung der Aktinfasern nach der Inkubation von MDA-MB 231 mit Teleocidin A2 zeigten außerdem, dass Teleocidin A2, in Kombination mit SLIGKV-NH₂ oder alleine, zu einer sehr deutlichen Verdichtung der Aktinstruktur zentral im Zytoplasma sowie an den Zellrändern führt.

Ähnliche Teleocidin abhängige Effekte konnten in Fibroblasten beobachtet werden. Die Fibroblasten zeigten eine erhöhte Zellspreizung sowie die Polymerisierung von Aktin an der Plasmamembran als Antwort auf ihre Behandlung mit einer heterogenen Teleocidinmischung. Die Proteine Proteinkinase D und Rac1 sind dabei in den assoziierten Signalweg involviert (Deng *et al.*, 2010). In MDA-MB 231 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Inhibition der PKC mit dem spezifischen PKC Inhibitor Gö6983 die Teleocidin A2 abhängige Reorganisation des Aktinzytoskeletts einschränkt. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass Teleocidin A2 eine weitere, vermutlich PAR2 unabhängige, aber möglicherweise PKC abhängige Rolle in der Regulation und Umordnung des Aktinzytoskeletts spielt. Diese eindeutige und potente Wirkung des Teleocidin A2 auf die Anordnung der Aktinstrukturen könnte mit einer unspezifischen Inhibition der PAR2, PAR1 sowie einer EGF stimulierten Migration einhergehen.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte eindeutig gezeigt werden, dass PAR2 über die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 Einfluss auf Anordnung von Aktin im Zytoskelett nimmt und dies im Zusammenhang steht mit der PAR2 stimulierten Chemokinese. Diese Daten unterstützen, auch in Verbindung mit der durchgeführten PAR2 Expressionsanalyse in MDA-MB 231 und HMEC, die Rolle von PAR2 als potenziell krebsrelevantes Target, das 1) in Tumorgewebe und -zelllinien hochreguliert ist und 2) eine promigratorische und damit prometastatische Wirkung hat. Der untersuchte Naturstoff Teleocidin A2 inhibierte 1) die PAR2 induzierte, G_q abhängige intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺ potent und spezifisch gegenüber PAR1 und P2Y und supprimierte 2) die PAR2 stimulierte Chemokinese und beeinflusste 3) die PAR2 induzierte Anordnung der Aktinfasern (Abbildung V.1).

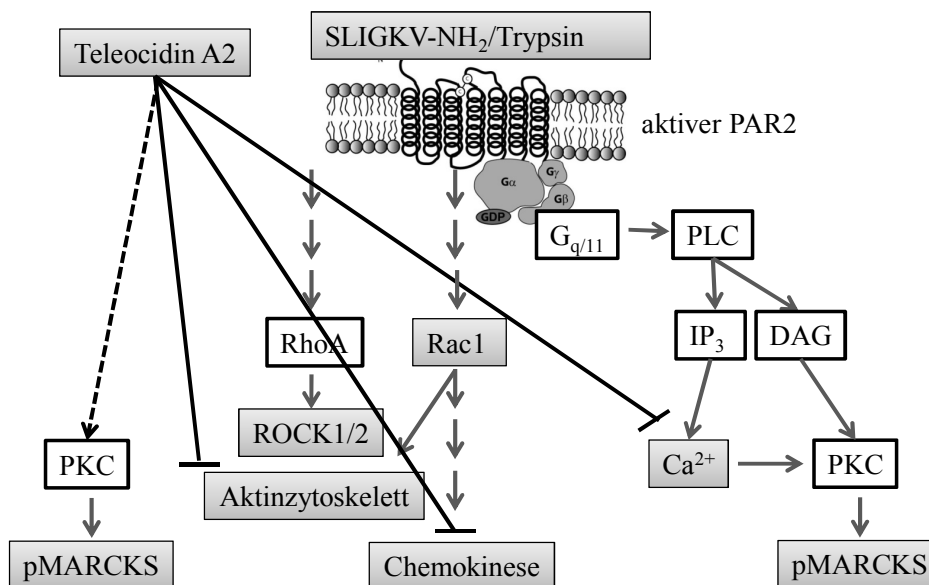


Abbildung V.1: Die Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 stimulierte Signale

Basierend auf diesen Daten wurde die Testung weiterer Teleocidin Naturstoff Derivate aus einer Substanzbibliothek in Bezug auf die Inhibition von PAR2 und ein medizinisch chemischer Ansatz zur Entwicklung neuer Derivate basierend auf Indolactam V in Betracht gezogen.

V.2 Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung PAR2 inhibierender Teleocidine und Indolactam V Derivate

V.2.1 Untersuchungen zur Struktur abhängigen Wirkung von Teleocidinen

Der Naturstoff Teleocidin A2 zeigte auf den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und A549 sowie auf primären HUVEC eine potente Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung. Aufgrund dessen wurden weitere Verbindungen aus der Klasse der Teleocidine hinsichtlich ihrer Struktur abhängigen Wirkung in Bezug auf die Inhibition der PAR2 abhängigen intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung getestet. Dazu stand eine Auswahl von 9 verschiedenen Naturstoffderivaten aus *Streptomyces species* und einer synthetisch hergestellten Teleocidin Verbindung (IMD4) zu Verfügung. Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass eine Hydroxygruppe am C₁₄ Atom des Moleküls ausschlaggebend für die inhibitorische Aktivität von Teleocidinen gegen PAR2 ist. Die Teleocidine, die am C₁₄ eine Methoxy- anstatt einer Hydroxygruppe besitzen, erzielten keine wirksame Inhibition der PAR2 abhängigen intrazellulären Ca²⁺ Freisetzung. Somit konnte eine vorläufige Struktur-Aktivitätsbeziehung identifiziert werden, wobei anzumerken ist, dass der genaue Zielort der Wirkung noch nicht identifiziert wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Teleocidine konventionelle und neue PKC Isoformen aktivieren können (Hansra *et al.*, 1999). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine PKC stimulierte Phosphorylierung des PKC Substrats pMARCKS durch Teleocidin A2 in MDA-MB 231 demonstriert. Es wurden Untersuchungen zur strukturabhängigen Wirkung von Teleocidinen in Bezug auf PKC Isoformen durchgeführt, die zeigten, dass eine freie Hydroxygruppe am C₁₄ wichtig ist für die Affinität zu PKC und dementsprechend für die biologische Aktivität in Bezug auf PKC (Meseguer *et al.*, 2000). Ein Strukturmodell zur Bindung von Indolactam V an PKC δ schlägt die folgenden Wechselwirkungen vor: A) die Ausbildung von insgesamt drei Wasserstoffbrücken, ausgehend von dem Carbonylsauerstoff am C₁₁ Atom, von dem Wasserstoffatom am Stickstoff an Position 10 und von der freien Hydroxygruppe am C₁₄ (Irie *et al.*, 2004) und B) die Beteiligung des Indolrings von Indolactam V in die CH/ π Interaktion mit dem Prolinrest 11 der C1B Domäne von PKC δ (Nakagawa, 2012; Nakagawa *et al.*, 2005).

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der Spezifität der potenten Teleocidin Naturstoff-Verbindungen konnten zeigen, dass Teleocidin A2 mit einer offenen terpenoiden Seitenkette am C₇ Atom des Moleküls die PAR2 abhängige intrazelluläre Ca²⁺ Mobilisierung mit erhöhter Spezifität inhibiert. Dagegen belegten die Experimente, dass die Teleocidine der B-Reihe, bei denen die Seitenkette zu einem Ring geschlossen ist (Hitotsuyanagi *et al.*, 1984), keine nennenswerte spezifische Wirkung auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung zeigten. Die spezifische Wirkung auf PAR2 wurde, wie zuvor für Teleocidin A2, durch die Testung der Derivate gegen die GPCR PAR1 und P2Y im funktionalen Assay bei konstanter agonistischer Konzentration evaluiert.

Im Kontrast zu der hier beobachteten, unterschiedlichen blockierenden Wirkung der A und B Teleocidine auf PAR1 wurde in der Literatur beschrieben, dass die verschiedenen Isomere von Teleocidin A und B trotz ihrer strukturellen Unterschiede, eine identische tumorpromovierende Aktivität aufweisen (Fujiki *et al.*, 1988).

Die Unterschiede in der Wirkung von Teleocidinen auf die PAR2 und PAR1 stimulierte Ca²⁺ Mobilisierung, sprechen für eine PAR2 spezifische Wirkung von Teleocidinen, die abhängig von bestimmten funktionellen Gruppen am Molekül ist. Die Untersuchungen zu möglichen struktur abhängigen Wirkunterschieden von Teleocidinen auf die PAR2 stimulierte Ca²⁺ Mobilisierung begründeten die Basis für die Durchführung eines medizinisch chemischen Ansatzes zur Generierung neuer Indolactam V Derivate mit dem Ziel wirksame PAR2 Inhibitoren zu identifizieren.

V.2.2 Untersuchungen zur Struktur abhängigen Wirkung von Indolactamen

Indolactam V (IL-V) stellt das Grundgerüst der pharmazeutisch relevanten Naturstoffklasse der Teleocidine dar und wurde als Leitstruktur für die Totalsynthese von Strukturderivaten zur potenten und spezifischen Inhibition von PAR2 ausgewählt²². IL-V wurde zwar tumorpromovierende Eigenschaften und eine Affinität zu PKC zugeschrieben, jedoch mit deutlich reduzierter Wirksamkeit im Vergleich zu Teleocidin A oder B (Nakagawa, 2012). Auch mit diesem Hintergrund eignete sich IL-V als Leitstruktur für die Synthese potenter PAR2 inhibierender Verbindungen mit dem Ziel gleichzeitig die Affinität zu PKC Isoformen, die bei Teleocidin A2 gegeben ist, zu reduzieren.

Die Untersuchungen zur strukturabhängigen Wirkung von Teleocidinen auf die Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung belegten, dass die Hydroxygruppe am C_{14} Atom des Teleocidin Moleküls essenziell für die inhibitorische Wirkung auf das Zielprotein ist. Aufgrund dessen wurde eine Substitution von IL-V an dieser Position ausgeschlossen. Dementsprechend resultierte eine Silylschutzgruppe am C_{14} des IL-V in einem Wirkverlust in Bezug auf die PAR2 Inhibition. Weiterhin führte der Austausch der Methylgruppe am C_{13} Atom von IL-V gegen ein Wasserstoffatom oder eine Ethylgruppe zu einer stark eingeschränkten Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Substitutionen an Position 13 durchgeführt. Das Stickstoffatom an Position 1 wurde aufgrund dessen als Ansatzpunkt für die weitere Optimierung von IL-V ausgewählt (Abbildung V.2).

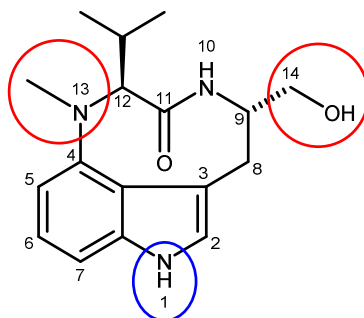


Abbildung V.2: Indolactam V

Die freie Hydroxygruppe am C_{14} , sowie die Methylgruppe am N_{13} des Moleküls konnten als essentielle Gruppen für die biologische Wirksamkeit identifiziert werden. Weitere Substitutionen erfolgten am Stickstoff an Position 1 (N_1).

Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die IL-V Derivate **388**, **401**, **405** und **411** eine potente Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Mobilisierung in MDA-MB 231 zeigten. Die Wirkung war equipotent zu Teleocidin A2 und konnte im Vergleich zu IL-V als Ausgangsstruktur etwa 3-fach gesteigert werden. Die Strukturen der potenten IL-V Derivate werden in Abbildung V.3 gezeigt. Die Wirkung aller Teleocidine und aller chemisch

²² Die Synthese von Indolactam V und Indolactam V Derivaten wurde von Jan Erik Stein im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz am Institut für Organische Chemie an der Universität zu Köln durchgeführt.

synthetisierten IL-V Verbindungen auf die PAR2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung ist in Tabelle IV.6 zusammengefasst.

V.2.3 Wirkung von Teleocidinen und Indolactam V Derivaten auf die Zellviabilität

Die Ergebnisse der Viabilitätsstudien in MDA-MB 231 und HMEC Zellen legten dar, dass die isolierten Teleocidin Naturstoffe im Gegensatz den neu synthetisierten, potenten IL-V Derivaten in Konzentrationen von 25 nM eine moderate toxische oder antiproliferative Wirkung vermitteln. In der Zervixkarzinomzelllinie Hela erzielte Teleocidin A1 ebenso eine moderat toxische Wirkung (IC_{50} 35 μM) (Izumikawa *et al.*, 2010), die jedoch weit entfernt von den in dieser Arbeit detektierten IC_{50} Werten für die Inhibition von PAR2 lag. Der Ausschluss einer unspezifischen, zytotoxischen Wirkung auf gesunde Zellen (HMEC) ist ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung potenter und spezifischer PAR2 inhibierender Verbindungen.

V.2.4 Identifizierung potenter, spezifischer Indolactam V Derivate mit reduzierter PKC Aktivität

Im Rahmen der Testung neu synthetisierter IL-V Derivate wurde mit allen wirksamen Verbindungen, die PAR2 potent inhibierten, ein Gegenscreening auf eine Wirkung als PKC Aktivator durchgeführt. Die Daten dieser Arbeit konnten zeigen, dass IL-V PKC nicht annähernd so stark aktivierte wie die Teleocidine Teleocidin A2, IMD1, IMD3 und IMD7. Dies ergab die Detektion der Derivat abhängigen Phosphorylierung des zellulären PKC Substrat MARCKS in MDA-MB 231 bei einer equivalenten Konzentration von 25 nM.

Abbildung IV.6 visualisiert neun der potentesten Teleocidin und IL-V Derivate in Bezug auf drei charakterisierte Eigenschaften, 1) der IC_{50} für die PAR2/SLIGKV-NH2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung, 2) der IC_{50} für die PAR1/TFLLR-NH2 abhängige Ca^{2+} Mobilisierung sowie 3) der Phosphorylierung des PKC Substrats MARCKS an Ser152/156. Auf der X-Achse sind die IC_{50} für die Inhibition von PAR2, dem Zielrezeptor, der potent und selektiv inhibiert werden soll, abgebildet. Die Y-Achse bildet die IC_{50} für die Inhibition von PAR1 ab, um potenzielle Effekte auf einen weiteren Gq gekoppelten Rezeptor aus der Familie der PARs darzustellen. Auf der Z-Achse ist das Potenzial der verschiedenen Derivate, die PKC zu stimulieren, in Form der Level an phosphoryliertem MARKCS Protein eingetragen.

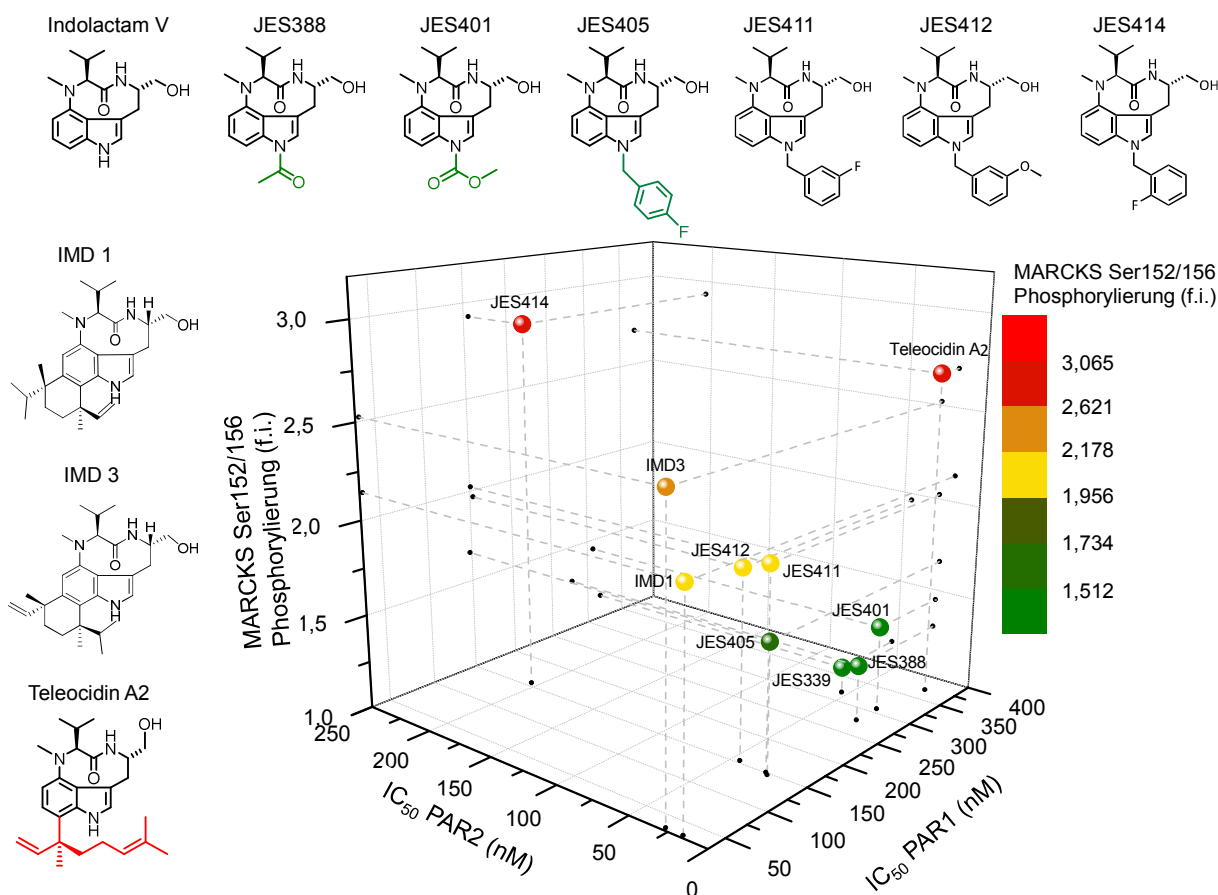


Abbildung V.3: Zusammenfassung der Teleocidin und Indolactam V Derivate im 3D Punktediagramm

Das 3D Punktediagramm visualisiert die Messergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten, aufgetragen auf X-, Y- und Z-Achse, 1) der Inhibition der SLIGKV-NH₂ aktivierten PAR2 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung, 2) der Inhibition der TFLLR-NH₂ aktivierten und PAR1 abhängigen Ca²⁺ Freisetzung und 3) der PKC abhängigen Phosphorylierung von MARCKS Protein in MDA-MB 231 Zellen durch ausgewählte Teleocidine und IL-V Derivate. Die Stimulation der Phosphorylierung des zellulären PKC Substrats MARCKS in MDA-MB 231 Zellen erfolgte mit der IC_{50} für die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung des jeweiligen Derivats. Aufgetragen auf die Achsen wurden die MW aus drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt jeweils in biologischen Triplikaten.

Teleocidin A2 (**IMD9**), Teleocidin B4 (**IMD1**), O-Demethylolivoretin C (**IMD3**) und die IL-V Derivate **JES388**, **401**, **405** und **411** inhibierten die PAR2 abhängige Ca²⁺ Mobilisierung equipotent mit IC_{50} Werten im Bereich von 17-28 nM. Alle potenten Verbindungen inhibierten PAR2 mit höherer Wirksamkeit als PAR1, jedoch waren Unterschiede in der Größenordnung der selektiven Inhibition von PAR2 im Vergleich zu PAR1 festzustellen. Dies wird an der Lage, der auf der X-Achse in einer Linie liegenden, potenten PAR2 inhibierenden Verbindungen in der rechten Hälfte des Diagramms deutlich: Diese besitzen einen annähernd gleichen X-Achsenwert (IC_{50} PAR2) und verteilen sich dabei entlang der Y-Achse.

Anhand der Verteilung der potenten Verbindungen auf der Z-Achse lässt sich ablesen, dass die chemisch synthetisierten IL-V Derivate die Proteinkinase C im Vergleich zu den Naturstoffen mit eindeutig herabgesetzter Wirkung stimulierten. Eine Korrelation zwischen der Größenordnung für die spezifische PAR2 Inhibition mit der PKC stimulierenden Wirkung

der Verbindungen war nicht zu erkennen. Die unwirksameren IL-V Derivate **JES412** und **414** waren weniger bis nicht selektiv für PAR2, zeigten aber eine stärkere Aktivierung der PKC. Alle Daten der in Abbildung V.3 gezeigten Teleocidin und IL-V finden sich zusammengefasst in Tabelle IV.6 im Ergebnisteil unter IV.10.

Im Rahmen des in dieser Arbeit verfolgten medizinisch chemischen Ansatzes konnten erstmalig drei neue wirksame und spezifische IL-V Derivate identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die Verbindungen **JES388**, **401** und **405**. Die neu synthetisierten Verbindungen zeigten eine 1) vergleichbare inhibierende Wirkung auf die PAR2 induzierte intrazelluläre Mobilisierung von Ca^{2+} wie Teleocidin A2, 2) eine vergleichbare spezifische Wirkung auf PAR2, jedoch 3) im Gegensatz zu Teleocidin A2 und B Teleocidinen einen signifikant reduzierten Effekt auf die Aktivität von PKC. Die Daten zur Untersuchung der Struktur abhängigen Wirkung unterstützen die Annahme, dass Indolactame und Teleocidine abhängig von bestimmten funktionellen Gruppen, spezifisch mit PAR2 oder PAR2 regulierten Signalen wechselwirken.

Wie in Kapitel V.1.4 ausführlich erläutert, ist aus der Literatur bekannt, dass Teleocidine über die Aktivierung von PKC, tumorpromovierende Wirkungen vermitteln können, die unter anderem in einem zweistufigen Hauttumormodell in Mäusen, das Wachstum eines vorhandenen Tumors stimulieren (Imamoto *et al.*, 1993). Dahingehend bedeutet die potente Aktivierung von PKC Isoformen einen unerwünschten und negativen Nebeneffekt für die Verwendung von Teleocidin A2 als potente PAR2 inhibierende Verbindung.

Die Testung der chemisch synthetisierten IL-V Derivate auf ihre strukturabhängige Wirkung konnte demonstrieren, dass die Aktivierung der PKC nicht Voraussetzung für die potente Inhibition der PAR2 abhängigen Ca^{2+} Freisetzung ist. Der Wirkverlust in Bezug auf die Aktivierung zellulärer PKC ging nicht mit einem Wirkverlust der Inhibition von PAR2 einher. Die Daten zeigen eindrücklich, dass es durch den medizinisch chemischen Ansatz gelungen ist, gegen PAR2 wirksame Verbindungen mit reduzierter PKC Aktivität zu synthetisieren.

VI. Ausblick

Indolactam V diente im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich als Grundgerüst für einen medizinisch chemischen Ansatz zur Synthese und anschließenden Identifizierung neuer wirksam PAR2 inhibierender Indolactam V Strukturderivate mit reduzierter PKC Aktivität.

Erste vorläufige Daten²³ weisen auf eine PAR2 abhängige Stimulation von NFκB sowie eine PAR2 induzierte Freisetzung der Zytokine IL-8, IL-6 und MCP1 in MDA-MB 231 hin. Diese Daten fügen sich in bereits publizierte Literatur ein, die PAR2 eine proinflammatorische Rolle nicht nur in inflammatorischen Erkrankungen sondern auch hinsichtlich der Wirkung auf tumorassoziierte Immunzellen im Tumormikromilieu zuschreibt. Anhand eines *in vitro* Multiplex Assays mit Zytokin-spezifischen Antikörpern mobilisiert auf magnetischen Beads kann in weiterführenden Experimenten die Wirkung der identifizierten Indolactam V Derivate auf die PAR2 stimulierte Sekretion von promalignen Zytokinen untersucht werden.

Die wirksamen Indolactam V Strukturderivate können weiterführend in einer *in vivo* Studie getestet werden, um die Wirksamkeit im Tier unter klinisch pharmakologischen Aspekten zu evaluieren. Die Wirkung von Indolactam V Derivaten auf die spontane Entwicklung von Mammakarzinomen ließe sich in transgenen MMTV-PyMT/PAR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu MMTV-PyMT/PAR2^{+/+} Mäusen untersuchen. In dem transgenen Mausmodell MMTV-PyMT wird die Expression des Onkogens polyoma middle T antigen (PyMT) über den Promotor mouse mammary tumor virus promotor (MMTV) gesteuert. Dies resultiert in der spontanen Entwicklung von Adenokarzinomen und metastatischen Läsionen in Lymphknoten und in der Lunge (Fantozzi und Christofori, 2006). Rydén *et al.*, 2010 ist es gelungen MMTV-PyMT Mäuse mit PAR2^{-/-} Mäusen zu kreuzen. Die PAR2 Defizienz resultierte in einer verlangsamten Tumorentwicklung und in einer reduzierten Metastasierung (Versteeg *et al.*, 2008).

Eine nachgewiesene Wirkung *in vivo* kann anschließend ein groß angelegtes chemisches Projekt zur Synthese hochwirksamer und hochspezifischer PAR2 inhibierender Verbindungen mit optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften begründen. Hieraus kann sich die Synthese eines neuen Arzneimittels ergeben. Vor allem in den schwer therapierbaren Krebsarten TNBC oder NSCLC sind Ansätze zur zielgerichteten Therapie ein zentraler Aspekt der aktuellen Forschung. PAR2 kann aufgrund seiner verstärkten Expression in Tumorgeweben und der klinischen Korrelation mit aggressiven Krankheitsverläufen als ein Ansatzpunkt für eine anti-metastatische Therapie angesehen werden. Diese könnte als Kombinationstherapie zusammen mit klassischen Chemotherapeutika eingesetzt werden.

²³ Die Daten wurden von Lisa Thelen im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Teusch an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln erhoben.

VII. Zusammenfassung

Proteinase aktivierter Rezeptor 2 (PAR) ist ein GPCR, der über einen proteolytischen Mechanismus aktiviert wird. Bisher wurden vier PARs identifiziert. Serinproteasen, darunter Trypsin oder ein Komplex aus TF und den Koagulationsenzymen FVIIa und/oder FXa prozessieren PAR2 an seinem extrazellulären Aminoterminus und generieren einen verkürzten, Rezeptor-gebundenen Liganden mit der terminalen Sequenz –SLIGKV. Dieser induziert durch die Bindung an die 2. extrazelluläre Schleife eine Konformationsänderung transmembraner Domänen und leitet subsequent PAR2 regulierte Signalkaskaden ein. Kurze, von der aminoterminalen Sequenz abgeleitete Peptide, können PAR2 Protease-unabhängig aktivieren. PAR2 spielt eine Rolle als kritischer Vermittler pathophysiologischer Prozesse, die zu Herz-Kreislauf-, Atemwegs- sowie einer Reihe von inflammatorischen Erkrankungen führen können. Indizien aus der Literatur sprechen PAR2 eine relevante prometastatische Funktion in neoplastischen Erkrankungen zu. Erhöhte PAR2 Expressionslevel in Tumorproben und isolierten Tumorzelllinien wurden mit aggressiven Krankheitsverläufen korreliert und weisen auf die klinische Relevanz hin. PAR2 assoziierte Signale führten *in vitro* zu einer erhöhten Invasivität, Migration und Ausschüttung proinflammatorischer, proangiogener sowie antiapoptotischer Mediatoren. Die pathophysiologische Relevanz von PAR2 begründet den Bedarf nach einem Inhibitor für den Rezeptor. Entsprechend sind diverse Studien publiziert, jedoch sind alle bisher dokumentierten Kandidaten für PAR2 eingeschränkt in ihrer Wirkung, Affinität und Selektivität.

Diese Arbeit beschäftigt sich zunächst mit der Charakterisierung des Naturstoff Teleocidin A2 aus *Streptomyces mediocidicus* als potenzieller Inhibitor PAR2 stimulierter Signalkaskaden. Anhand der Untersuchung der intrazellulären, G_q Protein gekoppelten Mobilisierung von Ca²⁺ konnte die Aktivierung von PAR2 durch die PAR2 spezifischen und strukturell ungleichen Agonisten Trypsin und SLIGKV-NH₂ in den TNBC und NSCLC Zelllinien MDA-MB 231 und A549 sowie in Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden und im folgenden Schritt die potente Inhibition der PAR2 stimulierten Ca²⁺ Mobilisierung durch Teleocidin A2 erreicht werden. Teleocidin A2 unterdrückte dabei potent die Ca²⁺ Mobilisierung beider Agonisten und wirkte nicht eigenständig agonistisch. Die IC₅₀ von Teleocidin A2 lag in MDA-MB 231, A549 und HUVEC zwischen 14 und 26 nM. Durch die Testung von Teleocidin A2, auf die Inhibition der intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung ausgelöst über die GPCR PAR1 und P2Y in MDA-MB 231 und A549, wurde eine Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 ermittelt, die bis zu 20-fach im Vergleich zu PAR1 und P2Y erhöht und somit spezifisch war. Ein PAR2 Ligandenbindungstest schloss die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden durch Teleocidin A2 aus, sodass die Vermutung nahe liegt, dass Teleocidin A2 nicht an der orthosterischen Bindestelle des Liganden wirkt.

Als weitere Zellantwort wurde die Zellmigration und dadurch bedingte Veränderungen der Aktinstrukturen im Zytoskelett der metastatischen Zelllinie MDA-MB 231 untersucht. Trypsin und SLIKGV-NH₂ vermittelten PAR2 abhängig einen stimulatorischen Effekt auf die Motilität, jedoch nicht auf die Proliferation, und dieser wurde wirksam von Teleocidin A2, das keine zytotoxische Wirkung zeigte, unterdrückt. Die Stimulation von PAR2 induzierte weiterhin, detektiert mittels Fluorophor gekoppeltem Phalloidin, die Formation klar abgegrenzter Stressfasern im Zytoplasma von MDA-MB 231. Anhand von Inhibitorstudien konnten die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 als kritische Regulatoren in der Signalkaskade der PAR2 abhängigen Migration und Reorganisation der Aktinfasern im Zytoskelett identifiziert werden. Teleocidin A2 wirkte der PAR2 abhängigen Stressfaserausbildung entgegen, induzierte jedoch eine ausgeprägte Aktinvernetzung an der Plasmamembran.

Die herausragende potente und spezifische Wirkung von Teleocidin A2 führte im nächsten Schritt zur Untersuchung weiterer Naturstoffe aus der Substanzklasse der Teleocidine, die hinsichtlich ihrer strukturabhängigen Wirkung auf die Inhibition der PAR2 stimulierten Mobilisierung von Ca²⁺ in MDA-MB 231 charakterisiert wurden. Im Zuge der Untersuchungen wurden Unterschiede in der Wirkung auf die PAR2 stimulierte Ca²⁺ Mobilisierung abhängig von der Struktur beobachtet, wobei sich heraus kristallisierte, dass eine Hydroxygruppe essenziell für die biologische Aktivität ist. Außerdem inhibierten Teleocidin A2 mit einer offenen, terpenoiden Seitenkette und Teleocidine aus der B-Reihe mit geschlossener Seitenkette, PAR2 gleichsam potent aber nicht gleichsam spezifisch. Teleocidin A2 zeigte eine weitaus höhere Spezifität gegenüber PAR2. Die identifizierte, strukturabhängige Wirkung der Naturstoffverbindungen begründete einen medizinisch chemischen Ansatz mit Indolactam V als Leitstruktur zur Synthese neuer Teleocidin verwandter Verbindungen. Diese wurden wiederum auf ihre strukturabhängige Wirkung auf die PAR2 stimulierte Mobilisierung von Ca²⁺ untersucht. Die Indolactam V Derivate JES388, JES401, JES405 und JES411 wurden als Inhibitoren für PAR2 mit equipotenter Wirkung im Vergleich zu Teleocidin A2 identifiziert. Sie zeigten eine deutlich reduzierte Wirkung gegenüber PAR1 und waren somit spezifischer für PAR2.

Teleocidin A2 ist aus der Literatur als PKC Aktivator bekannt. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung des physiologischen und spezifischen PKC Substrats MARCKS in Abhängigkeit von Teleocidin A2 in MDA-MB 231 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Teleocidin A2 (25 nM) PKC in nanomolaren Konzentrationen aktiviert. Gleichzeitig wurde durch Studien mit einem kompetitiven PKC Inhibitor eine mögliche PKC Abhängigkeit der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca²⁺ Mobilisierung durch Teleocidin A2 festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Wirkung aller gegenüber PAR2 potenter Naturstoff- sowie chemisch synthetisierter Indolactam V Derivate auf die Phosphorylierung von

MARCKS, die die Aktivierung zellulärer PKC repräsentiert, evaluiert. Die Daten zeigen eindrucksvoll, dass die neu synthetisierten Derivate JES388, JES401 und JES405 PAR2 equipotent im Vergleich zu Teleocidin A2 inhibieren, jedoch PKC mit stark reduzierter Wirkung stimulieren und somit die Inhibition von PAR2 von einer PKC Aktivierung entkoppeln.

Letztendlich können Teleocidin A2 und besonders die im Rahmen des medizinisch chemischen Ansatzes identifizierten Indolactam V Derivate als vielversprechende Verbindungen zur Untersuchung und Aufklärung PAR2 regulierter Signalkaskaden und Prozesse in unterschiedlichen pathophysiologischen Kontexten angesehen werden. Insbesondere kann die sich heraus kristallisierende Funktion von PAR2 in der Tumorprogression und –Metastase als mögliche Basis für einen neuen Ansatz einer Anti-Tumorthherapie dienen.

VIII. Anhang

VIII.1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CIN	Chronophin
CRE	cAMP responsive element
CREP	CRE binding protein
DAG	Diacylglycerin
ECL	Extracellular loop
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER ^{+/-}	Estrogen receptor positive/negative
ERK1/2	Extracellular signal related kinase 1/2
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FXa	Faktor Xa
GAP	GTPase activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid exchange factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G Protein coupled receptor kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HHBS	Hepes gepufferte (20 mM) Hank's Balanced Salt Solution
ICL	Intracellular loop
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-V	Indolactam V
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IPAH	Idiopathisch pulmonal arterielle Hypertonie
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma
LIMK	Lim Kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARCKS	Endogen-myristyliertes Alanin-reiches C Kinase Substrat
MMP	Matrix metalloproteinase
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	Nuclear factor kappa B
NSCLC	Non small cell lung cancer

PAR	Proteinase aktivierter Rezeptor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
cPKC	conventional PKC
nPKC	novel PKC
aPKC	atypical PKC
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PR ^{+/-}	Progesteron receptor positive/negative
PS	Phosphatidylserin
RFU	Relative fluorescence unit
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
SLIGKV-NH ₂	Serin-Leucin-Isoleucin-Glycin-Arginin-Valin-NH ₂
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TF	Gewebethromboplastin (tissue factor)
TFLLR-NH ₂	Threonin-Phenylalanin-Leucin-Leucin-Arginin-NH ₂
TM	Transmembrandomäne
TME	Tumor microenvironment
TNBC	Triple negative breast cancer
TNF- α	Tumor necrosis factor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor

VIII.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1:	Schematische Darstellung G-Protein abhängiger Signalwege	2
Abbildung I.2:	Aktivierungsmechanismus Proteinase aktivierter Rezeptoren	3
Abbildung I.3:	Krebsneuerkrankungen und Mortalität 2012.....	8
Abbildung I.4:	Schematische Darstellung PAR2 regulierter Signalkaskaden.....	12
Abbildung I.5:	Struktur des peptidischen Antagonisten C391	16
Abbildung I.6:	Die Isomere Teleocidin A1/Lyngbyatoxin A und Teleocidin A2	18
Abbildung IV.1:	PAR1 und PAR2 abhängige Ca ²⁺ Mobilisierung in mPASC WT und PAR2 ^{-/-} Zellen	34
Abbildung IV.2:	Stimulation der Ca ²⁺ Mobilisierung in humanen PASC	35
Abbildung IV.3:	PAR2 abhängige Ca ²⁺ Mobilisierung in Tumor- und primären Endothelzellen.....	36
Abbildung IV.4:	Stimulation und Expression von PAR2 in humanen nicht-kanzerogenen Brustepithelzellen.....	37
Abbildung IV.5:	PAR1 und P2Y abhängige Ca ²⁺ Mobilisierung in Tumorzellen.	39
Abbildung IV.6:	Kontrolle zur intrinsischen agonistischen Funktionalität von Teleocidin A2	40
Abbildung IV.7:	Inhibition der PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung in Tumor- und primären Endothelzellen	42
Abbildung IV.8:	Inhibition der PAR1 und P2Y Rezeptor abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung in Tumorzellen.	42
Abbildung IV.9:	Inhibition der Trypsin und Thrombin abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung mit Teleocidin A2 und Vorapaxar	44
Abbildung IV.10:	Kontrolle der Zytotoxizität von Teleocidin A2 in MDA-MB 231	47
Abbildung IV.11:	Wirkung des PKC Inhibitors Gö6983 auf die Teleocidin A2 vermittelte Inhibition des PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Signals	48
Abbildung IV.12:	PAR2, PAR1 und Teleocidin A2 abhängige MARCKS Phosphorylierung in MDA-MB 231	49
Abbildung IV.13:	PAR2 stimulierte Migration von MDA-MB 231	52
Abbildung IV.14:	Testung des PKC Inhibitors Gö6983 in der PAR2 abhängigen Migration	53
Abbildung IV.15:	Einfluss des PKC Inhibitors Gö6983 auf die PAR2 abhängige MARCKS Phosphorylierung	54
Abbildung IV.16:	Testung des ROCK Inhibitors Y27632 in der PAR2 abhängigen Migration	55
Abbildung IV.17:	Testung des Rac1 Inhibitors EHop-016 in der PAR2 abhängigen Migration	56
Abbildung IV.18:	Testung von Teleocidin A2 in der PAR2 abhängigen Migration.....	57
Abbildung IV.19:	Testung von Teleocidin A2 in der EGF und PAR1 abhängigen Migration	58
Abbildung IV.20:	Effekt von EGF und Calpeptin auf das Actinzytoskelett von MDA-MB 231.....	60
Abbildung IV.21:	PAR2 stimulierte Umordnung des Aktinzytoskeletts in MDA-MB 231.....	60
Abbildung IV.22:	Effekt von Teleocidin A2 auf das Actinzytoskelett von MDA-MB 231.....	61
Abbildung IV.23:	Inhibition der PAR2, PAR1 und P2Y abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung durch IL-V Derivate.....	72
Abbildung IV.24:	Inhibition der PAR2 und PAR1 abhängigen Ca ²⁺ Mobilisierung durch die IL-V Derivate 401, 405, 411, 412 und 414	74
Abbildung IV.25:	Die Wirkung von Teleocidin und Indolactam V Derivaten auf die Viabilität von MDA-MB 231 und HMEC bei einer Kontaktzeit von 48 h	76
Abbildung V.1:	Die Wirkung von Teleocidin A2 auf PAR2 stimulierte Signale	96
Abbildung V.2:	Indolactam V	98
Abbildung V.3:	Zusammenfassung der Teleocidin und Indolactam V Derivate im 3D Punktediagramm	100

VIII.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle I.1:	PARs, ihre aktivierenden Proteasen und resultierenden N-Termini	5
Tabelle I.2:	Übersicht zur Expression von PAR1, 2, 3 und 4 in humanen Tumorproben und Zelllinien	10
Tabelle III.1:	Verwendete Geräte	21
Tabelle III.6:	Verwendete Testsysteme	22
Tabelle III.2:	Verwendete Agonisten	22
Tabelle III.3:	Kommerziell erhältliche verwendete Inhibitoren	23
Tabelle III.4:	Untersuchte Teleocidin Naturstoffderivate	23
Tabelle III.5:	Untersuchte Indolactam V Derivate (IL-V Derivate)	23
Tabelle III.7:	Verwendete Software	24
Tabelle III.8:	Verwendete Zelllinien	25
Tabelle III.9:	Zelllinien abhängige Bedingungen im Ca ²⁺ Mobilisationsassay	26
Tabelle III.10:	Verwendete Gen spezifische Primer in der qPCR	28
Tabelle III.11:	Anzahl der ausgesäten Zellen in Mikrotiterplatten	29
Tabelle IV.1:	Stimulation der Ca ²⁺ Mobilisierung in Tumor und Endothelzellen mit PAR2, PAR1 und P2Y Agonisten und Inhibition der Rezeptor vermittelten Ca ²⁺ Antwort mit Teleocidin A2	45
Tabelle IV.2:	PAR2 (human) Agonist Radioliganden Bindungstest	46
Tabelle IV.3:	Teleocidin Derivate unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit und Spezifität in der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Ausschüttung	64
Tabelle IV.4:	Indolactam V Derivate unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit und Spezifität in der Inhibition der PAR2 abhängigen Ca ²⁺ Ausschüttung	68
Tabelle IV.5:	Die Aktivierung der Protein Kinase C abhängig von Teleocidin und Indolactam V Derivaten	77
Tabelle IV.6:	Zusammenfassung potenter und spezifischer Indolactam V Derivate mit reduzierter PKC Aktivität	78

IX. Literaturverzeichnis

Abrams PJ, Emerson CR (2009). Rivaroxaban: a novel, oral, direct factor Xa inhibitor. *Pharmacotherapy* 29: 167–181.

Adams MN, Ramachandran R, Yau M, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, Hooper JD (2011). Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther* 130: 248–282.

Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L193–L201.

Alexander, Stephen P H, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, McGrath JC *et al.* (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview. *Br J Pharmacol* 170: 1449–1458.

Altmann K (2001). Microtubule-stabilizing agents. A growing class of important anticancer drugs. *Curr Opin Chem Biol* 5: 424–431.

Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275: 1308–1311.

American Cancer Society (2014). Breast Cancer. Internetdokument: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-hormone-therapy>, zuletzt geprüft am 21.10.2015.

Antal CE, Hudson AM, Kang E, Zanca C, Wirth C, Stephenson NL *et al.* (2015). Cancer-associated protein kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor. *Cell* 160: 489–502.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72: 1117–1130.

Arbuzova A, Schmitz, Arndt A P, Vergères G (2002). Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 362: 1–12.

Arcoleo JP, Weinstein IB (1985). Activation of protein kinase C by tumor promoting phorbol esters, teleocidin and aplysiatoxin in the absence of added calcium. *Carcinogenesis* 6: 213–217.

Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L (2012). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 16–32.

Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang B, Kandel ER, Tsien RY (1993). Spatially Resolved Dynamics of cAMP and Protein Kinase A Subunits in Aplysia Sensory Neurons. *Science* 260: 222–225.

- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276: 29171–29177.
- Bao Y, Hou W, Hua B (2014). Protease-activated receptor 2 signalling pathways: a role in pain processing. *Expert Opin Ther Targets* 18: 15–27.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401–410.
- Bhatnagar I, Kim S (2010). Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. *Mar Drugs* 8: 2702–2720.
- Boitano S, Hoffman J, Flynn AN, Asiedu MN, Tillu DV, Zhang Z *et al.* (2015). The novel PAR2 ligand C391 blocks multiple PAR2 signalling pathways in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 172: 4535–4545
- Boyle P (2012). Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 23, Suppl 6: vi7–12.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Brew CT, Aronchik I, Kosco K, McCammon J, Bjeldanes LF, Firestone GL (2009). Indole-3-carbinol inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell motility and induces stress fibers and focal adhesion formation by activation of Rho kinase activity. *Int J Cancer* 124: 2294–2302.
- Brini M, Carafoli E (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89: 1341–1378.
- Bucci M, Roviezzo F, Cirino G (2005). Protease-activated receptor-2 (PAR2) in cardiovascular system. *Vascul Pharmacol* 43: 247–253.
- Burnier L, Mosnier LO (2013). Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood* 122: 807–816.
- Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53: 661–674.
- Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 97: 5255–5260.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L *et al.* (2005). Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 643–655.
- Chackalamannil S, Wang Y, Greenlee WJ, Hu Z, Xia Y, Ahn H *et al.* (2008). Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem* 51: 3061–3064.

Chen C, Cheng C, Yuan Y, Zhai J, Arif M, Fong, Lon Wolf R *et al.* (2015). Elevated MARCKS phosphorylation contributes to unresponsiveness of breast cancer to paclitaxel treatment. *Oncotarget* 6: 15194–15208.

Chen C, Statt S, Chiu C, Thai P, Arif M, Adler KB, Wu R (2014a). Targeting myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation site domain in lung cancer. Mechanisms and therapeutic implications. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 1127–1138.

Chen C, Thai P, Yoneda K, Adler KB, Yang P, Wu R (2014b). A peptide that inhibits function of Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate (MARCKS) reduces lung cancer metastasis. *Oncogene* 33: 3696–3706.

Chen G, Turano B, Ruest PJ, Hagel M, Settleman J, Thomas SM (2005). Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 25: 979–987.

Chung AWY, Jurasz P, Hollenberg MD, Radomski MW (2002). Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol* 135: 1123–1132.

Clardy J, Walsh C (2004). Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829–837.

Coughlin SR (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258–264.

da Rocha A (2001). Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1: 364–369.

D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P (2001). Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 158: 2031–2041.

Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M (2004). Protease-activated Receptor 2 in Colon Cancer: Trypsin-induced MAPK Phosphorylation and Cell Proliferation are mediated by Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *J Biol Chem* 279: 20927–20934.

Delbeck M, Nickel KF, Perzborn E, Ellinghaus P, Strassburger J, Kast R *et al.* (2011). A role for coagulation factor Xa in experimental pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 92: 159–168.

Deng K, Gao Y, Cao Z, Graziani EI, Wood A, Doherty P, Walsh FS (2010). Overcoming Amino-Nogo-induced Inhibition of Cell Spreading and Neurite Outgrowth by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-type Tumor Promoters. *J Biol Chem* 285: 6425–6433.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA *et al.* (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* 13: 4429–4434.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274: C1429–C1452.

DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007). β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* 69: 483–510.

- Ducroc R, Bontemps C, Marazova K, Devaud H, Darmoul D, Laburthe M (2002). Trypsin is produced by and activates protease-activated receptor-2 in human cancer colon cells. *Life Sci*70: 1359–1367.
- Dutra-Oliveira A, Monteiro RQ, Mariano-Oliveira A (2012). Protease-activated receptor-2 (PAR2) mediates VEGF production through the ERK1/2 pathway in human glioblastoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 421: 221–227.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687–1717.
- Eglen RM, Bosse R, Reisine T (2007). Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5: 425–451.
- Elste AP, Petersen I (2010). Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol* 41: 89–99.
- Emkey R, Rankl NB (2009). Screening G protein-coupled receptors: measurement of intracellular calcium using the fluorometric imaging plate reader. *Methods Mol Biol* 565: 145–158.
- Engene N, Rottacker EC, Kaštovský J, Byrum T, Choi H, Ellisman MH *et al.* (2012). *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1171–1178.
- Erb L, Weisman GA (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1: 789–803.
- Fantozzi A, Christofori G (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 8: 1-11.
- Fisher PB, Miranda AF, Mufson RA, Weinstein LS, Fujiki H, Sugimura T, Weinstein IB (1982). Effects of teleocidin and the phorbol ester tumor promoters on cell transformation, differentiation, and phospholipid metabolism. *Cancer Res* 42: 2829–2835.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin J, Davenport AP *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev.* 57: 279–288.
- French SL, Arthur JF, Tran HA, Hamilton JR (2015). Approval of the first protease-activated receptor antagonist: Rationale, development, significance, and considerations of a novel anti-platelet agent. *Blood Rev* 29: 179–189.
- Freyhaus H ten, Berghausen EM, Janssen W, Leuchs M, Zierden M, Murmann K *et al.* (2015). Genetic Ablation of PDGF-Dependent Signaling Pathways Abolishes Vascular Remodeling and Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 1236–1245.

- Friedman B, Frackelton AR, Ross AH, Connors JM, Fujiki H, Sugimura T, Rosner MR (1984). Tumor promoters block tyrosine-specific phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 81: 3034–3038.
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A (2002). Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma. Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99: 15072–15077.
- Fujiki H, Mori M, Nakayasu M, Terada M, Sugimura T, Moore RE (1981). Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin, and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78: 3872–3876.
- Fujiki H, Suganuma M, Ninomiya M, Yoshizawa S, Yamashita K, Takayama S *et al.* (1988). Similar, potent tumor-promoting activity of all isomers of teleocidins A and B in a two-stage carcinogenesis experiment on the skin of CD-1 mice. *Cancer Res* 48: 4211–4214.
- Ge L, Ly Y, Hollenberg M, Defea K (2003). A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 278: 34418–34426.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417–1423.
- Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* 11: 86.
- Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615–649.
- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F *et al.* (2010). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. Thieme (Stuttgart). *Pneumologie* 64: e1-e164.
- Goh FG, Ng PY, Nilsson M, Kanke T, Plevin R (2009). Dual effect of the novel peptide antagonist K-14585 on proteinase-activated receptor-2-mediated signalling. *Br J Pharmacol* 158: 1695–1704.
- Gould CM, Antal CE, Reyes G, Kunkel MT, Adams RA, Ziyar A *et al.* (2011). Active site inhibitors protect protein kinase C from dephosphorylation and stabilize its mature form. *J Biol Chem* 286: 28922–28930.
- Greenberg DL, Mize GJ, Takayama TK (2003). Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry* 42: 702–709.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 392: 77–80.
- Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86: 353–364.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.

Hansra G, Garcia-Paramio P, Prevostel C, Whelan RD, Bornancin F, Parker PJ (1999). Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isoforms. *Biochem J* 342 (Pt 2): 337–344.

Harrison, Susan M W, Knifley T, Chen M, O'Connor KL (2013). LPA, HGF, and EGF utilize distinct combinations of signaling pathways to promote migration and invasion of MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *BMC Cancer* 13: 501.

Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356: 618–622.

Hawes BE, Zhai Y, Hesk D, Wirth M, Wei H, Chintala M, Seiffert D (2015). In vitro pharmacological characterization of vorapaxar, a novel platelet thrombin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 762: 221–228.

Heemskerk FM, Chen HC, Huang FL (1993). Protein kinase C phosphorylates Ser152, Ser156 and Ser163 but not Ser160 of MARCKS in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 236–241.

Heng BC, Aubel D, Fussenegger M (2013). An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol Adv* 31: 1676–1694.

Herget T, Oehrlein SA, Pappin, Dairyl J. C., Rozengurt E, Parker PJ (1995). The Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) is Sequentially Phosphorylated by Conventional, Novel and Atypical Isoforms of Protein Kinase C. *Eur J Biochem* 233: 448–457.

Hitotsuyanagi Y, Fujiki H, Suganuma M, Aimi N, Sakai S, Endo Y *et al.* (1984). Isolation and structure elucidation of teleocidin B-1, B-2, B-3, and B-4. *Chem Pharm Bull* 32: 4233–4236.

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrechtsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK *et al.* (2004). Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 103: 3029–3037.

Hollenberg MD, Mihara K, Polley D, Suen JY, Han A, Fairlie DP, Ramachandran R (2014). Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br J Pharmacol* 171: 1180–1194.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.

Hu L, Xia L, Zhou H, Wu B, Mu Y, Wu Y, Yan J (2013). TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKC α and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumour Biol* 34: 2573–2581.

- Huang S, Li Y, Chen H, Rong J, Ye S (2013). Activation of proteinase-activated receptor 2 prevents apoptosis of lung cancer cells. *Cancer Invest* 31: 578–581.
- Huberman E, Braslawsky GR, Callahan M, Fugiki H (1982). Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells by teleocidin and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Carcinogenesis* 3: 111–114.
- Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* 6: 477–480.
- Imamoto A, Wang XJ, Fujiki H, Walker SE, Beltran LM, DiGiovanni J (1993). Comparison of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and teleocidin for induction of epidermal hyperplasia, activation of epidermal PKC isozymes and skin tumor promotion in SENCAR and C57BL/6 mice. *Carcinogenesis* 14: 719–724.
- Irie K, Nakagawa Y, Ohigashi H (2004). Indolactam and benzolactam compounds as new medicinal leads with binding selectivity for C1 domains of protein kinase C isozymes. *Curr Pharm Des* 10: 1371–1385.
- Irie K, Okuno S, Koizumi F, Koshimizu K, Nishino H, Iwashima A (1993). Photolabile derivatives of indole alkaloid tumor promoter teleocidins: synthesis, biological activities and photoaffinity labeling studies. *Tetrahedron* 49: 10817–10830.
- Irie K, Okuno S, Koshimizu K, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A (1989). Biological activities and cellular uptake studies of fluorescent derivatives of indole alkaloid tumor promoter teleocidin. *Int J Cancer* 43: 513–519.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C *et al.* (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502–506.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 57: 976–983.
- Izumikawa M, Khan ST, Komaki H, Takagi M, Shin-ya K (2010). JBIR-31, a new teleocidin analog, produced by salt-requiring *Streptomyces* sp. NBRC 105896 isolated from a marine sponge. *J Antibiot* 63: 33.
- Jackman DM, Johnson BE (2005). Small-cell lung cancer. *Lancet* 366: 1385–1396.
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1: 761–782.
- Jahan I, Fujimoto J, Alam, S. Mahfuzul, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers. *Ann Oncol* 18: 1506–1512.
- Jairaman A, Yamashita M, Schleimer RP, Prakriya M (2015). Store-Operated Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels Regulate PAR2-Activated Ca²⁺ Signaling and Cytokine Production in Airway Epithelial Cells. *J Immunol* 195: 2122–2133.
- Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C *et al.* (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Berlin.

Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S *et al.* (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394: 690–694.

Kanke T, Ishiwata H, Kabeya M, Saka M, Doi T, Hattori Y *et al.* (2005). Binding of a highly potent protease-activated receptor-2 (PAR2) activating peptide, 3H2-furoyl-LIGRL-NH₂, to human PAR2. *Br J Pharmacol* 145: 255–263.

Kanke T, Kabeya M, Kubo S, Kondo S, Yasuoka K, Tagashira J *et al.* (2009). Novel antagonists for proteinase-activated receptor 2: inhibition of cellular and vascular responses in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 158: 361–371.

Kaufmann R, Mussbach F, Henklein P, Settmacher U (2011). Proteinase-activated receptor 2-mediated calcium signaling in hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 965–973.

Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F (2008). Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S230-40.

Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD *et al.* (2006). Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1017–1024.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52–67.

Kim J, Choi S, Yun K, Kim D, Han M, Seo G *et al.* (2003). Expression of Protease-Activated Receptor 2 in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9: 224–229.

Klarenbach SW, Chipiuk A, Nelson RC, Hollenberg MD, Murray AG (2003). Differential actions of PAR2 and PAR1 in stimulating human endothelial cell exocytosis and permeability: the role of Rho-GTPases. *Circ Res.* 92: 272–278.

Kobilka BK (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768: 794–807.

Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F (2010). Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev* 62: 726–759.

Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YOT, Matsuda M (2004). Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* 15: 1003–1010.

Kwapiszewska G, Markart P, Dahal BK, Kojonazarov B, Marsh LM, Schermuly RT *et al.* (2012). PAR-2 inhibition reverses experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 110: 1179–1191.

Laurentiis M de, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S *et al.* (2010). Treatment of triple negative breast cancer (TNBC). Current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 36: S80-S86.

Lefkowitz RJ (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273: 18677–18680.

- Li S, Jiang P, Xiang Y, Wang W, Zhu Y, Feng W *et al.* (2014). Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. *Zool Res* 35: 420–425.
- Liang C, Park AY, Guan J (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2: 329–333.
- Lima LG, Monteiro RQ (2013). Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci Rep* 33: 701-710.
- Liu Y, Mueller BM (2006). Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 1263–1270.
- Lohman R, Cotterell AJ, Barry GD, Liu L, Suen JY, Vesey DA, Fairlie DP (2012a). An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. *FASEB J* 26: 2877–2887.
- Lohman R, Cotterell AJ, Suen J, Liu L, Do AT, Vesey DA, Fairlie DP (2012b). Antagonism of protease-activated receptor 2 protects against experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 340: 256–265.
- Lovly C, Horn L, Pao W. KRAS in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome Internetdokument: <http://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/kras/> (Updated June 18). Zuletzt geprüft am 26.10.2015.
- Luo R, Wang X, Dong Y, Wang L, Tian C (2014). Activation of protease-activated receptor 2 reduces glioblastoma cell apoptosis. *J Biomed Sci* 21: 25.
- Luo SF, Tsao HL, Ong R, Hsieh JT, Yang CM (1995). Inhibitory effect of phorbol ester on bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 7: 571–581.
- Macfarlane SR, Sloss CM, Cameron P, Kanke T, McKenzie RC, Plevin R (2005). The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes. *Br J Pharmacol* 145: 535–544.
- Mackman N, Tilley RE, Key NS (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1687–1693.
- Madhusudhan T, Wang H, Straub BK, Gröne E, Zhou Q, Shahzad K *et al.* (2012). Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood* 119: 874–883.
- Maharshak N, Huh EY, Paiboonrungruang C, Shanahan M, Thurlow L, Herzog J *et al.* (2015). Enterococcus faecalis Gelatinase Mediates Intestinal Permeability via Protease-Activated Receptor 2. *Infect Immun* 83: 2762–2770.
- Marinissen MJ, Gutkind J (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks. Emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22: 368–376.

Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Yamashita A, Sumiyoshi A, Asada Y (2002). Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Res* 107: 271–276.

Matej R, Mandakova P, Netikova I, Pouckova P, Olejar T (2007). Proteinase-activated receptor-2 expression in breast cancer and the role of trypsin on growth and metabolism of breast cancer cell line MDA MB-231. *Physiol Res* 56: 475–484.

McHardy LM, Sinotte R, Troussard A, Sheldon C, Church J, Williams DE *et al.* (2004). The tumor invasion inhibitor dihydromotuporamine C activates RHO, remodels stress fibers and focal adhesions, and stimulates sodium-proton exchange. *Cancer Res* 64: 1468–1474.

McLaughlin JN, Patterson MM, Malik AB (2007). Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104: 5662–5667.

Meseguer B, Alonso-Díaz D, Griebenow N, Herget T, Waldmann H (2000). Solid-phase synthesis and biological evaluation of a teleocidin library--discovery of a selective PKCdelta down regulator. *Chemistry* 6: 3943–3957.

Michel N, Heuzé-Vourc'h N, Lavergne E, Parent C, Jourdan M, Vallet A *et al.* (2014). Growth and survival of lung cancer cells: regulation by kallikrein-related peptidase 6 via activation of proteinase-activated receptor 2 and the epidermal growth factor receptor. *Biol Chem* 395: 1015–1025.

Milia AF, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Madeddu P, Trevisani M *et al.* (2002). Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ Res* 91: 346–352.

Miller WE, Lefkowitz RJ (2001). Expanding roles for β -arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 13: 139–145.

Mirza H, Yatsula V, Bahou WF (1996). The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 97: 1705–1714.

Miyata S (2000). Trypsin Stimulates Integrin alpha 5beta 1-dependent Adhesion to Fibronectin and Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells through Activation of Proteinase-activated Receptor-2. *J Biol Chem* 275: 4592–4598.

Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A *et al.* (1997). Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272: 4043–4049.

Montalvo-Ortiz BL, Castillo-Pichardo L, Hernández E, Humphries-Bickley T, La Mota-Peynado A de, Cubano LA *et al.* (2012). Characterization of EHOp-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. *J Biol Chem* 287: 13228–13238.

Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J (2006). Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 307–314.

- Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP *et al.* (2012). Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 366: 1404–1413.
- Nakae K, Hosokawa N, Sawa R, Kubota Y, Masuda T, Ohba S *et al.* (2006). A new teleocidin analog from *Streptomyces* sp. MM216-87F4 induces substance P release from rat dorsal root ganglion neurons. *J Antibiot* 59: 11–17.
- Nakagawa Y (2012). Artificial Analogs of Naturally Occurring Tumor Promoters as Biochemical Tools and Therapeutic Leads. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 1262–1274.
- Nakagawa Y, Irie K, Yanagita RC, Ohigashi H, Tsuda K (2005). Indolactam-V is involved in the CH/pi interaction with Pro-11 of the PKCdelta C1B domain: application for the structural optimization of the PKCdelta ligand. *J Am Chem Soc* 127: 5746–5747.
- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404: 609–613.
- Nakanuma S, Tajima H, Okamoto K, Hayashi H, Nakagawara H, Onishi I *et al.* (2010). Tumor-derived trypsin enhances proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activating protease-activated receptor-2. *Int. J. Oncol* 36: 793–800.
- Nam KY, Kimura S, Imanishi Y, Fujiki H (1989). Distribution of tumor promoters in lipid membranes and changes in membrane structure. *Biophys Chem* 34: 43–53.
- Nam KY, Morino A, Kimura S, Fujiki H, Imanishi Y (1990). Modulation of phospholipase A2 activity by the tumour promoters phorbol esters and teleocidin. *Biochem J* 268: 169–173.
- Nathel, Noah F. Fine, Shah TK, Bronner SM, Garg NK (2014). Total syntheses of indolactam alkaloids (–)-indolactam V, (–)-pendolmycin, (–)-lyngbyatoxin A, and (–)-teleocidin A-2. *Chem Sci* 5: 2184–2190.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002). G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022–1037.
- Nichols HL, Saffeddine M, Theriot BS, Hegde A, Polley D, El-Mays T *et al.* (2012). β -Arrestin-2 mediates the proinflammatory effects of proteinase-activated receptor-2 in the airway. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109: 16660–16665.
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91: 9208–9212.
- O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger, M. Katherine, Woolkalis MJ, Woulfe DS, Brass LF (2000). Thrombin Responses in Human Endothelial Cells: Contributions from Receptors other than PAR1 include the Transactivation of PAR2 by Thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem* 275: 13502–13509.
- Oldham WM, Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60–71.

- Osborne, Nicholas J. T., Webb PM, Shaw GR (2001). The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 27: 381–392.
- Ostman A, Augsten M (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 19: 67–73.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497–1500.
- Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J (2002). beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem* 277: 1292–1300.
- Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse, Christine M., Flick MJ, Kombrinck KW *et al.* (2004). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105: 178–185.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* 46: 143–151.
- Parekh AB, Putney JW (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 85: 757–810.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639–650.
- Pillé J, Denoyelle C, Varet J, Bertrand J, Soria J, Opolon P *et al.* (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther* 11: 267–274.
- Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW (1999). Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res* 59: 5475–5478.
- Putney JW, Broad LM, Braun F, Lievremont J, Bird, Gary St J. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 114: 2223–2229.
- Raftopoulou M, Hall A (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265: 23–32.
- Ramachandran R, Hollenberg MD (2008). Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S263-82.
- Ramachandran R, Mihara K, Chung H, Renaux B, Lau CS, Muruve DA *et al.* (2011). Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem* 286: 24638–24648.
- Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, Hollenberg MD (2012). Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 11: 69–86.
- Rana S, Yang L, Hassanian SM, Rezaie AR (2012). Determinants of the specificity of protease-activated receptors 1 and 2 signaling by factor Xa and thrombin. *J Cell Biochem* 113: 977–984.

- Rasmussen JG, Riis SE, Frøbert O, Yang S, Kastrup J, Zachar V *et al.* (2012). Activation of protease-activated receptor 2 induces VEGF independently of HIF-1. *PLoS ONE* 7: e46087.
- Reed PW, Lardy HA (1972). A23187: A Divalent Cation Ionophore. *J Biol Chem.* 247: 6970–6977.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401–410.
- Riely GJ, Marks J, Pao W (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6: 201–205.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE *et al.* (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673–1684.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356–363.
- Rothmeier AS, Ruf W (2012). Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol* 34: 133–149.
- Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M (2003). Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 1: 1495–1503.
- Russell FA, McDougall JJ (2009). Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflamm Res* 58: 119–126.
- Rydén L, Grabau D, Schaffner F, Jönsson P, Ruf W, Belting M (2010). Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. *Int J Cancer* 126: 2330–2340.
- Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK *et al.* (1992). Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* 267: 13146–13149.
- Schaffner F, Ruf W (2009). Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1999–2004.
- Schaller MD (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20: 6459–6472.
- Schoenwaelder SM, Burridge K (1999). Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 274: 14359–14367.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 59: 555–561.
- Scott RW, Olson MF (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med* 85: 555–568.

- Shapiro DA, Kristiansen K, Weiner DM, Kroeze WK, Roth BL (2002). Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6. *J Biol Chem* 277: 11441–11449.
- Shi K, Queiroz KCS, Stap J, Richel DJ, Spek CA (2013). Protease-activated receptor-2 induces migration of pancreatic cancer cells in an extracellular ATP-dependent manner. *J Thromb Haemost* 11: 1892–1902.
- Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM (2004). Angiogenesis, Metastasis, and the Cellular Microenvironment - Protease-Activated Receptors (PAR1 and PAR2) Contribute to Tumor Cell Motility and Metastasis. *Mol Cancer Res* 2: 395–402.
- Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol* 83: 1309–1322.
- Shukla AK, Singh G, Ghosh E (2014). Emerging structural insights into biased GPCR signaling. *Trends Biochem Sci* 39: 594–602.
- Siehler S (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 158: 41–49.
- Simon M, Strathmann M, Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802–808.
- Soh UJK, Dores MR, Chen B, Trejo J (2010). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 160: 191–203.
- Sonnenblick A, Azambuja E de, Azim HA, Piccart M (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 12: 27–41.
- Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA (2000). Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 343: 1846–1850.
- Sriwai W, Mahavadi S, Al-Shboul O, Grider JR, Murthy KS (2013). Distinctive G Protein-Dependent Signaling by Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) in Smooth Muscle: Feedback Inhibition of RhoA by cAMP-Independent PKA. *PLoS ONE* 8: e66743.
- Steinberg SF (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88: 1341–1378.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS *et al.* (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6: 151–158.
- Stewart, Bernard W.; Wild, Chris (2014). World cancer report 2014. Lyon, Geneva: International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press.
- Su S, Li Y, Luo Y, Sheng Y, Su Y, Padia RN *et al.* (2009). Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration. *Oncogene* 28: 3047–3057.

- Suen JY, Barry GD, Lohman RJ, Halili MA, Cotterell AJ, Le GT, Fairlie DP (2012). Modulating human proteinase activated receptor 2 with a novel antagonist (GB88) and agonist (GB110). *Br J Pharmacol* 165: 1413–1423.
- Suen JY, Cotterell A, Lohman RJ, Lim J, Han A, Yau MK *et al.* (2014). Pathway-selective antagonism of proteinase activated receptor 2. *Br J Pharmacol* 171: 4112–4124.
- Sugimoto T, Itagaki K, Irie K (2008). Design and physicochemical properties of new fluorescent ligands of protein kinase C isozymes focused on CH/ π interaction. *Bioorg Med Chem* 16: 650–657.
- Svensson KJ, Kucharzewska P, Christianson HC, Sköld S, Löfstedt T, Johansson MC *et al.* (2011). Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 108: 13147–13152.
- Taniguchi H, Manenti S (1993). Interaction of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) with membrane phospholipids. *J Biol Chem* 268: 9960–9963.
- Techasen A, Loilome W, Namwat N, Takahashi E, Sugihara E, Puapairoj A *et al.* (2010). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via the protein kinase C-dependent pathway. *Cancer Sci* 101: 658–665.
- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 351: 320–322.
- Tu S, Wu WJ, Wang J, Cerione RA (2003). Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278: 49293–49300.
- van den Berg, Yascha W, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH (2012). The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* 119: 924–932.
- Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Ellies LG, Andrade-Gordon P, Mueller BM, Ruf W (2008). Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res* 68: 7219–7227.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057–1068.
- Walker, Julia K L, DeFea KA (2014). Role for beta-arrestin in mediating paradoxical beta2AR and PAR2 signaling in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 16: 142–147.
- Weithauser A, Bobbert P, Antoniak S, Böhm A, Rauch BH, Klingel K *et al.* (2013). Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 62: 1737–1745.

- Wu B, Zhou H, Hu L, Mu Y, Wu Y (2013). Involvement of PKC α activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumour Biol* 34: 837–846.
- Wulf J, Pohl WG (1977). Calcium ion-flux across phosphatidylcholine membranes mediated by ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta* 465: 471–485.
- Xie L, Duan Z, Liu C, Zheng Y, Zhou J (2015). Protease-activated receptor 2 agonist increases cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells. *Exp Ther Med* 9: 239–244.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A *et al.* (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 6642–6646.
- Yanagita RC, Torii K, Nakagawa Y, Irie K (2007). Binding Selectivity of 1-or 12-substituted Indolactam Derivatives for Protein Kinase C Isozymes. *Heterocycles* 73: 289–302.
- Yeagle PL, Albert AD (2007). G-protein coupled receptor structure. *Biochim Biophys Acta* 1768: 808–824.
- Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y *et al.* (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 492: 387–392.
- Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW (2014). Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol* 5: 67.
- Zoudilova M, Kumar P, Ge L, Wang P, Bokoch GM, DeFea KA (2007). Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 282: 20634–20646.
- Zoudilova M, Min J, Richards HL, Carter D, Huang T, DeFea KA (2010). beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 285: 14318–14329.

X. Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

S Stahn, L Thelen, I M Albrecht, J Bitzer, T Henkel and N Teusch, Teleocidin A2 inhibits human proteinase activated receptor 2 signaling in tumor cells, *Pharmacology Research & Perspectives*, 2016, in press

Björn Palitzsch, Nikola Gaidzik, Natascha Stergiou, Sonja Stahn, Sebastian Hartmann, Bastian Gerlitzki, Nicole Teusch, Peer Flemming, Edgar Schmitt, Horst Kunz (2016), A Synthetic Glycopeptide Vaccine for the Induction of a Monoclonal Antibody that Differentiates between Normal and Tumor Mammary Cells and Enables the Diagnosis of Human Pancreatic Cancer. *Angew Chem Int Ed.* 55 (8): 2894-2898.

Poster

S Stahn and N Teusch

Pharmacological activation and inhibition of endogenous PAR-2 in tumor cells and primary endothelial cells

Angiogenesis Gordon Research Seminar (GRS)

Biology of Pathological Angiogenesis and Anti-Angiogenesis Therapy, Salve Regina University, Newport, RI, 03.-04.08.2013

Vorträge

S Stahn

Teleocidin A2 inhibits human proteinase activated receptor (PAR) 2 signaling in tumour cells

Summer Academy Pharmacology, Topics: Signaling and GPCR-Pharmacology

Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie DGP e.V.

DFG Graduiertenkolleg 1873

Bonn, 27.-29.09.2015

S Stahn

Pharmacological inhibition of Protease Activated Receptor (PAR) 2:

Validation of a novel class of small molecule antagonists

Annual Retreat Graduate Program in “Pharmacology and Experimental Therapeutics”

Maria in der Aue, 11.-12.09.2014

S Stahn

Pharmacological activation and inhibition of endogenous PAR-2 in tumor cells and primary endothelial cells

Annual Retreat Graduate Program in “Pharmacology and Experimental Therapeutics”

Maria in der Aue, 14.-15.10.2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Nicole Teusch für die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten Promotionsthemas, für die gesamte Betreuung und für die Anregungen und Ratschläge. Ihr tatkräftiger Einsatz ermöglichte die Teilnahme an Seminaren und Workshops des Graduiertenkollegs, die immer sehr hilfreich waren. Auch der Aufbau des Zellkulturlabors an der Fakultät für angewandte Naturwissenschaften der TH Köln besonders zu Beginn der Promotion war eine schöne und spannende Aufgabe, an der ich mitarbeiten durfte.

Ein besonders großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Johannes-Peter Stasch für die freundliche Übernahme der Betreuung von universitärer Seite, sodass die kooperative Promotion an der TH Köln und der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möglich wurde.

Herrn Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz und Jan Erik Stein aus dem Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln danke ich für die erfolgreiche Kooperation, die die Charakterisierung neuer chemisch synthetisierter Indolactam V Derivate erst ermöglichte.

Der gleiche Dank gilt Herrn Dr. Thomas Henkel und Herrn Dr. Jens Bitzer von IMD Natural Solutions GmbH, Dortmund für die freundliche Bereitstellung der Teleocidin Naturstoffderivate.

Auch Herrn Prof. Dr. Stephan Rosenkranz und Christine Joseph aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln danke ich für die sehr aufschlussreichen Diskussionen.

Ein herzlicher Dank geht an meine beiden Studentinnen Ina-Maria Albrecht und Lisa Thelen für ihre Motivation, ihr großes Engagement und ihre Unermüdlichkeit Ca^{2+} Versuche durchzuführen.

Liebes 5.OG! Ihr seid großartig! Ich bedanke mich für eine immer ausgesprochen kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre. Den Mitgliedern der Fakultät 11 danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Allen sorgfältigen Korrekturlesern danke ich für die hilfreichen Anmerkungen und die Aufspürung verlorengegangener Wörter und extrem langer verwirrender Sätze. Insbesondere danke ich Katharina Toepler und Katharina Haas für ihren großartigen Einsatz, der mir sehr viel bedeutet hat.

Meiner lieben Familie, Eltern und Freunden danke ich von ganzem Herzen für ihre entgegengebrachte Nachsicht und Wärme und der herzlichen Aufmunterung durch vielseitige kulinarische Köstlichkeiten. Ein besonders lieber Dank geht an Oma B., die mir eine ganz wunderbar positive Sicht auf das Leben mitgegeben hat.

Zu guter Letzt danke ich von ganzem Herzen meinem liebsten Freund, der mir die gewisse Stärke und Gelassenheit beigebracht hat und ausnahmslos immer für mich da ist.

Eidesstattliche Erklärung

Vor- und Zuname: Sonja Stahn
Geburtsdatum: 14.10.1986
Geburtsort: Meerbusch

Hiermit versichere ich,

dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Name, Vorname	Stahn, Sonja
Geburtsdatum	14.10.1986
Geburtsort	Meerbusch
Geschlecht	weiblich
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1997 – 2006	Gymnasium am Stadtpark, Krefeld-Uerdingen
09.06.2006	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

09/2006 – 09/2009	Studium der Molekularen Biologie an der Westfälischen Hochschule, ehemals Fachhochschule Gelsenkirchen
13.08.2009	Abschluss Bachelor of Science
10/2009 – 12/2011	Masterstudiengang Molekulare Biotechnologie an der RWTH Aachen „Optimierung MOG-basierter Immuntoxine zur Eliminierung autoreaktiver B-Lymphozyten“
08.12.2011	Abschluss Master of Science

Promotion

07.01.2013	Beginn der Promotion an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften an der Technischen Hochschule Köln, unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Nicole Teusch, in Kooperation mit der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch. Assoziiertes Mitglied im Graduiertenprogramm in „Pharmacology and Experimental Therapeutics“ des Institutes für Pharmakologie der Universität zu Köln
------------	---

Berufstätigkeit

seit 02/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der TH Köln im Bereich Biopharmazeutische Chemie und Molekulare Pharmakologie
--------------	--

Neuss, 28. Oktober 2015