Isolierung und Charakterisierung pulmonal-arterieller Endothelzellen von Patienten mit Lungenerkrankungen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anna Schumacher

aus Schwetzingen

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Gutachterin: Prof. Dr. Grazyna Kwapiszewska

Tag der Disputation: 28. September 2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung....1
1.1 Endothelzellen....1
1.2 Pulmonale Hypertonie....2
1.2.1 Grundlagen der pulmonalen Hypertonie....2
1.2.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der pulmonalen Hypertonie....6
1.3 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung....7
1.3.1 Grundlagen der COPD....7
1.3.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der COPD....9
1.4 Lungenfibrose....10
1.4.1 Grundlagen der Lungenfibrose....10
1.4.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der Lungenfibrose....11
1.5 Inhibition der Proliferation....12
1.5.1 Palbociclib....13
1.5.2 Regorafenib....14
1.5.3 Ruxolitinib....15
1.6 Fragestellung....16
2. Material und Methoden....17
2.1 Material....17
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen....17
2.1.2 Geräte....19
2.1.3 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien....20
2.1.4 Antikörper und Markerproteine....21
2.1.5 Zellkultur....22
2.1.5.1 Zelllinien, humane Patientenproben....22
2.1.5.2 Medium, Zusätze....23
2.1.6 Software....23
2.1.7 Verbrauchsgegenstände....24

2.2 Methoden 26
2.2.1 Zellkultur 26
2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS) 27
2.2.3 Proteinanalytik 29
2.2.3.1 Proteinisolierung 29
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung 30
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 30
2.2.3.4 Proteinnachweis durch Immunoblot 32
2.2.4 RNA-Isolation 33
2.2.5 Immunfluoreszenz 33
2.2.6 Messung der Proliferation 34
2.2.7 Messung der Angiogenese 36
2.2.8 Statistik 37
2.2.8.1 Proliferationstest 37
2.2.8.2 Angiogenesetest 38
3. Ergebnisse 39
3.1 Überblick 39
3.2 Etablierung des Protokolls für die Isolation von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen 39
3.2.1 Hintergrund 39
3.2.2 Darstellung des Protokolls für die Isolation von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen 39
3.2.3 Zellisolationen und Diagnosen 45
3.2.4 Kryokonservierung der Zellen 47
3.2.5 Magnetische Zell-Separation 48
3.3 Endothelzellnachweise 49
3.3.1 Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung 49
3.3.2 Western Blot 49
3.3.3 Immunfluoreszenz 51
3.4 Funktionelle Charakterisierung der isolierten Endothelzellen 53

3.4.1 Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung 53
3.4.2 BrdU-Test 53
3.4.2.1 Aufbau und Hintergrund 53
3.4.2.2 Testergebnisse 54
3.4.3 Angiogenesetest 56
3.4.3.1 Aufbau und Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung 56
3.4.3.2 Testergebnisse 60
4. Diskussion 63
4.1 Einordung in den wissenschaftlichen Kontext bei den verschiedenen Lungenerkrankungen 63
4.2 Isolation von pulmonal-arteriellen Endothelzellen 64
4.3 Bestätigung der Endothelzellidentität 65
4.4 Charakterisierung der Endothelzellen 66
4.4.1 Kinase-Inhibitoren zur Hemmung der zellulären Proliferation 66
4.4.2 Proliferation der Endothelzellen 68
4.4.3 Angiogenese 69
4.5 Limitationen der Arbeit 70
4.6 Ausblick 71
5. Zusammenfassung 73
6. Summary 74
7. Abkürzungsverzeichnis 75
8. Abbildungsverzeichnis 78
9. Tabellenverzeichnis 79
10. Literaturverzeichnis 80
11. Anhang 87
12. Publikationsverzeichnis 107
13. Ehrenwörtliche Erklärung 108
14. Danksagung 109

1. Einleitung

„Die in meiner Dissertation verwendeten Personengruppen beziehen sich immer gleichermaßen auf weibliche und männliche Personen. Auf eine Doppelnennung und gegenderte Bezeichnung wird zugunsten einer besseren Lesbarkeit verzichtet.“

1.1 Endothelzellen

Endothelzellen (siehe Abbildung 1 A), bilden die innere an das Blut bzw. die Lymphe grenzende Zellschicht der Herzhöhlen sowie der Blut- und Lymphgefäße. Sprachlich leiten sie sich von griechisch endon für „innen, innerhalb“ und thelein für „üppig wachsen“ ab. Das Endothel ist eine einschichtige Reihe vorwiegend platter Zellen. Gemeinsam mit dem Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna bildet es die Tunica intima der Blutgefäße (siehe Abbildung 1 B, C).

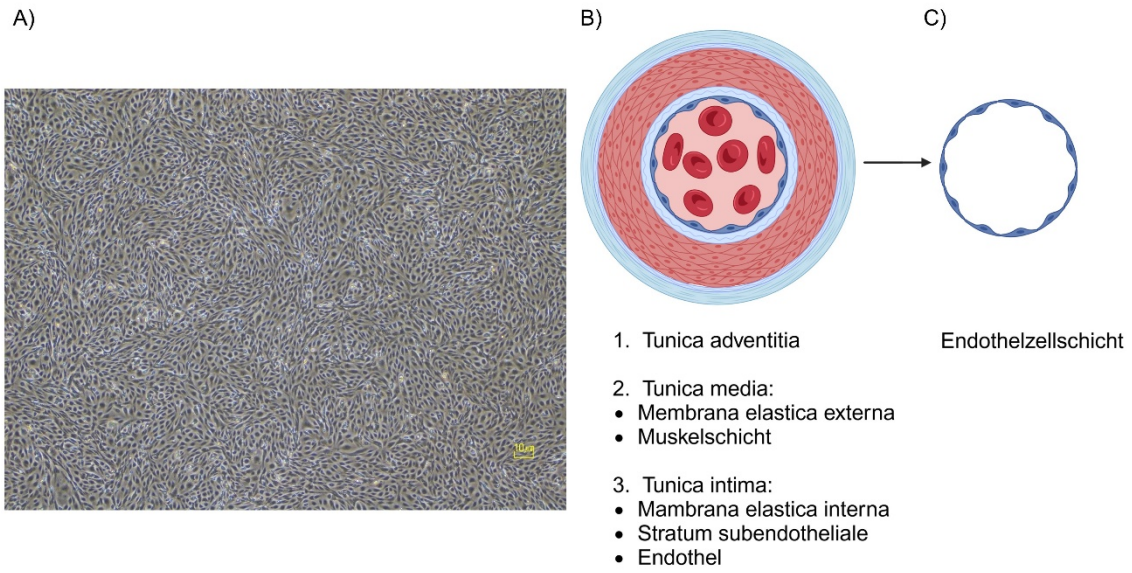


Abbildung 1: Aufbau einer Arterie im Querschnitt und Endothelzellen.

Abbildung A zeigt die Endothelzellen im Mikroskop. Bei den hier dargestellten Endothelzellen handelt es sich um isolierte pulmonal-arterielle Endothelzellen. Abbildung B zeigt schematisch den Querschnitt einer Arterie. Von außen nach innen sind die drei Schichten Tunica adventita, Tunica media (bestehend aus der Membrana elastica externa und der Muskelschicht) und die Tunica intima zu sehen, welche wiederum aus der Membrana elastica interna, dem Stratum subendotheliale und dem Endothel besteht. In Teil C ist das Endothel zu sehen, welches die innerste Schicht einer Arterie bildet und sich als einschichtige Reihe flacher Zellen darstellt. Abbildung B und C wurden mit BioRender.com erstellt.

Den Endothelzellen kommt vor allen Dingen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung des funktionellen Kreislaufsystems, der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, der Regulierung des Blutflusses sowie des Transports von Immunzellen und der Gewebshomöostase zu [60, 69]. Zudem fungieren sie als parakrine Unterstützer für umgebende nicht-vaskuläre Zellen [60, 69]. Neuere Fortschritte in der Einzelzellgenomik (deutsch für *single cell genomics*) und genetische *in-vivo*-Markierung sorgen für einen besseren Einblick in Entwicklung, Plastizität und Heterogenität von Endothelzellen und somit auch für eine neues Verständnis des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von Endothelsubtypen [60]. Durch die Identifizierung neuartiger, gewebsspezifischer Expressionsmuster in Endothelzellen wurden entscheidende Signalwege und neue Interaktionen mit anderen Zelltypen entdeckt. Funktionsstörungen der vaskulären Endothelzellen haben somit eine zentrale Bedeutung für das Fortschreiten von Pathologien wie chronischen Erkrankungen, ischämischen Herzerkrankungen und Schlaganfällen [60].

Eine besonders große Rolle spielen Endothelzellen bei der Pathophysiologie und Pathogenese der pulmonalen Hypertonie (PH); aber sie sind auch an der Entstehung von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (deutsch für *chronic obstructive pulmonary diseases*, COPD) vor allem im Zusammenhang mit Zigarettenrauch beteiligt [5, 42]. Eine Charakteristik der Endothelzellen stellt die Endothel-zu-Mesenchym-Transition dar, wobei Endothelzellen ihre Polarität und Zell-Zell-Kontakte verlieren, was zu einer dramatischen Umgestaltung des Zytoskeletts führt und u.a. zur Entstehung der oben genannten Pathologien beiträgt [58].

Da in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Lungengewebe von COPD- und Lungenfibrose-Patienten für die Etablierung des Protokolls zur Endothelzell-Isolation verwendet wurde, soll im nachfolgenden Abschnitt in Ergänzung zur pulmonalen Hypertonie näher auf diese beiden Lungenerkrankungen eingegangen werden.

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Grundlagen der pulmonalen Hypertonie

Die PH umschreibt eine Gruppe pathophysiologischer Störungen mit verschiedenen Ursachen, die eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks vereint. Die daraus resultierende Rechtsherzbelastung kann zu einem Rechtsherzversagen führen, das im Endstadium tödlich verlaufen kann. Definiert ist die PH nach Humbert et al. als ein mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP) >20 mmHg in Ruhe [21], welcher durch

einen Rechtsherzkatheter gemessen wird. Die verschiedenen Formen der PH werden dann nochmals in prä- und post-kapillär unterteilt. Dies wird über den pulmonal-kapillären Verschlussdruck (deutsch für *pulmonary arterial wedge pressure*, PAWP) und den pulmonalen Gefäßwiderstand (deutsch für *pulmonary vascular resistance*, PVR) bestimmt. Es werden fünf verschiedene Gruppen nach ihrer Ätiologie unterschieden, um sowohl die Diagnostik als auch die Therapie zielgerichtet und effektiv zu gestalten (siehe Tabelle 1).

Gruppe 1: Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)
- Idiopathisch
- Hereditär
- Medikamentös/ toxisch
- Assoziiert mit
    - Bindegewebserkrankungen
    - HIV-Infektionen (Human Immunodeficiency Virus)
    - Portaler Hypertension
    - Angeborenen Herzerkrankungen
    - Schistosomiasis-Infektionen
- Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
- Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

Gruppe 2: Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Linksherzerkrankungen
- Linksherzversagen mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion
- Linksherzversagen mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion
- Klappenvitien
- Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Bedingungen, die zu post-kapillärer PH führen

Gruppe 3: Pulmonale Hypertonie durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
- Obstruktive Lungenerkrankungen oder Emphysem
- Restriktive Lungenerkrankungen
- Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktiven Mustern
- Hypoxie ohne Lungenerkrankungen (zum Beispiel große Höhen)
- Entwicklungsstörungen der Lunge

Gruppe 4: Pulmonale Hypertonie durch pulmonal-arterielle Obstruktionen
- Chronisch Thromboembolische Pulmonale Hypertonie (CTEPH)
- Andere pulmonal-arterielle Obstruktionen

Gruppe 5: Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
- Hämatologische Erkrankungen
- Systemische Erkrankungen
- Metabolische Störungen
- Chronische Niereninsuffizienz mit/ohne Hämodialyse
- Lungentumorbedingte thrombotische Mikroangiopathie
- Fibrosierende Mediastinitis

Tabelle 1: Klassifikation der PH.

Die Tabelle stellt die Klassifikation der PH und deren fünf Gruppen dar und wurde aus den Leitlinien für die Diagnose und Behandlung der pulmonalen Hypertonie 2022 entnommen [21].

Gruppe 1 umfasst die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), welche als prä-kapilläre PH ohne anderweitige Ursachen definiert ist. Darunter fällt sowohl die idiopathische als auch die erbliche, medikamentös oder toxisch bedingte Form sowie die Formen, die mit anderen Erkrankungen vergesellschaftet sind, wie Erkrankungen des Bindegewebes, Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), die portale Hypertension, angeborene Herzerkrankungen, Schistosomiasis-Infektionen, pulmonale veno-okklusive Erkrankungen, die pulmonale kapilläre Hämangiomatose oder die persistierende PH des Neugeborenen. Gruppe 2 subsummiert die Fälle, welche mit Erkrankungen des linken Herzens assoziiert sind. Die Steigerung des linksatrialen Drucks und der damit einhergehende erhöhte Druck in der venösen pulmonalen Strombahn bedingen eine sekundäre PH. Gruppe 3 schließt die Patienten mit PH durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie ein. Darunter fallen obstruktive, restriktive und kombinierte Lungenerkrankungen sowie Entwicklungsstörungen der Lunge und Hypoxie ohne Lungenerkrankungen, z.B. durch einen Aufenthalt in großer Höhe. Unter Gruppe 4 wird die PH durch pulmonal-arterielle Obstruktionen verstanden. Dies schließt Patienten mit Chronisch Thromboembolischer Pulmonaler Hypertonie (CTEPH) und anderen pulmonal-arteriellen Obstruktionen ein. Die fünfte und letzte Gruppe umfasst die Formen der PH, die mit unklaren oder multifaktoriellen Mechanismen assoziiert sind [21].

Die PH ist ein wichtiges globales Gesundheitsproblem, von dem alle Altersgruppen betroffen sind. Aktuelle Schätzungen gehen von einer Prävalenz von ungefähr 1 % der Weltbevölkerung aus. Aufgrund von kardialen und pulmonalen Ursachen ist die Prävalenz in den Altersklassen über 65 Jahre höher. Linksherzerkrankungen als

Ursache für eine sekundäre PH machen weltweit den größten Anteil aus (Gruppe 2), während die Lungenerkrankungen und hierbei insbesondere die COPD, die zweithäufigste Ursache darstellen (Gruppe 3). Besonders wichtig ist es daher, die PH möglichst früh zu diagnostizieren, die zugrundeliegenden Erkrankungen sowie Komorbiditäten zu erkennen und die Risikofaktoren auszumachen bzw. ggf. zu minimieren [21].

Die Pathophysiologie der idiopathischen PH (zugehörig zu Gruppe 1) beläuft sich auf eine progrediente Obliteration der kleinen und mittelgroßen Pulmonalarterien, deren Ursache bisher unvollständig geklärt ist. Vaskuläre Umstrukturierung, Intima-Proliferation, Fibrose, mediale Hypertrophie, obstruktive plexiforme Läsionen, dysregulierte Vasokonstriktion und Thrombosen führen zu einem erhöhten Widerstand der Pulmonalgefäße, was zu einer Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast und dadurch bedingten Dilatation bzw. Hypertrophie des rechten Ventrikels mit anschließender Rechtsherzdekompensation führt [12]. Physikalisch ist dies näherungsweise über das Verhältnis von Gefäßradius zum Gefäßwiderstand nach dem Hagen-Poiseuille Gesetz und dem Ohm`schen Gesetz zu erklären. Eine Halbierung des Gefäßradius führt zu einer 16-fachen Erhöhung des Gefäßwiderstands (siehe Abbildung 2). Dies zeigt, dass schon kleinste Obstruktionen zu einer drastischen Erhöhung des Widerstands in den pulmonalen Gefäßen und somit auch zu einer PH führen können [4].

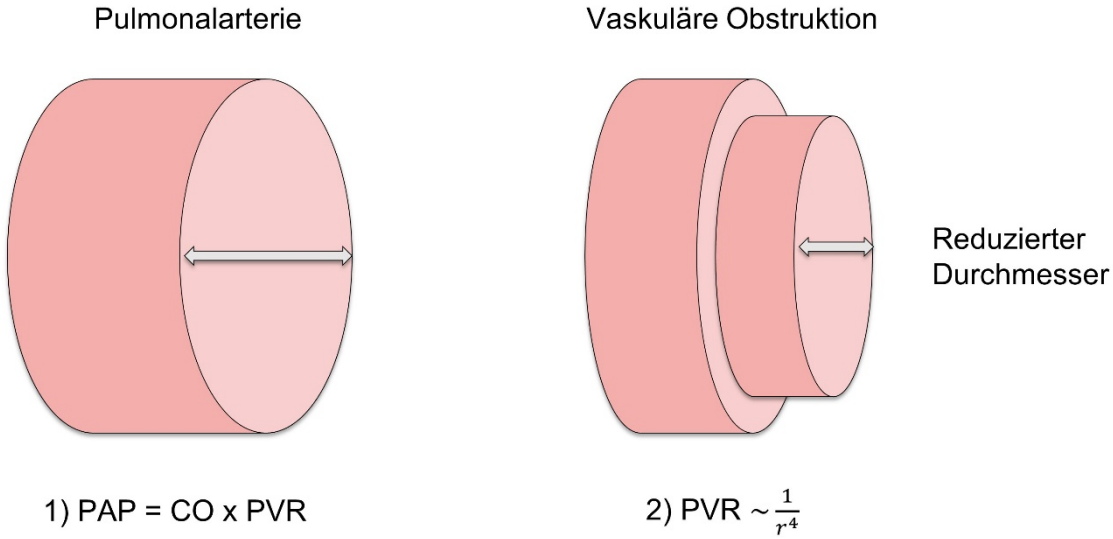


Abbildung 2: Pathogenese der PAH (Vaskuläre Obstruktion).

Schematisch dargestellt ist der normale Durchmesser einer Pulmonalarterie im Vergleich zu einer Pulmonalarterie mit vaskulärer Obstruktion und dadurch reduziertem Gefäßdurchmesser. Der pulmonal-arterielle Druck (PAP) ist vom Herzzeitvolumen (CO) und dem Gefäßwiderstand (PVR) abhängig. Der Gefäßwiederstand seinerseits verhält sich umgekehrt proportional zur vierfachen Potenz des Gefäßradius (r). Daraus leitet

sich eine 16-fache Erhöhung des Gefäßwiderstands bei Halbierung des Gefäßradius ab [4].

Die Symptome der PH hängen hauptsächlich mit der Dysfunktion des rechten Ventrikels zusammen und äußern sich im frühen Krankheitsverlauf typischerweise als Dyspnoe bei körperlicher Anstrengung. Später können Symptome wie Sinustachykardie, Schwindel, Müdigkeit, Synkopen, Zyanose und Brustschmerzen hinzukommen. Zur Diagnosestellung dient als Goldstandard der Rechtsherzkatheter, wobei auch andere Methoden, wie eine Echokardiografie, ein Röntgen-Thorax, eine Lungenfunktionsuntersuchung oder ein Elektrokardiogramm (EKG) unterstützend herangezogen werden können [18, 21]. Bisher ist die PH nicht heilbar, die Behandlungsmöglichkeiten haben sich allerdings in den letzten Jahren erweitert und es sind verschiedene unterstützende Therapiemöglichkeiten je nach PH-Gruppe verfügbar [18]. Sowohl die Behandlung der assoziierten Grunderkrankungen als auch die gezielte PAH Therapie spielen eine wichtige Rolle, um den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Die Wirkstoffklassen der gezielten Therapie der PAH umfassen beispielsweise Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, PDE-5-Hemmer, Guanylatcyclase-Stimulatoren, Prostacyclin-Analoga und Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten [29, 52].

1.2.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der pulmonalen Hypertonie

Bei der PAH ist ein Umbauprozess aller drei angesprochenen Gefäßschichten zu beobachten. Dieser ist durch gesteigerte Zellproliferation, gestörtes Apoptose-Verhalten, vermehrte Zellmigration und Zelldifferenzierung sowie erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten gekennzeichnet [55]. Dysfunktionale pulmonal-arterielle Endothelzellen tragen somit zur Entstehung sowie auch zum Fortschreiten der Erkrankung bei (siehe Abbildung 4). Es sind zwei gegenläufige Hypothesen zum Verhalten der Endothelzellen bei PH beschrieben, wobei zum einen eine Apoptose-Resistenz der Zellen und zum anderen eine beschleunigte und anhaltende Apoptose diskutiert wird. Zudem wurde die Freisetzung eines anormalen Sekretoms der pulmonal-arteriellen Endothelzellen beobachtet, was zur Hyperproliferation der glatten Muskelzellen sowie zur Aktivierung von Fibroblasten in der Lungenarterien führt [12, 54, 58]. Die beschriebene Apoptose-Resistenz resultiert in unkontrollierter Proliferation und Re-Organisation des Zytoskeletts von Endothelzellen, wodurch der zuvor genannte Pathomechanismus bedingt ist [5]. Bei der schon angesprochenen Endothel-zu-Mesenchym-Transition können die Endothelzellen durch Umwandlung in glatte

Muskelzellen mit höherer Proliferations- und Migrationsfähigkeit durch parakrine Effekte auf intimale und mediale Proliferation, zur Pathogenese der PAH beitragen [58].

Um die übermäßige Proliferation der Endothelzellen bei der PH einzuschränken und damit auch die Obstruktion und den damit einhergehenden pulmonalen Widerstand herabzusetzen, werden verschiedene Ansätze verfolgt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schermuly wird aktuell an verschiedenen Inhibitoren, wie z.B. Palbociclib, Ruxolitinib und Regorafenib geforscht, weshalb diese auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

1.3 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

1.3.1 Grundlagen der COPD

Die COPD ist eine langsam fortschreitende, bisher unheilbare Lungenerkrankung und betrifft weltweit ca. 13 % der Bevölkerung über 40 Jahre. Sie stellt die dritthäufigste Todesursache dar und ist mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate verbunden [16]. Bei der COPD handelt es sich ähnliche wie bei der PH um eine heterogene Erkrankung, welche sich allerdings durch eine irreversible Blockade der Atemwege und eine Zerstörung der Alveolen auszeichnet. Sowohl epitheliale Veränderungen als auch ein Ungleichgewicht zwischen Proteolyse und Proteinsynthese, epigenetische Veränderungen, ein Einströmen von Entzündungszellen in die Lunge, oxidativer Stress, Autophagie und mitochondriale Dysfunktion werden beobachtet. Partikelschadstoffe aus Zigarettenrauch und verschmutzter Luft führen zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (deutsch für *reactive oxygene species*, ROS), für die vor allem Mitochondrien sehr anfällig sind. ROS verursachen unter anderem Zellschädigungen und Zelltod in der Lunge, was zu Zilienschäden, Atemwegsverengung, Dyspnoe, Schleimübersekretion und Entzündungen führen kann (siehe Abbildung 3) [22].

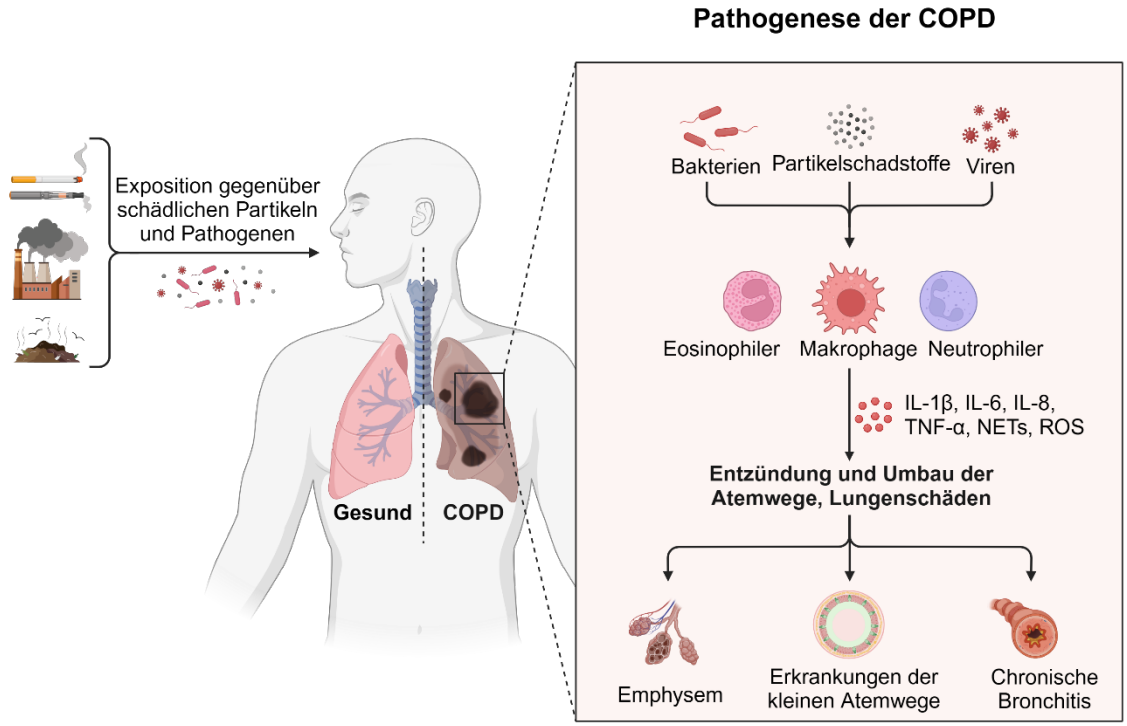


Abbildung 3: Pathogenese der COPD.

Partikelschadstoffe aus Zigarettenrauch und der Umwelt führen zu einer über verschiedene Entzündungsmediatoren, wie Interleukine (IL), u.a. IL-1ß, IL-6, IL-8, TNF-α, NETs, ROS vermittelten Entzündung, einem Gefäß-Umbau und zur Zerstörung der Luftwege. Emphyseme, chronische Bronchitis und eine Erkrankung der kleinen Luftwege sind die Folge. Diese Graphik wurde mir BioRender.com erstellt.

Patienten mit COPD haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen. Des Weiteren steigert eine begleitende PH, die bei über 90 % der Patienten zu beobachten ist, das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko nochmals erheblich. Die Behandlungsmöglichkeiten sind bei dieser Konstellation bislang begrenzt [14]. Aktuell wird die COPD in erster Linie symptomatisch je nach Schweregrad mit inhalativen ß$_2$-Sympathomimetika, Muskarinrezeptor-Antagonisten, inhalativen Glukokortikoiden und Phosphodiesterase-4- (PDE-4)-Hemmern behandelt [16, 67]. Allerdings wird auch an diversen Kinase-Inhibitoren geforscht, welche einen positiven Effekt auf die COPD haben sollen. Es wird angenommen, dass Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Expression und Aktivierung von Entzündungsmediatoren in den Atemwegen, bei der Funktion von T-Zellen und der Umgestaltung der Atemwege spielen. Pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren, die bei Atemwegserkrankungen häufig aktiviert sind, erfordern die Aktivierung bestimmter Kinasen, weshalb entsprechende Inhibitoren getestet werden, um spezifische Kinasen, die bei COPD überexprimiert oder überaktiviert sind, gezielt zu beeinflussen. Mitogen-aktivierte

Proteinkinasen (MAPK) spielen hierbei im Zusammenhang mit der bei COPD auftretenden Entzündung eine große Rolle, weshalb MAPK-Inhibitoren wie SB-203580 Gegenstand der aktuellen Forschung sind [1]. Auch der Nukleare Faktor κB (NF-κB) ist im Rahmen der Entzündungsreaktion bei COPD aktiv, weshalb auch Inhibitoren im Zusammenhang mit dieser Zielstruktur einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnten [1, 62].

1.3.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der COPD

Endothelzellen spielen ähnlich wie bei der PH auch bei der Pathogenese der COPD eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Zu beobachten ist eine Intima-Hyperplasie in den Lungenarterien und eine abnorme endothelabhängige Gefäßreaktivität [11]. Vermutet wird, dass sich die systemische Entzündung bei der COPD auf eine endotheliale Dysfunktion im Zusammenhang mit den endothelialen Vorläuferzellen auswirkt, da diese typischerweise an vaskulären Reparaturprozessen beteiligt sind (siehe Abbildung 4). Zudem wurde festgestellt, dass bei COPD weniger Endothelzellen zirkulieren, diese jedoch vermehrt in den Lungenarterien vorzufinden sind. Ferner korrelieren die zirkulierenden Endothelzellen negativ mit der Hypoxämie und dem Schweregrad der Atemwegsobstruktion. Körperliche Aktivität beeinflusst sowohl die systemische Entzündung als auch die endotheliale Dysfunktion und die Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen positiv [42]. Auffällig ist zudem, dass die endotheliale Dysfunktion und der Gefäßumbau ausschließlich in den Lungenarterien zu beobachten war, was sich durch eine verminderte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (deutsch für *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) und durch wenig differenzierte glatte Muskelzellen in den Lungengefäßen äußerte [11]. Die endotheliale Dysfunktion führt zu verminderter Elastizität der Gefäße und aufgrund des Mangels an Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin zu einer Überproduktion von Thromboxan A2 und Endothelin 1. Im weiteren Verlauf führt dies zu einem Lungenemphysem, welches ein linksseitiges Herzversagen und in der Folge einen Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks bedingen kann [14]. Endothelzellverlust, Ablösung und frühzeitige Apoptose können gemeinsam mit Atherosklerose und geschwächten Zell-Zell-Kontakten für Gefäßundichtigkeiten sorgen [17, 56, 59].

Vermutet wird außerdem, dass Zigarettenrauch entweder eine direkte Wirkung auf die Endothelzellen hat oder diese durch einen Entzündungsmechanismus indirekt Schaden nehmen. Bei Inkubation von pulmonal-arteriellen Endothelzellen mit Zigarettenrauch konnte eine dosisabhängige Hemmung der endothelialen Wundheilung, der Bildung von

Röhren auf Matrigel, der Migration in der Boyden-Kammer und der Proliferation festgestellt werden. Die Hemmung der Angiogenese der Endothelzellen durch Zigarettenrauch hängt unter anderem mit der Abnahme der Calpain-Aktivität zusammen, welche an der Signaltransduktion, Zellmigration, und -differenzierung beteiligt ist [57].

1.4 Lungenfibrose

1.4.1 Grundlagen der Lungenfibrose

Bei der idiopathischen Lungenfibrose handelt es sich um eine schwerwiegende, altersbedingte interstitielle Lungenerkrankung mit eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten. Die Kombination umweltbedingter, altersbedingter und genetischer Faktoren schafft gemeinsam ein für endogene und exogene Faktoren anfälliges Alveolarepithel [43]. Aus den pathologischen Veränderungen resultiert zumeist eine restriktive Ventilationsstörung, welche ein Cor pulmonale und eine respiratorische Insuffizienz zur Folge haben kann. Da die Patienten lange asymptomatisch bleiben, bedarf die Diagnosestellung einen multidisziplinären Ansatz aus Pulmologen, Radiologen und Pathologen, jeweils mit Erfahrung auf dem Gebiet der Fibrose. Ein wabenartiges Muster in der Computertomographie (CT) oder Nachweise in der Lungenbiopsie können zur Diagnose-Sicherung unterstützend herangezogen werden. Das mittlere Überleben nach Diagnosestellung beträgt 2,5 bis 3,5 Jahre, wobei ein Lebensalter von über 70 Jahre, eine Raucheranamnese, ein geringer „Body-Mass-Index“ (BMI), eine schwere physiologische Beeinträchtigung, ein großes radiologisches Ausmaß sowie eine begleitende pulmonale Hypertonie die Prognose nochmals erheblich verschlechtern [24].

Die Lungenfibrose scheint eine bisher nahezu unaufhaltsame Erkrankung zu sein. Dennoch wurde in den letzten Jahren erfolgreich an anti-fibrotischen Substanzen geforscht, wobei sich Nintedanib und Pirfenidon durchgesetzt haben. Nintedanib wirkt über eine Hemmung der von Tyrosinkinasen vermittelten Signalkaskade, ist also ein intrazellulärer Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher u.a. die Wachstumsfaktoren FGF (*Fibroblast Growth Factor)*, PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) und VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*) hemmt [16, 70]. Ursprünglich wurde Nintedanib als Anti-Tumor-Mittel eingesetzt, ist aber mittlerweile für die idiopathische pulmonale Fibrose, andere chronisch fibrosierende, interstitielle Lungenerkrankungen mit progressivem Phänotyp sowie mit systemischer Sklerose assoziierten, interstitielle Lungenerkrankungen zugelassen [26]. Nintedanib hemmt grundlegende Prozesse der

Fibrose, wie Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten und Fibrozyten sowie die Ablagerung extrazellulärer Matrix, was zu einer Normalisierung der gestörten mikrovaskulären Architektur der Lunge führen soll [36]. Auch Pirfenidon hemmt als TGF-ß$_1$-Antagonist die pro-fibrotischen Verhaltensweisen in Fibroblasten und Fibrozyten und wirkt entzündungshemmend [35, 36, 53]. Sowohl die Fibroblastenproliferation als auch die Ansammlung von Kollagen werden verringert, wodurch die Sterblichkeit der Patienten sinkt und das progressionsfreie Überleben ansteigt [27, 53]. Insgesamt wirken Nintedanib und Pirfenidon der Verschlechterung der Lungenfunktion bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Lungenfibrose entgegen, indem sie schlussendlich die stetige, jährliche Abnahme der forcierten Vitalkapazität verringern. Der frühe Beginn der Therapie ist hierbei für den Erhalt der Lungenfunktion, die Verringerung des Risikos für Exazerbationen und die Verbesserung der Behandlungsergebnisse entscheidend [36].

1.4.2 Die Rolle der Endothelzellen bei der Lungenfibrose

In die Pathogenese der Lungenfibrose sind verschiedene Zelltypen involviert. Abnorm aktivierte Alveolarepithelzellen führen zu einer fibrotischen Reaktion, indem sie Mediatoren produzieren, welche die Bildung von Fibroblasten- und Myofibroblastenherden durch Proliferation ansässiger mesenchymaler Zellen, Anziehung zirkulierender Fibrozyten und Stimulation des Übergangs von Epithel zu Mesenchym induzieren [24]. Aber auch die Endothelzellen sind in die Pathogenese involviert: Hierbei sorgen sie gemeinsam mit Mesenchymal- und Immunzellen durch Interaktion mit dysregulierten Epithelzellen für eine gesteigerte Fibroblasten- und Myofibroblastenproliferation [39]. Die Fibroblasten-/Myofibroblastenherde sezernieren anschließend übermäßige Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, wodurch es zu Narbenbildung und Zerstörung der Lungenarchitektur kommt (siehe Abbildung 4) [24]. Die Zerstörung der Lungenarchitektur kann sich im Röntgen-Thorax als retikuläre Zeichnungsvermehrung, bei der Auskultation als inspiratorisches Knisterrasseln und in der Lungenfunktion als restriktive Ventilationsstörung darstellen [25, 36]. Auch bei dieser Erkrankung spielt die bereits angesprochene Endothel-zu-Mesenchym-Transition eine nicht zu vernachlässigende Rolle [39, 50].

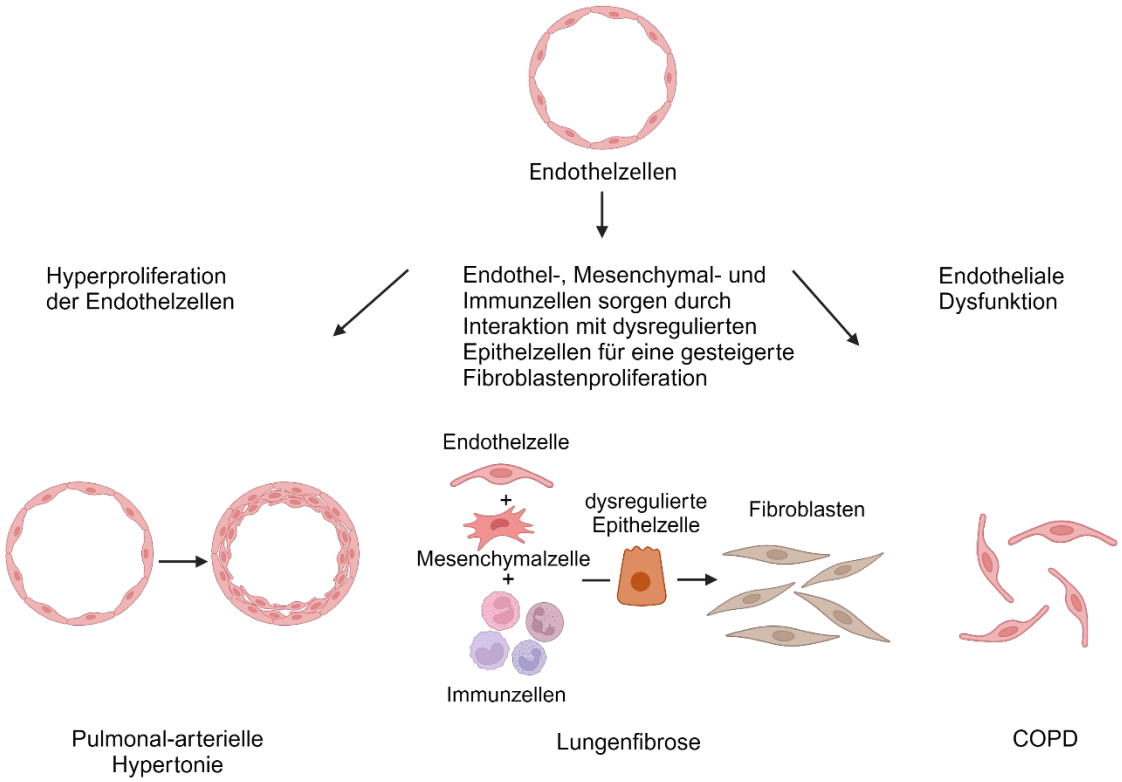


Abbildung 4: Rolle der Endothelzellen bei verschiedenen Lungenerkrankungen.

Die Abbildung zeigt die Rolle der Endothelzellen bei unterschiedlichen Lungenerkrankungen. Bei der PAH tragen die Endothelzellen unter anderem durch eine Hyperproliferation zur Pathogenese der Erkrankung bei. Die Interaktion von Endothelzellen, Mesenchymalzellen und Immunzellen mit dysregulierten Epithelzellen sorgt für eine gesteigerte Fibroblasten- und Myofibroblastenproliferation, welche eine maßgebliche Rolle bei der Lungenfibrose spielt. Bei der COPD äußert sich die Beteiligung der Endothelzellen durch eine endotheliale Dysfunktion, Endothelzellverlust und frühzeitige Apoptose. Diese Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.

1.5 Inhibition der Proliferation

Da die PAH auch als krebsähnliche Erkrankung beschrieben wird [47], wurden Kinase-Inhibitoren, welche teilweise zur Tumorbehandlung zugelassen sind, bereits auch im Zusammenhang mit der PAH erfolgreich getestet (siehe Abbildung 5). Die antiproliferativen Substanzen greifen in die Signaltransduktion ein, indem sie diese an einem bestimmten Punkt unterbrechen und die übermäßige Proliferation verhindern. Signaltransduktion beschreibt im Allgemeinen das Weiterleiten eines extrazellulären Signals in eine intrazelluläre Reaktion. Unterschieden werden intrazelluläre Rezeptoren von nukleären Rezeptoren und membranständigen Rezeptoren, welche nochmals in G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierten Kinasen, Rezeptor-Serin-/Threoninkinasen und andere enzymgekoppelte Rezeptoren

unterteilt werden. Auch die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, die in der Pathogenese der PAH eine große Rolle spielen, funktioniert über enzymgekoppelte Rezeptoren, weshalb die Inhibition der Kinasen und damit einhergehend auch der Proliferation, ein erfolgsversprechendes Therapiekonzept darstellt [19, 41, 46, 48].

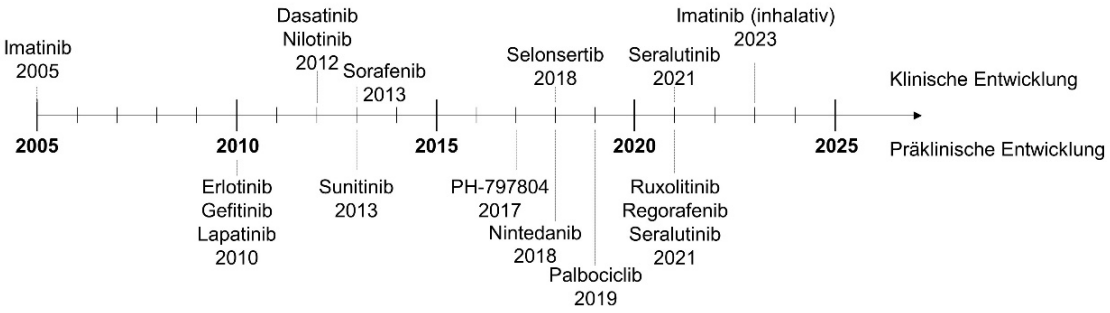


Abbildung 5: Zeitstrahl der präklinischen und klinischen Entwicklung der Kinase-Inhibitoren für die Therapie der PH.

Zu sehen ist die präklinische und klinische Entwicklung der Kinase-Inhibitoren im zeitlichen Verlauf.

Die Kinase-Inhibitoren Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib wurden u.a. auch bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schermuly vor allem hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Proliferation glatter Muskelzellen (SMC) von PAH-Patienten erfolgreich getestet. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Studie nun auch deren direkte Effekte auf Endothelzellen untersucht werden, da diese auch maßgeblich an der Pathogenese der PAH beteiligt und daher von besonderem Interesse sind [66, 68, 72].

1.5.1 Palbociclib

Der Zellzyklus bezeichnet die sich periodisch wiederholende Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen. Ein Zyklus besteht aus einer Interphase und der Mitose (M)-Phase, die über definierte Abläufe die Zellreproduktion gezielt steuern. Im Zellzyklus sind an einigen Stellen feste Kontrollpunkte eingebaut, die fehlerhafte DNA erkennen und ein Reparaturprogramm einleiten. Sollte die Reparatur nicht möglich sein, folgt die bewusste Induktion des Zelltods, d.h. der Apoptose. An diesen spezifischen Kontrollpunkten befinden sich u.a. Zyklin-abhängigen Kinasen (deutsch für *cyclin-dependent kinases*, CDKs), welche einen Komplex mit den Zyklinen bilden und damit aktiviert werden. Erst

nach deren Aktivierung kann über Phosphorylierung des nachfolgenden Retinoblastomproteins (rb) der Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus erfolgen. Palbociclib blockiert als niedermolekularer Inhibitor selektiv die Aktivität von CDK 4 und CDK 6, welche das Retinoblastom Protein (rb) für den Übergang der G1- in die S-Phase phosphorylieren. Hierdurch wird der Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus verhindert [9, 28, 51, 74]. Bei einigen Tumoren ist die Überexpression von CDKs oder die verminderte Expression von CDK-Inhibitoren nachweisbar. Aufgrund dessen werden synthetische Zellzyklusinhibitoren bei einigen Tumorerkrankungen bereits therapeutisch genutzt, um den Übergang in die nächste Zellzyklusphase und damit einhergehende gesteigerte Proliferation entarteter Zellen zu verhindern. Bei der PH handelt es sich gewissermaßen um eine tumorähnliche Erkrankung, da auch hier eine gesteigerte Proliferation verschiedener Zell-Entitäten vorliegt [47].

Durch die Kombination von Palbociclib mit Fulvestrant konnte das progressionsfreie Überleben bei Patientinnen mit einem hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom verlängert werden [9, 74]. Und auch bei glatten Muskelzellen konnte eine Proliferationshemmung erzielt werden, was einen möglichen therapeutischen Nutzen bei Patienten mit PH anzeigt [9, 68].

1.5.2 Regorafenib

Regorafenib (BAY 73-4506) ist ein Multi-Kinase-Inhibitor, der die folgenden Kinasen hemmt: „Platelet-Derived Growth Factor Receptor“ (PDGFR)-β, „Fibroblast Growth Factor Receptor“ (FGFR) 1, „Vascular Endothelial Cell-Derived Growth Factor Receptors“ 1-3 (VEGFR 1-3), „TEK-Rezeptor-Tyrosinkinase-2“ (TIE2), „Discoidin-Domain-Rezeptor-Tyrosinkinase 2“ (DDR2), Ephrin-Typ-A-Rezeptor 2 (Eph2A), Proto-Onkogene wie RET, KIT, C-RAF, B-RAF, Protein-Tyrosinkinase 5 (PTK5), Abl und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), einschließlich stress-aktivierte Proteinkinasen/c-Jun N-terminale Kinasen (SAPK/JNK) und p38 MAPK. Bislang ist er für fortgeschrittene gastrointestinale Stromatumoren, kolorektale Karzinome und als Zweitlinientherapie für bereits mit Sorafenib behandelte Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom zugelassen. Eine anti-proliferative, anti-angiogenetische und krebslimitierende Wirkung wurde bereits nachgewiesen und auch bei der pulmonalen Hypertonie wird Regorafenib ein großes Potenzial als Behandlungsmöglichkeit oder Adjuvanz zugesprochen [66].

1.5.3 Ruxolitinib

Ruxolitinib hemmt die Januskinasen (JAK) JAK-1 und JAK-2, welche dem JAK-STAT („Signal Transducers and Activators of Transcription“) -Signalweg zuzuordnen sind. Der Wirkstoff ist u.a. für die Behandlung von chronischen myeloproliferativen Erkrankungen, zu denen auch die Polycythaemia vera gehört, zugelassen. Diese Erkrankungen verstehen sich als progressive myeloproliferative Neoplasien, die durch eine Fehlregulation der JAK/Signaltransduktor- und Transkriptionsaktivator-Signalübertragung gekennzeichnet sind [63, 72]. Außerdem ist Ruxolitinib für akute „Graft-versus-Host-Erkrankungen“ zugelassen. Auch das therapeutische Potenzial von Ruxolitinib zur Therapie der PAH mit einem Fokus auf die glatten Muskelzellen wurde bereits untersucht und positive Effekte festgestellt, weshalb auch der direkte Einfluss auf die Endothelzellen relevant sein könnte [72].

1.6 Fragestellung

Der Forschungsschwerpunkt der ansässigen Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Lungenforschung lag bisher primär auf der Beteiligung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen an den verschiedenen Erkrankungen. Da aber auch Endothelzellen bei Lungenerkrankungen wie etwa der PAH, aber auch der COPD und der Lungenfibrose, eine große Rolle spielen, sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Rolle dieses weiteren pulmonal-vaskulären Zelltyps, insbesondere ihre Isolierung und Charakterisierung, im Fokus liegen. Als Ausgangspunkt für die Endothelzellisolation dienten verschiedene bereits beschriebene Möglichkeiten der Herangehensweise. Zum einen die mechanische Abtragung der Zellen mittels Skalpell [37] und zum anderen die enzymatische Isolation mittels Kollagenase oder Dispase [3, 64] dienten als Grundlage für die Etablierung der Endothelzellisolation in Gießen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile mit folgenden im Verlauf zu klärenden Fragen:

1) Etablierung eines Protokolls für die Isolation humaner pulmonal-arterieller Endothelzellen: Ist es möglich die Endothelzellen aus den Pulmonalarterien explantierter Lungen von Patienten mit Lungenerkrankungen zu isolieren? Wie funktioniert dies?

2) Sicherung der Zellidentität: Handelt es sich bei den isolierten Zellen um Endothelzellen oder sind gegebenenfalls andere Zellentitäten vorhanden?

3) Charakterisierung dieser Zellen: Wie verhalten sich die isolierten Endothelzellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen hinsichtlich Proliferation und Angiogenese? Haben die Inhibitoren Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib Einfluss auf die Proliferation und Angiogenese dieser Zellen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen

Chemikalien, Puffer, Lösungen	Hersteller (Ort, Land)	Artikelnummer
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	3029.1
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A3678
Befestigungsmittel fluoreszierend	DAKO, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)	S3023
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A3059-500G
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A3640,0005
Chemilumineszenz Substrat: Immobilon Forte Western HRP Substrat	Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA)	WBLUF0100
Chemilumineszenz Substrat: Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	34096
Dapi	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	D9542
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	D2438-50ml
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	32205-1l-M
Fibronektin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	F2006-5MG
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	252549

Gelatine (bovin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	G9391-100G
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	3908.2
Liberase	Roche (Basel, Schweiz)	5401020001
Matrigel (Wachstumsfaktor-reduziert)	Corning (Tewksbury, Massachusetts, USA)	356231
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Milchpulver Blotting grade, pulv. fettarm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	T145.3
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	P029.2
Natriumlaurysulfat (SDS Pellets)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	CN30.3
Palbociclib-HCl (PD-0332991)	Selleckchem (Houston, Texas, USA)	S1116
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS, w/o Ca and Mg)	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)	P04-36500
Regorafenib Hydrochlorid	Selleckchem (Houston, Texas, USA)	S4947
Ruxolitinib (INCB018424)	Selleckchem (Houston, Texas, USA)	S1378
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	2367.3
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Y015.1
TRIS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	4855.2
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A4975,0500
Trypan Blau	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	T8154

Trypsin 0.5%	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)	P10-024100
Tween-20	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	P7949

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller (Ort, Land)
Absaugpumpe Vacusafe und Vacuboy	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz/ Hudson, NH USA)
Biologische Sicherheitswerkbank SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
CO_2-Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Heiz- und Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
MACS-Ständer und -Separatoren	Milenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Metzenbaum kleine Schere	FST Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon (Minato, Präfektur Tokio, Japan)
Mikroskop Primovert und Axio Apotome	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Mikrotiterplatten-Lesegerät, Spektralphotometer infinite M200 pro	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Mikrozentrifuge Microstar 17	VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Multipipette M4 – Mehrfachdispenser-Pipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pinzette Graefe Forceps	FST Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pipette Eppendorf Research Plus 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz/ Hudson, NH USA)

Rollenmischer Uniroller 6 easy	LLG Labware (Meckenheim, Deutschland)
Stickstoffbehälter	CRYOTECH (Wurzen, Deutschland)
Thermo-Inkubationsmischer Thriller	PeQlab/Avantor (Radnor, Pennsylvania, USA)
Vortex-Gerät Vortex Gene 2	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Waage EMB 1000-2	Kern (Balingen-Frommern, Deutschland)
Wasserbad WNB7	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Western Blot Kamerasystem ECL Chemostar	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, Deutschland)
Western Blot System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA)
Wippschüttler DRS-12	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge 5425R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zählkammer Neubauer	Marienfeld Superior (Lauda-Königshofen, Deutschland)

2.1.3 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien

Kits, gebrauchsfertige Reagenzien	Hersteller (Ort, Land)	Artikelnummer
CD31 MicroBead Kit human (FcR Blocking Reagent, CD31 MicroBeads)	Milenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	130-091-935
Cell Proliferation ELISA (BrdU, colorimetric)	Roche (Basel, Schweiz)	11647229001
Halt Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	78444
M-PER Extraktions-Reagenz für Säugetierprotein	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	78501

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	23225
Protein-Ladepuffer (Roti-Load)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	K929.1
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	21063
QIAzol Lysis Reagent aus miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)	217004

2.1.4 Antikörper und Markerproteine

Antikörper und Markerproteine	Hersteller (Ort, Land)	Artikelnummer
Alpha-Smooth Muscle Monoclonal Anti-Actin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A2547
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)	#7076S
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)	#7074S
CD31	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)	102515
CD31	DAKO, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)	M0823
CD31	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, Deutschland)	CI948C002
eNOS	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)	610297
GAPDH	Novus Bio (Centennial, Colorado, USA)	NB600-502
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	A-11001

Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	A-21422
PageRuler vorgefärbte Proteinleiter, 10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	2661X4
Vimentin	Abcam (Cambridge, UK)	ab8069
Vinculin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	V9131

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Zelllinien, humane Patientenproben

Zelllinie, humane Patientenproben	Hersteller (Ort, Land)	Lot
Humane Fibroblasten (erkrankt)	Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC)	FB 693 (IPAH mit Fibrose, Emphysemen und Pulmonalarteriensklerose) FB 868 (COPD + sekundäre PH) 857/1 (Adventitia) ADV (COPD + Fibrose) FB 1001 (COPD mit sekundärer PH)
Humane PAECs (gesund)	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)	458Z016.15 483Z028.1
Humane PAECs (erkrankt)	Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC)	#1023, #1025, #1026, #1027, #1030, #1036, #1037, #1038, #1039, #1041, #1044, #1045, #1046, #1047, #Gi-63, #Gi-64, #Gi-65, #Gi-66
Humane PASMCs (gesund)	Lonza (Basel, Schweiz)	SM 22TL073026 SM ‘0000701036
Humane PASMCs (erkrankt)	Biobank des Lungenzentrums der	857/2 SMC

	Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC)

2.1.5.2 Medium, Zusätze

Medium, Zusätze	Hersteller (Ort, Land)	Artikelnummer
Basalmedium für Endothelzellen	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)	C-22210
Basalmedium für Fibroblasten (FBM)	Lonza (Basel, Schweiz)	CC-3131
Basalmedium für glatte Muskelzellen (SmBM)	Lonza (Basel, Schweiz)	CC-3181
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)	P06-07100
Wachstumsfaktorenzusätze für Endothelzellen	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)	C-39210
Wachstumsfaktorenzusätze für Fibroblasten (FGM)	Lonza (Basel, Schweiz)	CC-4126
Wachstumsfaktorenzusätze für glatte Muskelzellen (SmGM)	Lonza (Basel, Schweiz)	CC-4149

2.1.6 Software

Software	Hersteller (Ort, Land)
ChemoStar Imager Software	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, Deutschland)
Citavi 6	Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)
FastTrack AI Software	MetaVi Labs (Austin, Texas, USA)
GraphPad Prism 8	Graphpad Software (San Diego, Kalifornien, USA)
I-Control Software	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Magellan Software	TECAN (Männedorf, Schweiz)
ZEN 2011	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)

2.1.7 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstände	Hersteller (Ort, Land)
Aspirationspipette, 2ml, ohne Wattestopfen	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Becher transparent mit Schnappdeckel	Nerbe plus (Winsen, Deutschland)
Direktverdrängerpipettenspitzen Combitips advanced 0,1ml, 0,2ml, 0,5ml, 1ml, 2,5ml, 5ml, 10ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einfriergefäß Cryopur Röhre 2ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Filterpapier Whatman	Cytiva (Marlborough, Massachusetts, USA)
Filterspitze 0,1-10µl, 0-100µl, 100-1000µl	Nerbeplus (Winsen, Deutschland)
MACS Säulen Größe LS	Milenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikrotestplatte Mit 96 Kammern mit Deckel	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikrotiterplatte mit 96 Kammern	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Multititerplatte mit 6/12 Kammern	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Multititerplatten mit 8 Kammern (Falcon CultureSlides)	Corning (Tewksbury, Massachusetts, USA)
Multititerplatte mit 15 Kammern	Ibidi (Gräfelfing, Deutschland)
Nadel Microlance 3 (0,9 mm x 40 mm)	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Nitrilhandschuhe	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Nitrocellulose Transfermembran ROTI	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pipette steril 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitze 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitze 300µl Sapphire	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Reagiergefäß SafeSeal 1,5ml, 2ml, 5ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß PCR 0,2ml	StarLab (Hamburg, Deutschland)
Röhrchen konischer Boden 15ml, 50ml	greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

Spritze Injekt-F 1ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Zellschale 6cm, 10cm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden die pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (SMC) der Firma Lonza sowie die pulmonal-arteriellen SMC der UGMLC/DZL Biobank in Gießen genutzt, welche von einem Spender nach vorherigem Einverständnis isoliert wurden. Zudem wurden Fibroblasten von der Biobank in Gießen (UGMLC) bezogen, welche von verschiedenen Patienten mit Lungenerkrankungen nach vorherigem Einverständnis isoliert wurden. Endothelzellen von lungengesunden Spendern wurden von PromoCell bezogen, Endothelzellen von Patienten mit Lungenerkrankungen wurden aus deren Pulmonalarterien, welche von der Biobank in Gießen (UGMLC) bereitgestellt wurden, selbst isoliert. Die Etablierung des Protokolls für die Isolation der Endothelzellen ist Hauptbestandteil der Ergebnisse dieser Arbeit und wird daher im Ergebnisteil ausführlich beschrieben. Das Wachstumsmedium von Lonza, bestehend aus dem Basalmedium für glatte Muskelzellen (SmBM) und den Wachstumsfaktorenzusätzen (SmGM) wurde zur Anzucht und Kultivierung der pulmonal-arteriellen SMC eingesetzt. Die Wachstumsfaktorenzusätze für 500 ml BM beinhalten 0,5 ml Insulin, 1,0 ml humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (human Fibroblast Growth Factor (hFGF)), 0,5 ml humaner epidermaler Wachstumsfaktor (human Epidermal Growth Factor, (hEGF)), 0,5 ml Gentamicin-Amphotericin (GA-1000) und 25 ml Fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum, (FBS)). Für die Kultivierung und Anzucht der Fibroblasten wurde das Fibroblasten Basalmedium (FBM) und die dazugehörigen Wachstumsfaktorenzusätze (FGM) der Firma Lonza verwendet. Das „FGM-2 SingleQuots“ Zusatzpaket für 500 ml BM beinhaltet 0,5 ml Insulin, 0,5 ml rekombinanter humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-B (recombinant human Fibroblast Growth Factor B, (rhFGF)), 0,5 ml Gentamicin-Amphotericin (GA-1000) und 10 ml Fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS). Für die Primärzellkultur und Isolation der humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen wurde das BM und die Zusätze für Endothelzellen von PromoCell verwendet. Die Zusätze für 500 ml BM beinhalten 0,02 ml/ml fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum, (FCS-10)), 0,1 ng/ml humaner epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor (recombinant human), (hEGF-0.05)), 1 ng/ml humaner einfacher Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human), (hbFGF-0.5)), 1 µg/ml Hydrokortison (Hydrocortisone, (HC-500), endothelialer Wachstums-Zusatz (Endothelial Cell Growth Supplement) mit 90 µg/ml Heparin (ECGS/H). Zudem wurde dem Wachstumsmedium 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Zunächst wurde jeweils eine Ampulle der zuvor isolierten Endothelzellen

aufgetaut und die Zellen auf runden Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm mit 10 ml Wachstumsmedium für Endothelzellen, welches zuvor im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt wurde, auf einer mit Gelatine beschichteten Platte ausgesät. Steril gearbeitet wurde an einer Sicherheitswerkbank, zum Absaugen wurde eine Absaugpumpe genutzt. Die Zellhaltung fand in einem Inkubator mit einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO_2-Gehalt statt. Einige Tage nach Erreichen einer mikroskopisch sichtbar ausreichenden Zelldichte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und nach Absaugen des PBS wurde jeweils 1 ml Trypsin hinzugegeben. Die Platte kam für 3 min in den 37 °C warmen Inkubator und nach dieser Zeit wurde die Aktivität des Trypsins mit 2 ml Endothelzellmedium abgestoppt, bevor die Zellen zunächst auf drei weitere Schalen mit je 10 ml frischem Wachstumsmedium aufgeteilt wurden.

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff, nachdem die Zellen in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren wurden. Für die Kryokonservierung der Zellen in einer Schale mit 10 cm Durchmesser wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS abgesaugt worden war, wurde jeweils 1 ml Trypsin hinzugegeben und die Platten für 3 min in den 37 °C warmen Inkubator gestellt. Zum Abstoppen des Trypsins wurde jeweils 1 ml Endothelzellmedium hinzugegeben und die Zellen aller Platten in ein 50 ml Röhrchen mit konischem Boden gegeben. Anschließend wurden diese für 3 min bei 220 g und 37 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 1 ml FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) pro Platte resuspendiert und gemischt. Daraufhin wurden die Zellen auf die 1 ml großen Einfriergefäße aufgeteilt und die Einfriergefäße über Nacht in einem Gefrierbehälter bei -80 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Einfriergefäße mit den Zellen dann in den flüssigen Stickstoff gegeben und aufbewahrt.

2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (deutsch für *Magnetic Assisted Cell Sorting*, MACS) wurde nach der Zellisolation zur Trennung der Endothelzellen von allen anderen Zellarten genutzt, um eine hohe Reinheit der Endothelzellkultur zu erhalten. Hierbei wurde das System von Miltenyi Biotech unter Zuhilfenahme des MACS-Ständers mit

entsprechenden Separatoren, Säulen sowie dem „CD31 MicroBead Kit“ verwendet. Es wurde das vom Hersteller vorgegebene Protokoll verwendet (siehe Abbildung 6).

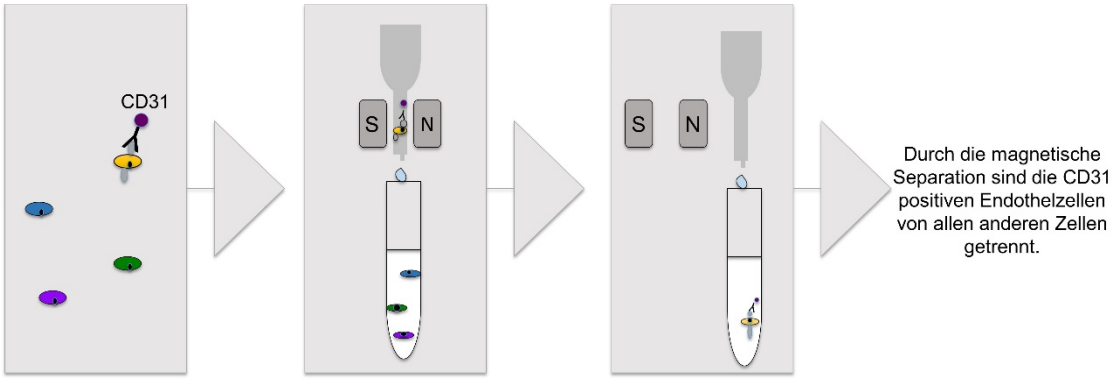


Abbildung 6: Aufbau der magnetischen Zellseparation.

Zu sehen ist der Versuchsaufbau der magnetischen Zellseparation (MACS). Zunächst wird dem isolierten, als Suspension vorliegendem Zellgemisch das Blockierungsreagenz sowie die Anti-CD31-Antikörper-beschichteten Magnetkugeln hinzugefügt. Die auf den Magnetkugeln aufgebrachten Anti-CD31-Antikörper binden an das entsprechende, zelltyp-spezifische CD31-Antigen der Endothelzellen. Daraufhin wird das Gemisch auf die Säule im Separator gegeben und die im Komplex mit den Magnetkugeln, gebundenen Endothelzellen werden durch das magnetische Feld (indiziert durch N für Nord und S für Süd) in der Säule festgehalten, während alle anderen Zellen aufgrund der Schwerkraft durch die Zwischenräume der Säule durchlaufen. Anschließend wird die Säule aus dem Separator und damit aus dem Magneten genommen und die Endothelzellen können nun mit Zellkulturmedium herausgespült werden.

Für die magnetische Zellseparation wurden die Zellen zunächst mittels Trypsinierung von der Zellkulturschale abgelöst und gezählt. Hierfür wurde zum Waschen der Zellen zunächst 5 ml PBS in die Schale mit 10 cm Durchmesser hinzugegeben und nachdem das PBS abgesaugt war, wurde 1 ml Trypsin hinzugegeben und die Platte für 3 min in den 37 °C warmen Inkubator gestellt. Zum Abstoppen des Trypsins wurde 1 ml Endothelzellmedium hinzugegeben und die Zellen in ein 15 ml Röhrchen mit konischem Boden gegeben. Daraufhin wurden sie für 10 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml Endothelzellmedium resuspendiert. Im Folgenden wurden 20 µl des Zellgemischs mit 20 µl Trypanblau gemischt und 8 µl dessen wurden auf die Zählkammer gegeben. Nach dem Auszählen aller vier Quadranten unter dem Mikroskop wurde der Mittelwert gebildet und die Zellzahl pro Milliliter mit Hilfe der Verdünnung berechnet. Da die von der Firma vorgegebenen Volumina der benötigten Reagenzien für eine maximale Zellzahl von 1 x 10^7 Zellen angegeben waren, mussten die Volumina je nach Ergebnis der Zellzählung gegebenenfalls angepasst werden. Anschließend wurden sie für 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 60 µl des Wachstumsmediums für

Endothelzellen resuspendiert. Im Anschluss wurden 20 µl des Blockierungsreagenz (deutsch für FcR Blocking Reagent) sowie 20 µl der Anti-CD31-Antikörper-beschichteten Magnetkugeln (deutsch für CD31 MicroBeads) aus dem „CD31 MicroBead Kit human“ hinzugegeben und alles vermischt. Einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C folgte die Zugabe von 1 ml Endothelzellmedium und eine 10-minütige Zentrifugation bei 300 g. In der Zwischenzeit konnten die Säulen in die Separatoren eingespannt und mit je 3 ml Endothelzellmedium gespült werden. Daraufhin wurde das herunterzentrifugierte Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und anschließend auf die vorgespülte Säule gegeben. Die ungebundenen Zellen wurden dabei mit Hilfe eines Röhrchens aufgefangen und als Negativkontrolle auf einer Schale mit 6 cm Durchmesser ausgesät. Es folgten drei Waschschritte der Säule mit jeweils 3 ml Endothelzellmedium, welches im Anschluss verworfen wurde. Danach wurden die Säulen aus den Separatoren genommen, auf ein neues Röhrchen gesetzt und jeweils mit 5 ml Endothelzellmedium gefüllt, welches mit Hilfe eines Stempels durch die Säulen in das Auffanggefäß gedrückt wurde. Die herausgespülten Endothelzellen wurden dann in einer zuvor mit Fibronektin beschichteten Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser ausgesät. Es folgte ein regelmäßiger Wechsel des Wachstumsmediums, bei dem jeden zweiten Tag das Medium abgesaugt wurde und pro Schale ca. 7 ml neues Endothelzellmedium hinzugegeben wurde sowie eine Verteilung der Zellen auf mehrere Zellschalen bei ausreichender Zelldichte im Mikroskop. Wenn sich mikroskopisch sichtbar nach der magnetischen Zellseparation noch andere Zellentitäten in der Schale befanden, wurde diese nach dem angegebenen Protokoll wiederholt, bis augenscheinlich eine hohe Reinheit der Endothelzellkultur vorlag.

2.2.3 Proteinanalytik

2.2.3.1 Proteinisolierung

Die Proteinexpressionsanalyse wurde mittels Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde das Medium der Zellschalen bei ausreichender Konfluenz abgesaugt und die Zellen auf Eis mit je 5 ml kaltem PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden pro Schale 150 µl des M-PER-Lyse-Puffers, bestehend aus einem M-PER Extraktionsreagenz und einem Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail von Thermo Fisher Scientific zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin mit einem Zellschaber von der Platte abgetragen und in ein Reagiergefäß überführt. Zur weiteren Vereinzelung der Zellen aus dem Zellverband wurde das Lysat fünfmal durch eine Nadel und Spritze aufgezogen. Daraufhin wurde das Lysat bei 4 °C unter ständigem Mischen für 1 h

inkubiert und nach dieser Zeit 20 min bei 4 °C bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Regiergefäß überführt, gemischt und in kleinen Aliquots von 12 µl bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung des Proteingehalts mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ wurden zunächst der Standard und das Arbeitsreagenz nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Daraufhin wurden entweder je 25 µl des Standards oder einer in PBS im Verhältnis 1 zu 5 verdünnten Probe (12 µl + 48 µl = 60 µl) in Duplikaten in eine Mikrotiterplatte mit 96 Kammern gegeben und jeweils 200 µl des vorbereiteten Arbeitsreagenz hinzugefügt. Das Arbeitsreagenz bestand aus den Stammlösungen A und B, welche in einem Mischungsverhältnis von 50 zu 1 angesetzt waren. Stammlösung A bestand aus 10 g/L Natriumbicinchoninat, 20 g/L Natriumcarbonat, 1,6 g/L Natriumtartrat, 4 g/L Natriumhydroxid, 9,5 g/L Natriumhydrogencarbonat und war mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 1,25 eingestellt. Stammlösung B beinhaltete 40 g/L Kupfersulfatpentahydrat. Die Platte wurde anschließend 30 min bei 37 °C unter ständigem Mischen auf einem Plattenmischer gemischt. Nach diesem Schritt konnte der Proteingehalt mittels des Spektralphotometer und der zugehörigen Software „Magellan“ bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden. Dies funktionierte mit Hilfe einer Standardkurve, die anhand der nach den Vorgaben des Herstellers in Duplikaten vorbereiteten Standards generiert wurde. Anhand dieser konnte die zum Absorptionswert proportionale Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wurde das anionische Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS) eingesetzt, welches durch seine starke Bindung an die Aminosäureketten die individuelle Eigenladung der Proteine überdeckte und damit für eine konstant negative Ladung dieser sorgte. Durch die gleichzeitige Denaturierung der Proteine besaßen diese nun alle die Eigenschaft, im elektrischen Feld gleichmäßig zum Pluspol (Anode) zu wandern, wobei nun die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel lediglich von der Molekülgröße und nicht mehr von der nun überdeckten Eigenladung abhängig war. Je kleiner das Protein, desto schneller wanderte es im Gel und konnte somit entsprechend seiner molekularen Größe [kDa, Kilodalton] im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden (siehe Abbildung 7). Das polymerisierte Gel bildete dabei gemäß den verwendeten Mengen an Acrylamid

eine Art Sieb mit einer bestimmten Porengröße, die optimal auf die zu analysierenden Proteine und deren Molekulargewicht abgestimmt war. Das Trenngel bestand aus H_2O, 30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 1.5 M TRIS (pH 8.8), 10 % Natriumlaurysulfat (SDS), 10 % Ammoniumpersulfat und Tetramethylethylendiamin (TEMED). Für diese Arbeit wurden je nach molekularer Größe der eingesetzten Antikörper 6 %ige, 8 %ige und 10 %ige Gele verwendet, welche sich in ihrer Menge des eingesetzten H_2O, Acrylamid/Bisacrylamid und Tetrametylethylendiamin (TEMED) unterschieden. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Platten gegossen und abgewartet, bis dieses auspolymerisiert war. Daraufhin wurde das Kammergel, welches aus H_2O, 30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 1.0 M TRIS (pH 6.8), 10 % Natriumlaurysulfat (SDS), 10 % Ammoniumpersulfat und Tetramethylethylendiamin (TEMED) bestand, angesetzt und mit einem Kamm auf das bereits fest gewordene Trenngel gegeben. Daraufhin folgte eine Wartezeit bis zur Polymerisation dessen. Nachdem der Kamm entfernt wurde, konnten die Proteinlysate aufgetragen werden (Abbildung 7.1).

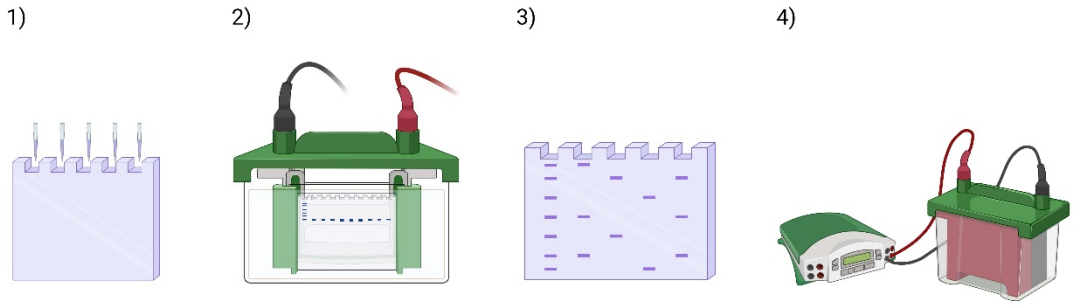


Abbildung 7: Western-Blot-Verfahren.

Zu sehen ist die Funktionsweise des Western-Blot-Verfahrens. 1) Zunächst werden jeweils 30 µl der vorbereiteten Proben und 10 µl des Proteingrößenstandards auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragen. 2) Daraufhin findet die Gelelektrophorese mit einer angelegten Spannung von 60 Volt für 15 min und anschließend 100 Volt für weitere zwei Stunden statt. 3) Die Proteine sind nach Ablauf gemäß ihrer Größe im Gel dank des elektrischen Feldes unterschiedlich weit gewandert. 4) Im letzten Schritt findet der Transfer auf die Nitrozellulosetransfermembran bei einer angelegten Spannung von 100 Volt für 1,5 h statt. Diese Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.

Für die Auftragung der Proteinlysate wurden jeweils 40 µg der Probe mit 7,5 µl des 4-fach konzentrierten Protein-Gelladepuffer und PBS in einem Gesamtvolumen von 30 µl versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss daran wurden pro Spur entweder je 30 µl des Proteinlysats oder 10 µl des Proteingrößenstandards aufgetragen und die Gelelektrophorese mit der Apparatur von Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Dazu wurde die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und eine elektrische Spannung angelegt,

wobei hier 60 Volt für die ersten 15 min und 100 Volt für weitere 2 h (oder bis zur optimalen Auftrennung) gewählt wurden (Abbildung 7.2). Der verwendete Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS. An die Elektrophorese schloss sich der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran an (Abbildung 7.4). Dafür wurde die Apparatur und der Stapel aus Filterpapieren, Gel und Membran nach Vorgaben des Herstellers arrangiert und ein Transferpuffer bestehend aus 20 % Methanol, 25 mM Tris-(Base), 192 mM Glycin und 10 % SDS hinzugegeben. Unter Kühlung wurde der Nasstransfer für 1,5 h bei 100 Volt durchgeführt.

2.2.3.4 Proteinnachweis durch Immunoblot

Im Anschluss an den beschriebenen Transfer der Proteine aus dem SDS-Acrylamid-Gel auf die Nitrozellulose-Membran fand das Blocken der unbesetzten Proteinbindungsstellen mit 5 %igem Magermilchpulver (angesetzt in TBS mit 0,05 % Tween) schwenkend für 1 h statt. Über Nacht wurde die Membran mit dem in 5 %iger Magermilchpulverlösung gelösten Primärantikörper bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal für 5 min mit einer Tris-Base-gepufferten Salzlösung (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) gewaschen, bevor der HRP (Horseradish Peroxidase) -gekoppelte Zweitantikörper (ebenfalls in 5 %iger Magermilchpulverlösung) zugegeben wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Rollenmischer bei Raumtemperatur und fünfmalig ein fünfminütiger Waschvorgang mit der Tris-Base-gepufferten Salzlösung. Die Detektion der entsprechenden HRP-vermittelten Signalstärke wurde hierbei durch die Freisetzung von Photonen ermöglicht, wobei zum Entwickeln je nach Stärke des zu erwartenden Signals entweder das „Immobilon Forte Western HRP Substrat“ von Millipore oder das „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ von Thermo Fisher Scientific eingesetzt wurde. Gemessen wurde die Chemilumineszenz, d.h. die freiwerdende Lichtemission durch die Peroxidase-Reaktion, mittels des Western Blot Kamerasystem „ECL Chemostar“ und der zugehörigen Software „ChemoStar Imager Software“ von Intas Science Imaging Instruments. Die Auswertung der Bilder folgte durch einen einfach optischen Vergleich ohne genauere Quantifizierung, da die Methode als reiner Nachweis beziehungsweise Bestätigung der Zellidentität der Endothelzellen herangezogen wurde.

2.2.4 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA wurde das Medium der Zellschalen analog zur Proteinisolation auf Eis abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Schale 600 µl des Lyse Puffers „QIAazol Lysis Reagent“ aus dem „miRNeasy Mini Kit“ von Qiagen zugegeben. Hierbei handelt es sich um ein Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Gemisch, welches auf dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode zur RNA-Isolation beruht. Die auf Eis gekühlten Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Platte abgetragen und in ein Reagiergefäß überführt. Zur weiteren Zellvereinzelung und Homogenisierung inklusive der Fragmentierung der DNA wurde das Lysat fünfmal durch eine Nadel und Spritze aufgezogen. Daraufhin wurden die Lysate bei -80 °C eingefroren und stehen nun für eine sich an diese Arbeit anschließende RNA-Sequenzierung zur Verfügung.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine immunhistochemische Analysemethode, bei der Antigene mittels Antikörper, an die ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, sichtbar gemacht werden. Nachdem je 50.000 Zellen einzelner Endothelzelllinien in die 8 Kammern der „Falcon Culture Slides“ ausgesät worden waren, wurden diese bei ausreichender Zelldichte zweimal mit je 300 µl Waschpuffer bestehend aus 1x PBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen. Für die Fixierung wurden sie für 10 min in 300 µl der 4 %igen Formaldehyd-Lösung inkubiert und dreimal mit je 300 µl eiskaltem Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden sie für 10 min in PBS mit 0,2 % Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert und danach wiederum dreimal mit je 300 µl Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit einem Puffer bestehend aus 1 % BSA, 22,52 mg/mL Glycin, PBS und 0,15 % Tween-20 für 60 min geblockt und daraufhin die Primärantikörper gelöst in 1 % BSA in PBS mit 0,1 % Tween-20 zugegeben, um anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert zu werden. Es folgte ein erneuter Waschschritt, bei dem die Zellen dreimal für je 5 min mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen wurden, bevor der fluoreszenz-markierte Zweitantikörper, gelöst in 1 % BSA in PBS, für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln zugegeben wurde. Nach einem erneuten Waschschritt (einmal 5 min je 300 µl pro Kammer) wurden pro Kammer 100 µl einer Lösung, bestehend aus 0,1 % Dapi in PBS für 10 min hinzugefügt. Nach wiederholtem Waschen (zweimal 5 min je 300 µl pro Kammer) konnte der Objektträger abgelöst werden. Das Präparat wurde nun nach Auflegen durch ein Deckgläschen mittels eines

Befestigungsmittels verschlossen. Nach der Trocknungsphase (6 Stunden oder über Nacht) wurde die Fluoreszenz mit dem Mikroskop „Primovert“ von Carl Zeiss sichtbar gemacht und die Bilder mit der zugehörigen Software „ZEN 2011“ dokumentiert. Auch hier erfolgte die Auswertung durch optischen Vergleich ohne nähere Quantifizierung, da diese Methode nur zur Sicherung der Endothelzellidentität, d.h. einer qualitativen Analyse, diente.

2.2.6 Messung der Proliferation

Zur Proliferationsmessung wurde der „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colormetric)“ von Roche genutzt und mit leichten Abwandlungen dem Protokoll des Herstellers angewandt. Es handelt sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay). An Tag eins wurden jeweils 5.000 Zellen in 100 µl Wachstumsmedium pro Kavität einer 96-Kammer Mikrotiterplatte pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zwei Mal mit je 100 µl PBS gewaschen und daraufhin 100 µl Hungermedium (HM) pro Kavität zugegeben. Das Hungermedium besteht aus Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Am Tag darauf (d.h. 24 h später) folgte die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konditionen und Inhibitoren (siehe Abbildung 8).

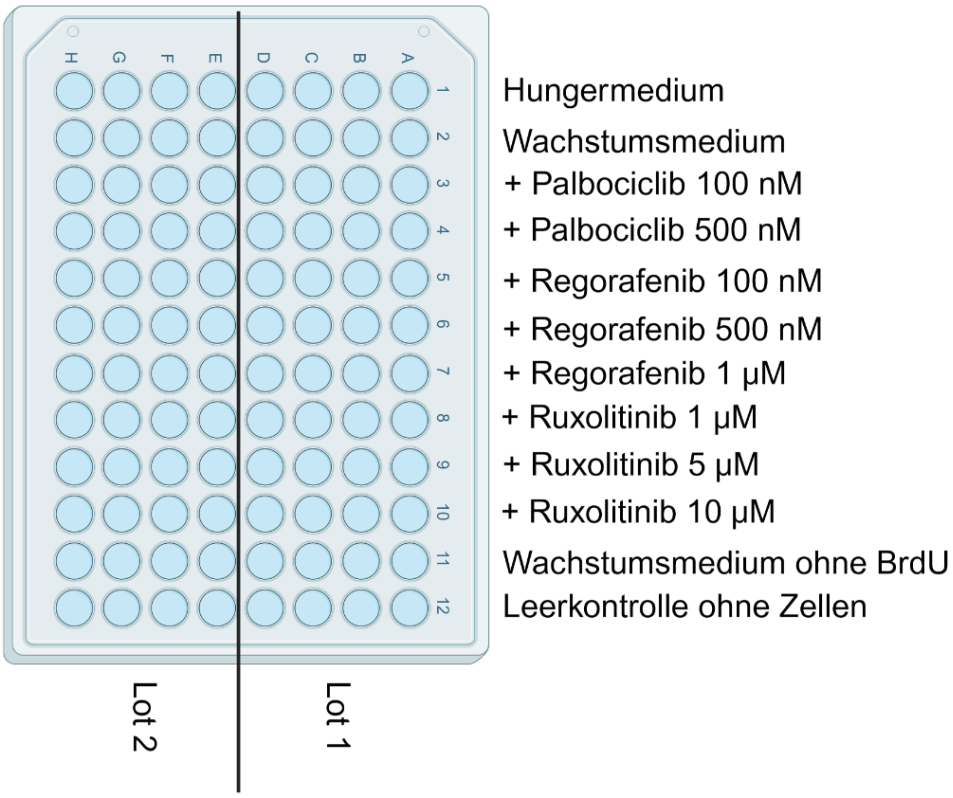


Abbildung 8: Konditionen des Proliferationstests.

Zu sehen sind die verschiedenen Konditionen des Proliferationstests und wie sie auf der Mikrotiterplatte mit 96 Kammern verteilt sind. Als Konditionen wurden ausgewählt: Hungermedium, Wachstumsmedium (ohne Inhibitoren), Wachstumsmedium + Palbociclib 100 nM, Wachstumsmedium + Palbociclib 500 nM, Wachstumsmedium + Regorafenib 100 nM, Wachstumsmedium + Regorafenib 500 nM, Wachstumsmedium + Regorafenib 1 µM, Wachstumsmedium + Ruxolitinib 1 µM, Wachstumsmedium + Ruxolitinib 5 µM, Wachstumsmedium + Ruxolitinib 10 µM, Wachstumsmedium ohne BrdU und die Leerkontrolle ohne Zellen (Blank). Die Konditionen wurden jeweils in Quadruplikaten gemessen, was das Auftragen von Endothelzellen von zwei verschiedenen Patienten auf einer Platte ermöglichte. Diese Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.

Das Hinzufügen der BrdU-Lösung zur Markierung der neu entstandenen DNA erfolgte für die verbleibenden letzten 16 h der jeweiligen Inkubationszeit, d.h. 24 h oder 48 h. Dabei wird das Thymidanalogon BrdU (5-bromo-2´-desoxyuridin) während der DNA-Synthese bei der Replikation in die DNA eingebaut. Zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach der gewählten Behandlung wurde das Medium entfernt, die Zellen 40 min bei Raumtemperatur fixiert und mit einem Zweitantikörper, der wiederum Enzym-gekoppelt ist, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte das fünfmalige Waschen mit je 300 µl PBS pro Kammer und das Hinzufügen von je 100 µl Substratlösung pro Kammer, bevor die kolorimetrische Messung der in die DNA eingebauten BrdU-Menge

(je nach Intensität) nach 15 bis 30 min erfolgte. Die Messungen wurden mittels des Mikrotiterplatten-Lesegeräts „Infinite 200 PRO“ mit der Software „iControl“ bei einer Wellenlänge von 370 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm durchgeführt. Für die Auswertung der Daten wurde zunächst der Mittelwert der Leerkontrollen ohne Zellen („Blank“) von den einzelnen bestimmten Messwerten abgezogen, um einen eventuellen Signal-Hintergrund durch das Plastikmaterial und seine unspezifische Bindung von Komplexen aus BrdU und anti-BrdU-Antikörpern herauszurechnen. Daraufhin wurden die somit erhaltenen einzelnen Werte durch den Mittelwert der Referenzkondition, d.h. Wachstumsmedium (ohne Inhibitor) geteilt. Durch diese mathematische Normalisierung erhielt die Referenzkondition einen Wert von 1, wodurch zum einen eine erleichtere Darstellung der anderen Konditionen ermöglicht wurde. Zum anderen konnten hierdurch aber auch die unabhängig voneinander durchgeführten Testdurchläufe optimal verglichen werden. Die weiterführende statistische Auswertung ist im Abschnitt Statistik zu finden.

2.2.7 Messung der Angiogenese

Für den Angiogenesetest wurden die Multititerplatten mit 15 Kammern „µ-Slide Angiogenesis“ von ibidi eingesetzt (siehe Abbildung 9) und das Protokoll des Herstellers mit leichten Optimierungen umgesetzt.

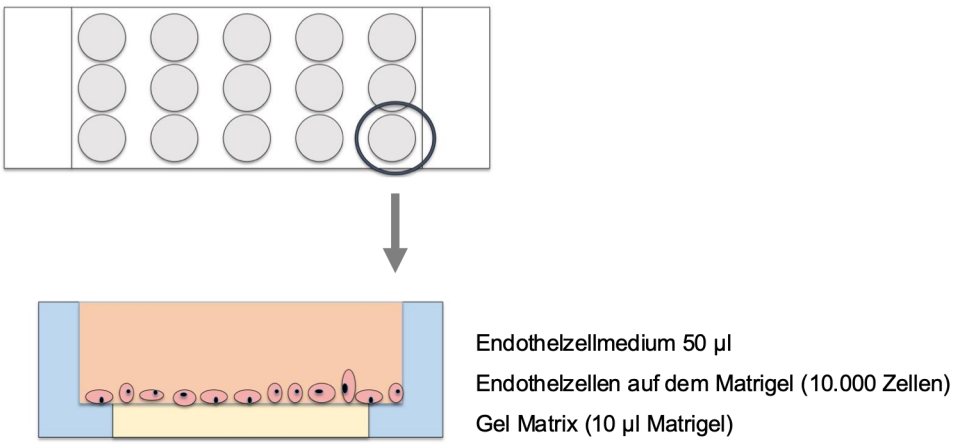


Abbildung 9: Aufbau einer Kammer im Angiogenesetest.

Eine Kammer im Angiogenesetest beinhaltet als unterste Schicht eine Gel Matrix bestehend aus 10 µl Matrigel, auf die die Endothelzellen aufgetragen werden. Die Kammer wird anschließend mit 50 µl Endothelzellmedium mit den verschiedenen Konditionen (siehe unten) aufgefüllt.

Zur Vorbereitung wurde das Matrigel von Corning über Nacht auf Eis aufgetaut und mit tiefgekühlten Pipettenspitzen je 10 µl pro Kammer pipettiert. Dies wurde anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen gezählt und vorbereitet, sodass jeweils 10.000 Zellen in je 50 µl Medium in sieben verschiedenen Konditionen vorhanden waren:

Kondition 1: Hungermedium (Basalmedium mit 0,5% FCS und 1% Pen/Strep)
Kondition 2: Wachstumsmedium (ohne Inhibitoren)
Kondition 3: Wachstumsmedium + Palbociclib 100 nM
Kondition 4: Wachstumsmedium + Palbociclib 500 nM
Kondition 5: Wachstumsmedium + Regorafenib 1 µM
Kondition 6: Wachstumsmedium + Ruxolitinib 5 µM
Kondition 7: Wachstumsmedium + Ruxolitinib 10 µM

Da die Arbeit auf Deutsch verfasst ist, einige Begriffe allerdings vornehmlich auf Englisch verwendet wurden, ist die Übersetzung folgendermaßen erfolgt: „Tube“ wird in dieser Arbeit im Folgenden als Rohr bezeichnet und „Loop“ wird als Schleife betitelt. Die Zellsuspensionen wurden auf das Matrigel aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Nach je 6 h, 12 h und 24 h wurden mit dem Mikroskop „Eclipse TS 100“ von Nikon Bilder gemacht und die Bilder des 12 h Zeitpunkts wurden durch die „FastTrack AI“ Software von MetaVi Labs hinsichtlich der Parameter Anzahl der Schleifen, durchschnittliche Schleifenfläche [μm^2], durchschnittliche Rohrlänge [µm], Gesamtlänge des Rohrs [µm] und Anzahl der Verzweigungen ausgewertet. Die statistische Auswertung ist im Abschnitt Statistik dargelegt.

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte sowohl für den Proliferationstest als auch für den Angiogenesetest mit der Software „GraphPad Prism 8“ des Herstellers Graphpad Software.

2.2.8.1 Proliferationstest

Für die Auswertung des Proliferationstests wurden die Daten zunächst wie im Abschnitt 2.2.6 bereits beschrieben nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Daraufhin wurden die Einzel-Daten (n = 8) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen, die jeweils in Quadruplikaten gemessen wurden, als Mittelwert ±SEM (Standardfehler) dargestellt. Zur

statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ stellen die konzentrationsabhängigen Signifikanzen innerhalb eines Inhibitors dar (siehe Abbildung 20).

2.2.8.2 Angiogenesetest

Für die Auswertung des Angiogenesetests wurden die Daten ($n = 2$) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet (siehe Abbildung 23).

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Im ersten Abschnitt soll das Protokoll für die Isolation der pulmonal-arteriellen Endothelzellen dargestellt und erläutert werden.
2. Im zweiten Abschnitt soll gezeigt werden, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Endothelzellen handelt.
3. Der dritte Abschnitt dient der funktionellen Charakterisierung der isolierten Endothelzellen.

3.2 Etablierung des Protokolls für die Isolation von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen

3.2.1 Hintergrund

Wie bereits erwähnt, spielen Endothelzellen eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese und im Verlauf von verschiedensten Lungenerkrankungen. Dadurch ist es umso wichtiger, diese Zellen auch aus humanen Lungen isolieren und charakterisieren zu können, um grundlegende Mechanismen im Rahmen der Krankheitsentstehung und ihrem -verlauf zu studieren und gegebenenfalls neue Therapien im Zusammenhang mit „entarteten“ Endothelzellen zu entwickeln.

3.2.2 Darstellung des Protokolls für die Isolation von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen

Die Isolation der Zellen erfolgt nach einer Lungenexplantation im Rahmen von Operationen an verschiedenen Standorten in Europa, meist jedoch aus Wien, Hannover, Bad Nauheim oder Gießen. Das Team der Gießener UGLMC/DZL Biobank erhält einen Anruf über die Möglichkeit, einen Teil der Lunge zu Forschungszwecken nutzen zu können. Anschließend daran wird dies an die verschiedenen Mitarbeiter der einzelnen

Abteilungen kommuniziert. Die folgende Skizze fasst das den zeitlichen Ablauf und das Vorgehen zusammen.

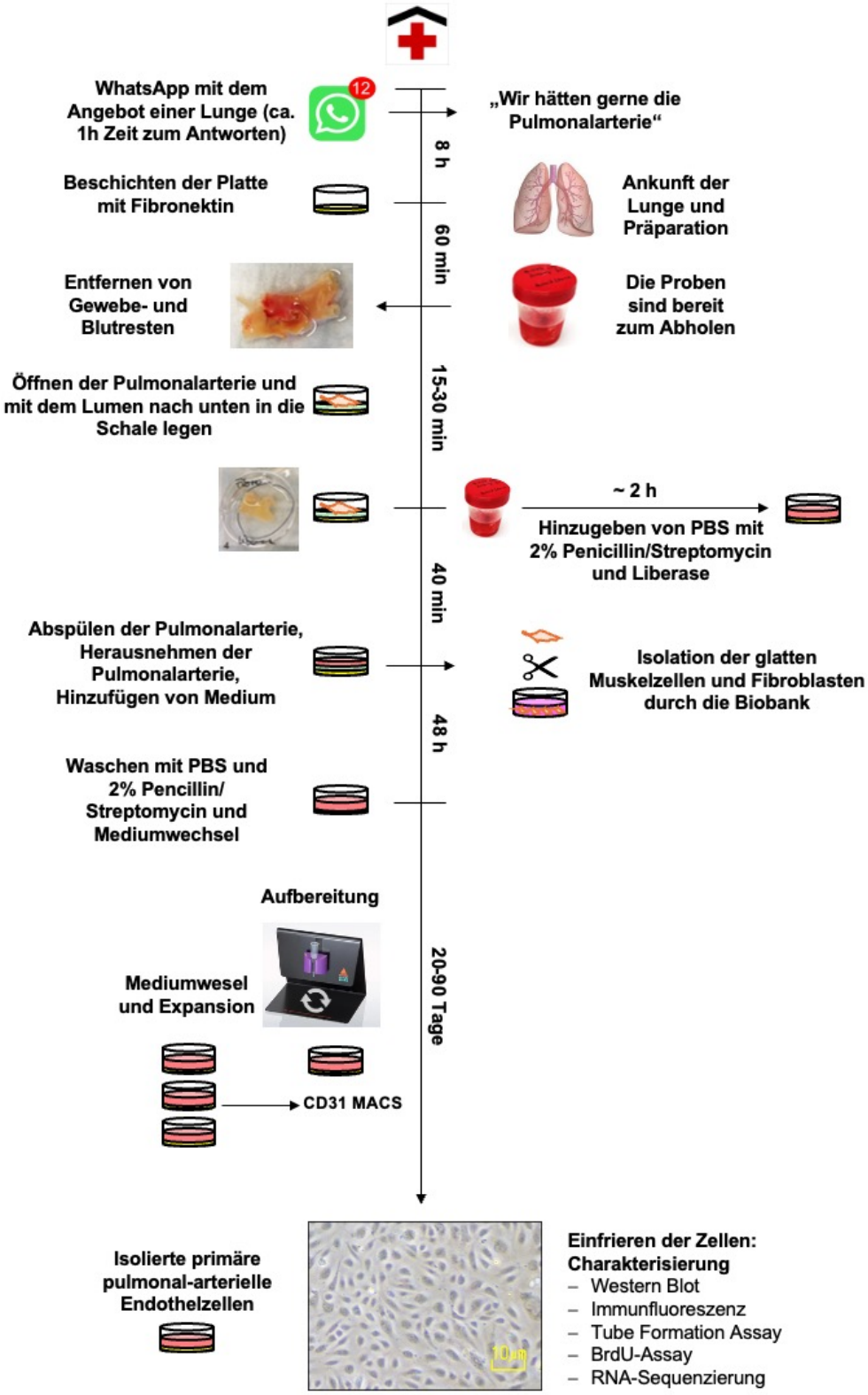


Abbildung 10: Schema der Endothelzellisolation.

Zeitstrahl von oben nach unten. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte befindet sich im Text.

Nach der Nachricht, dass eine Lunge meist am Folgetag verfügbar sei, beträgt die Zeit, mit Angabe der Wunschregionen der Lunge zu antworten, ca. 1 h. Die Platten werden ca. 45 min vor der Zellisolation mit 2 mg/cm^2 Fibronektin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix, beschichtet. Auch Gelatine wurde für die Beschichtung bei der Zellisolation getestet, allerdings kam es hierbei nicht zu einem adäquaten Anwachsen der Zellen, wodurch das Fibronektin als geeigneter erschien (Daten nicht gezeigt). Je nach Größe des Stücks der Pulmonalarterie wird der Durchmesser der Platte gewählt. In den meisten Fällen erwies sich eine Platte mit 6 cm Ø als optimal. Nach Eintreffen und Präparation der Lunge, wird das Stück Pulmonalarterie übergeben (siehe Abbildung 11) und zunächst alle Blut- und Gewebereste entfernt, bevor die Pulmonalarterie aufgeschnitten und lumenseitig auf die mit Fibronektin beschichtete Platte gelegt wird.

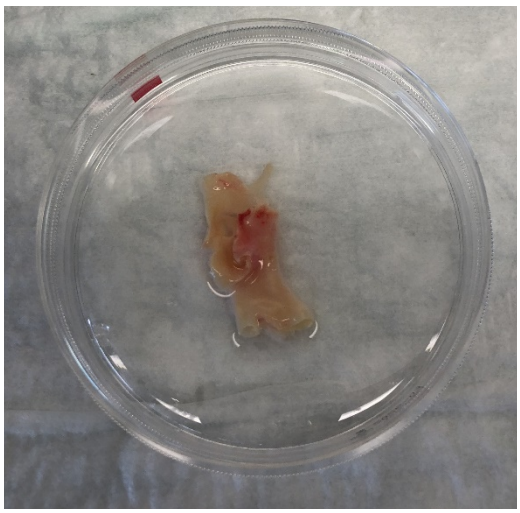


Abbildung 11: Pulmonalarterie.

Ein Stück Pulmonalarterie in einer Zellkulturschale. Im Anschluss werden die Gewebereste außen entfernt und die Arterie wird zu Endothelzellisolation aufgeschnitten.

Anschließend wird so viel PBS mit 2 % Penicillin/Streptomycin zugegeben, wie benötigt wird, damit die Pulmonalarterie vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist. Im nächsten Schritt wird 1/50 Liberase, ein Gemisch aus den Enzymen Kollagenase I, Kollagenase II und Thermolysin, hinzugefügt und die Platte kommt für 40 min auf einen Wippschüttler im 37 °C warmen Inkubator. Auch andere Enzyme wie Dispase, eine Kollagenase und

Dispase-Mischung wurden ausprobiert, wobei sich die Liberase durch ihre bessere Wirksamkeit allerdings durchgesetzt hat (Daten nicht gezeigt). Nach 40 min wird die Platte aus dem Inkubator genommen und das Lumen der Arterie wird mit der sich auf der Platte befindlichen Flüssigkeit abgespült, bevor sie entnommen wird. Hieraus können im Anschluss sowohl glatte Muskelzellen als auch Fibroblasten isoliert werden, dies bedeutet, dass drei verschiedene Zelltypen aus einem Stück Pulmonalarterie gewonnen werden können. Die Schale mit den von der Pulmonalarterie abgelösten Zellen wird mit 10 ml Endothelzellmedium aufgefüllt und anschließend für weitere 48 h im 37 °C warmen Inkubator gelagert. Nach ca. 48 h wird die Platte mit 5 ml PBS mit 2 % Penicillin/Streptomycin gewaschen und neues Endothelzellmedium hinzugefügt.

Es folgen Mediumwechsel an jedem zweiten Tag, bis einige Zellen angewachsen sind und die magnetische Zellseparation durchgeführt werden kann. Die Entscheidung darüber, wann diese nötig ist, wird nach dem Aussehen und der Menge der angewachsenen Zellen getroffen.

Die magnetische Zellseparation ist erforderlich, da es sich bei den isolierten Zellen nicht nur um Endothelzellen handelt, sondern auch andere Zelltypen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen darin vertreten sind, die durch die Liberase ebenfalls abgelöst wurden und auf der mit Fibronektin-beschichteten Oberfläche der Zellkulturschale anwachsen. Bei der magnetischen Separation können die Endothelzellen durch an Mikromagnetperlen gebundene CD31 Antikörper, wie bereits beschrieben, effizient von allen anderen Zellen, die diesen Endothelzell-spezifischen Oberflächenmarker nicht exprimieren, getrennt werden. Gegebenenfalls muss dieser Schritt im Verlauf der Zeit nochmals wiederholt werden, wenn die Population noch aus Zellen besteht, die den Selektionsmarker CD31 nicht auf ihrer Oberfläche präsentieren und damit keine Endothelzellen darstellen. Die Entscheidung darüber wird durch eine mikroskopische Beurteilung vorgenommen, wobei die Endothelzellen in der Regel optisch leicht von den anderen Zelltypen zu unterscheiden sind (siehe Abbildung 12).

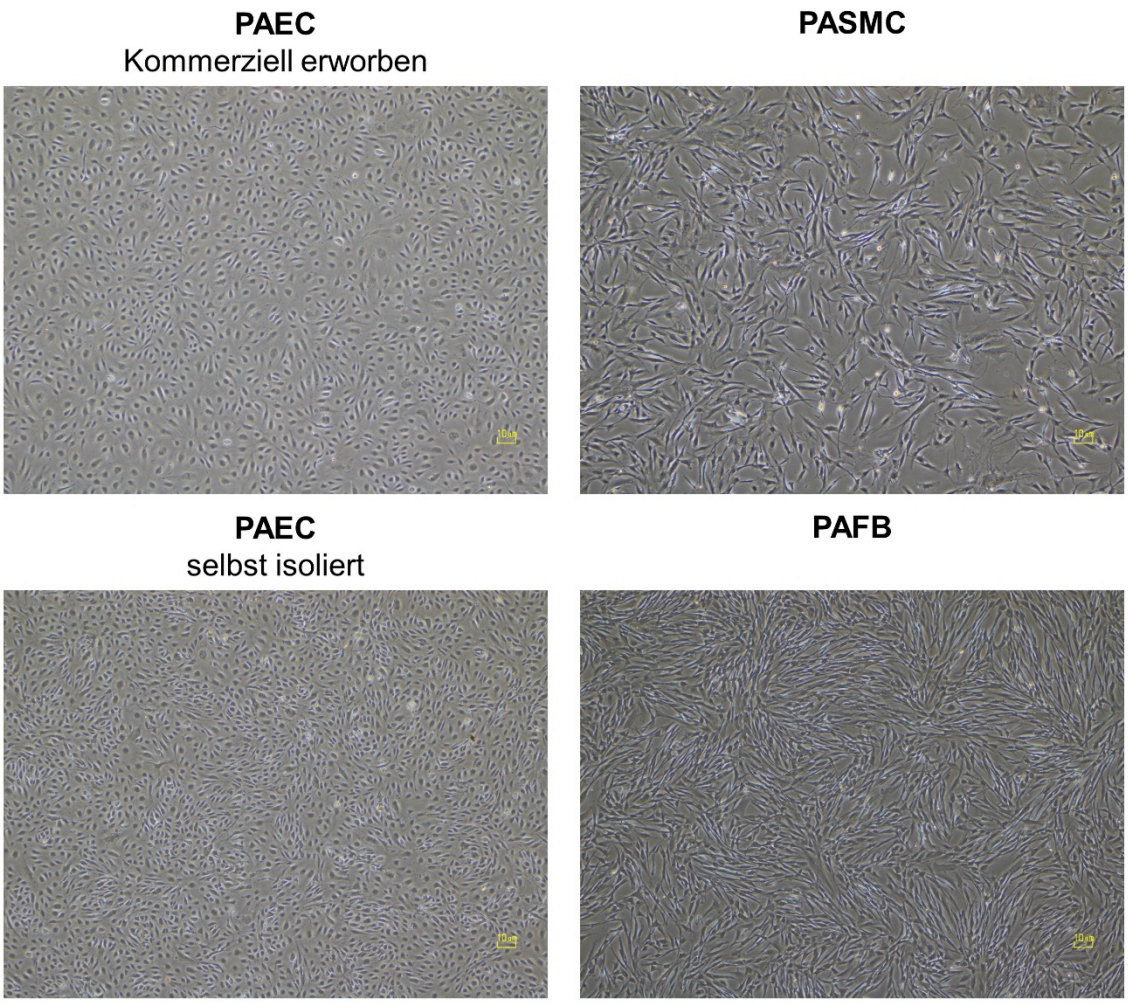


Abbildung 12: Vergleich zwischen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten.

Die Abbildung zeigt den optischen Vergleich zwischen den verschiedenen Zelltypen. Inbegriffen sind gesunde Endothelzellen von der Firma Promocell mit der Lot 458Z016.15, selbst isolierte PAEC mit der Lot #1039 (Emphysem), glatte Muskelzellen mit COPD und Fibrose der Gießener UGMLC/DZL Biobank mit der Lot 857/2 SMC und Fibroblasten mit COPD und Fibrose mit der Lot 857/1 ADV. Eindeutig ist, dass sich die verschiedenen Zelltypen hinsichtlich ihrer Morphologie deutlich unterscheiden. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Wenn es sich bei den vorhandenen Zellen nur noch um Endothelzellen handelt, können diese auf die gewünschte Anzahl von Platten expandiert und daraufhin eingefroren und damit zur späteren Verwendung kryokonserviert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl von sechs Schalen mit je 10 cm Ø als geeignet erscheint.

In Abbildung 13 ist der experimentelle Aufbau für die sich dem Auftauen anschließenden Versuche mit den Endothelzellen zu sehen:

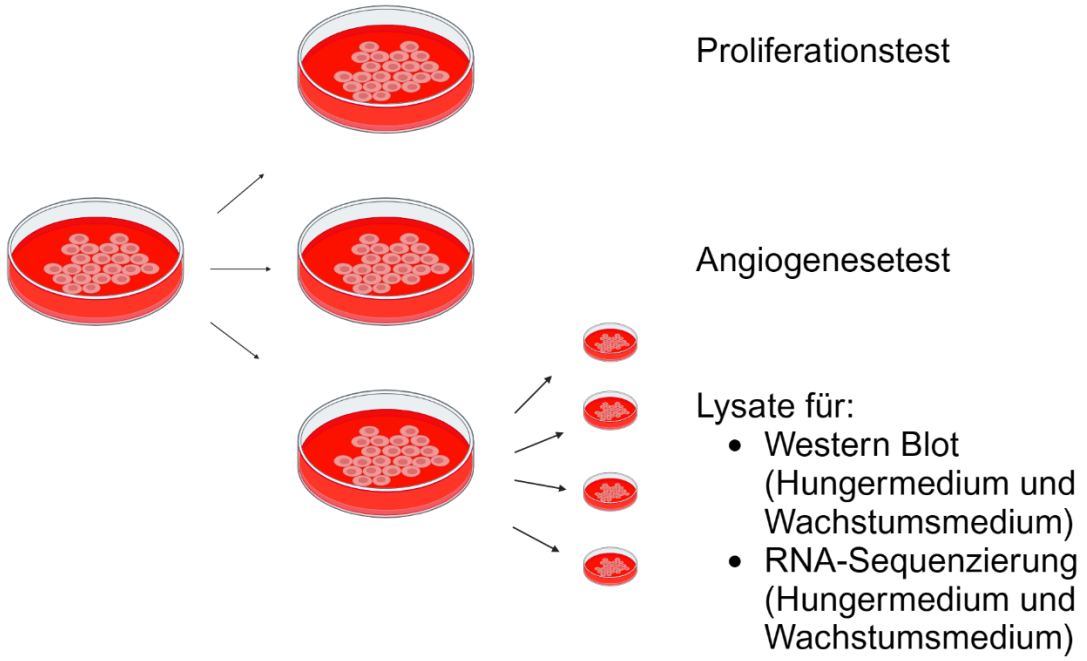


Abbildung 13: Experimenteller Aufbau.

Eine aufgetaute Ampulle wird auf eine Platte mit Wachstumsmedium ausgesät. Bei ausreichender Dichte der Zellen werde sie auf drei Platten aufgeteilt, wobei ein Platte für den Proliferationstest, eine Platte für den Angiogenesetest und eine Platte für die Herstellung von Lysaten für Western Blot Analysen und RNA-Sequenzierungen genutzt wird. Die Platte für diese Lysate wird wiederum auf vier Platten aufgeteilt und jeweils zwei der Platten werden mit Hungermedium und die anderen beiden mit Wachstumsmedium behandelt. Diese werden dann für die Proteinisolation und RNA-Isolation genutzt. Diese Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.

Mit den Zellen der ersten Schale wird dann der Proliferations-Test durchgeführt, mit den Zellen der zweiten Schale wird der Angiogenesetest durchgeführt und die dritte Schale wird nochmals auf vier Schalen verteilt. Aus diesen vier Schalen werden dann M-PER- und QIAazol-Lysate jeweils mit der Kondition Hungermedium und Wachstumsmedium für den Western Blot und eine sich an der vorliegenden Arbeit anschließende RNA-Sequenzierung hergestellt. Die glatten Muskelzellen und Fibroblasten werden in erster Linie als Negativkontrolle beziehungsweise als Vergleich zu den Endothelzellen im Western Blot (siehe Abbildung 18) und der Immunfluoreszenz genutzt (siehe Abbildung 19).

Abbildung 14 zeigt die isolierten Endothelzellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen, während Abbildung 12 die Endothelzellen optisch mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten vergleicht. Das Einfrieren der Zellen in FCS + 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff hat den Vorteil, dass sich die Zellen alle in der gleichen

Passage befinden, die Charakterisierung zu jedem beliebigen Zeitpunkt möglich ist und die Endothelzellen von verschiedenen Patienten vergleichend charakterisiert werden können.

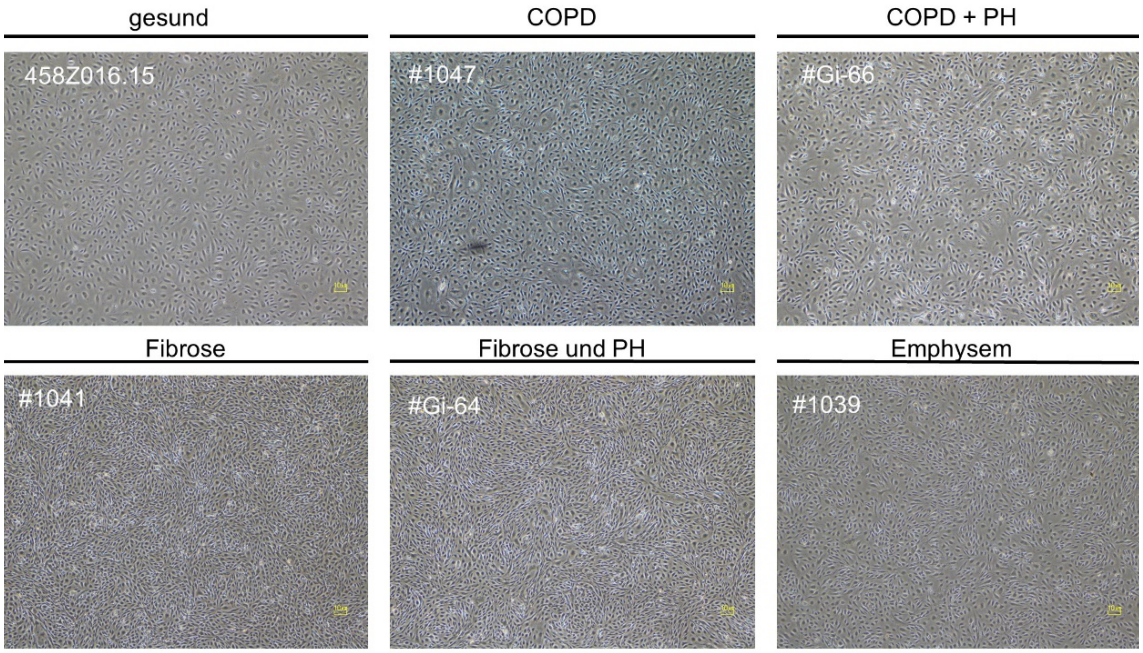


Abbildung 14: Isolierte Endothelzellen.

Zu sehen ist eine Auswahl an Bildern der isolierten Endothelzellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen. Der angegebene Maßstab beträgt 10 µm. Es handelt sich um die erfolgreich isolierten und später auch charakterisierten Endothelzellen von Patienten mit Lungenerkrankungen. Die Abbildungen aller isolierten Endothelzellen sind im Anhang zu finden.

3.2.3 Zellisolationen und Diagnosen

Die nachfolgenden Graphen (Abbildung 15) fassen die Informationen bezüglich der Anzahl an Zellisolationen, die verschiedenen Diagnosen der Patienten und auch die Geschlechterverteilung zusammen.

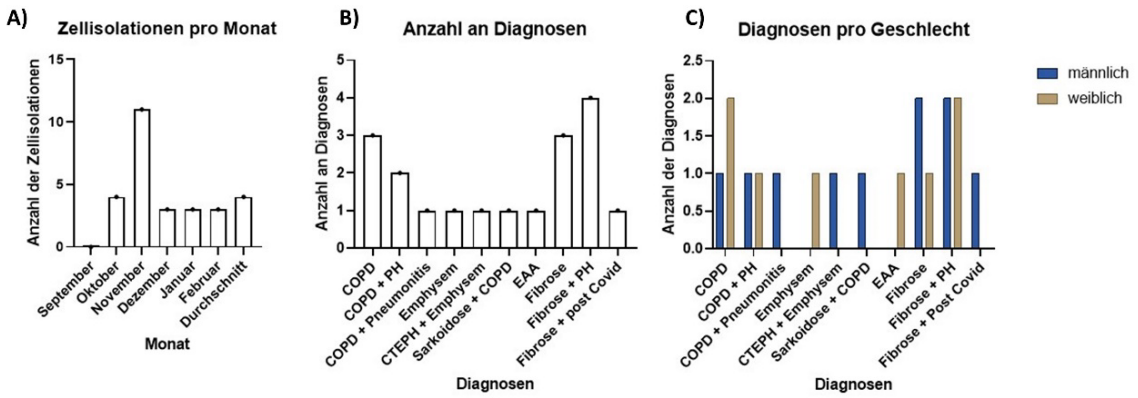


Abbildung 15: Zellisolation und Diagnosen.

Graph A zeigt die Zellisolationen pro Monat im Zeitraum von September 2022 bis Februar 2023 und den sich daraus ergebenden Durchschnitt. In Graph B ist die Anzahl an Lungen, bezogen auf die verschiedenen Lungenerkrankungen, weswegen die Lungen explantiert wurden, im Zeitraum von September 2022 bis Februar 2023 angegeben, während in Graph C die Diagnosen pro Geschlecht im Zeitraum von September 2022 bis Februar 2023 dargestellt sind.

Wie in Abbildung 15 A zu sehen, ist die Anzahl der Zellisolationen pro Monat sehr variabel. Im Monat September beispielsweise stand keine Lunge zur Zellisolation zur Verfügung, während im November elf verschiedene Lungen vorhanden waren und damit auch entsprechende Endothelzellisolationen stattfinden konnten. Der Durchschnitt pro Monat liegt bei vier Lungen. Abbildung 15 B zeigt die Anzahl der Diagnosen im Zeitraum von September bis Februar. Im genannten Zeitraum wurden Endothelzellen von Patienten mit folgenden Diagnosen isoliert: Lungenfibrose, Lungenfibrose mit sekundärer pulmonaler Hypertonie, Lungenfibrose mit begleitendem Zustand nach Covid-19, COPD, COPD mit sekundärer PH, COPD mit Pneumonie, Sarkoidose und COPD, Emphysem, CTEPH mit Emphysem und die exogen allergische Alveolitis (EAA). Es wird deutlich, dass in diesem Zeitraum insbesondere die Lungenfibrose beziehungsweise die Lungenfibrose mit sekundärer pulmonaler Hypertonie sowie COPD und COPD mit begleitender sekundärer pulmonaler Hypertonie gehäuft auftraten, wohingegen Erkrankungen wie beispielsweise Sarkoidose und COPD oder die EAA seltener auftraten. In Abbildung 15 C sind die Diagnosen auf das Geschlecht bezogen dargestellt. Beispielsweise wurden mehr Endothelzellen von COPD-Patientinnen isoliert, während bezogen auf die Lungenfibrose mehr Zellisolationen von männlichen Patienten durchgeführt wurden.

3.2.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Anzahl der Tage von der Zellisolation bis zum Einfrieren der Zellen ist sehr variabel. Der Zeitraum, der benötigt wurde, um eine Endothelzellkultur ohne Kontamination durch andere Zelltypen zu erhalten und den Inhalt sechs konfluenter Schalen mit 10 cm ø im Anschluss einzufrieren, variierte zwischen 19 Tagen und 120 Tagen. Dies ist auch in Abbildung 16 zu sehen, in welcher die Tage bis zum Einfrieren bezogen auf die Erkrankung und auf den Herkunftsort der Lunge abgebildet sind.

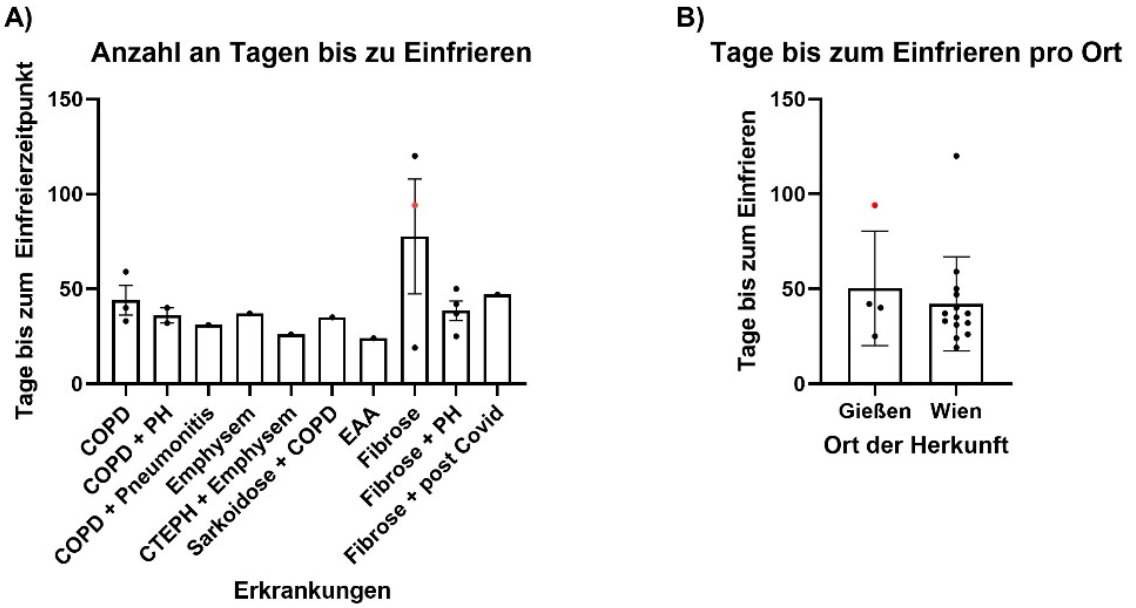


Abbildung 16: Kryokonservierung der Zellen.

Der Graph A zeigt die Anzahl der Tage bis zum Einfrieren bezogen auf die Diagnosen, während im Graph B die Tage bis zum Einfrieren pro Ort dargestellt sind. Die roten Punkte markieren die Lungen, welche bis zur Zellisolation eine Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Die Dauer bis zum Einfrieren (Abbildung 16 A) kann von verschiedenen Faktoren abhängen, wie zum Beispiel von der Diagnose der Patienten, von den Operateuren, von den Präparierenden sowie der Zeit zwischen Präparation der Arterie und Start der Zellisolation. Die Herkunft der Lunge und damit auch der Weg, den die Lunge als Ganzes zurücklegt, scheint wie in Abbildung 16 B dargestellt, keinen Einfluss auf die Anzahl der Tage zu haben, die benötigt werden, bis die Endothelzellen kryokonserviert werden können.

3.2.5 Magnetische Zell-Separation

Die Magnetische Zellseparation (MACS) ist, wie bereits dargestellt, ein Verfahren, um verschiedene Zelltypen aufgrund eines bestimmten Merkmals (z.B. der Expression eines bestimmten Oberflächenproteins) voneinander zu trennen. In Abbildung 17 A ist beschrieben, wie viele Durchgänge bezogen auf den Ort benötigt werden, um eine reine Endothelzellkultur zu erhalten.

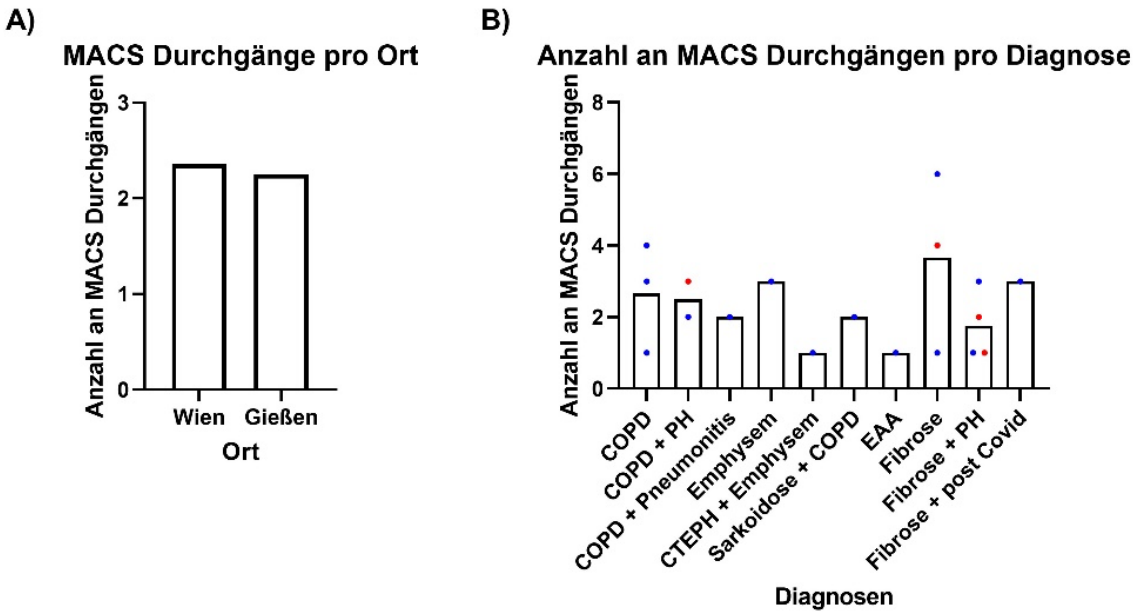


Abbildung 17: Magnetische Zellseparation.

Graph A zeigt die Durchgänge der magnetischen Zellseparation pro Ort, während in Graph B die Anzahlen der magnetischen Zelleseparationen pro Diagnose dargestellt sind. Die Lungen aus Wien sind hierbei in blau gekennzeichnet, während die Lungen aus Gießen rot markiert sind.

Es wird ersichtlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der benötigten Anzahl an MACS-Wiederholungen und den beiden Orten, an denen die Lungen explantiert wurden, besteht (Abbildung 17 A). Abbildung 17 B zeigt im Gegensatz dazu die auf die Erkrankung bezogene Anzahl an Separationsdurchgängen. Die Spanne zwischen den einzelnen Lungen reicht von einem bis hin zu sechs benötigen Separationsdurchgängen.

3.3 Endothelzellnachweise

3.3.1 Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung

Durch einen verhältnismäßig kurzweiligen enzymatischen Verdau der Innenseite der Pulmonalarterie wurde versucht, gezielt die empfindliche Zellschicht von Endothelzellen vom Gewebeverband schonend abzulösen und die „Kontamination" mit anderen Zelltypen wie den darunterliegenden glatten Muskelzellen und anschließenden Fibroblasten der Adventitia zu vermeiden. Des Weiteren diente die magnetische Zellseparation anhand der CD31-Oberflächenexpression dazu, mögliche CD31-negative Zellen (d.h. alle Nicht-Endothelzellen) aus dem bestehenden Zellgemisch zu entfernen. Die Effizienz dieses Vorgehens sollte im Anschluss daran überprüft werden, auch wenn die in dieser Arbeit isolierten Endothelzellen im Vergleich zu den in der Literatur abgebildeten Endothelzellen optisch, d.h. mikroskopisch, keine Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Methoden gewählt, um die Endothelzellidentität zu bestätigen. Sowohl der Western Blot als auch die Immunfluoreszenz wurden angewandt, um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten Zellen um humane pulmonal-arterielle Endothelzellen handelt. Beide Verfahren basieren auf der Detektion bestimmter Proteine, die ein unterschiedliches Expressionsmuster bei den genannten Zelltypen, d.h. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, zeigen.

3.3.2 Western Blot

Zunächst wurden mit einem Extraktions-Reagenz Protein-Lysate aller isolierten Endothelzellen hergestellt. Für einen Vergleich mit anderen Zelltypen wurden entsprechende Zellen kommerziell bzw. von der UGMLC/DZL Biobank Gießen erworben. Gekaufte Endothelzellen (PAECs) gesunder Patienten sowie glatte Muskelzellen (PASMCs) und Fibroblasten (PAFBs) von Patienten mit COPD und Fibrose dienten hierbei als Vergleichsmaterial. Als endothelzellspezifische Marker wurden CD31 sowie die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eingesetzt. CD31 wird in hohen Mengen auf der Endothelzelloberfläche exprimiert, ist unter anderem an der Angiogenese und der Leukozyten-Transmigration beteiligt und fungiert als Mechanosensor für Scherstress [33, 40, 44]. Auch eNOS wird von den Endothelzellen exprimiert, nicht aber von den Fibroblasten und glatten Muskelzellen, was auch dieses Enzym zu einem spezifischen Marker für Endothelzellen macht [20]. Im Western Blot wird deutlich, dass die angesprochenen Marker nur von den Endothelzellen exprimiert werden, wodurch deren

Identität gesichert wurde (siehe Abbildung 18). Dies betrifft sowohl die gekauften gesunden als auch alle selbst isolierten Endothelzellen. Als Marker für die SMC wurde glattes Muskelzell-Aktin verwendet. Hierbei ist eine erhöhte Expression in den SMC und teilweise auch in den Fibroblasten zu beobachten, während die Endothelzellen dieses nicht aufweisen. Vimentin hingegen ist bei nahezu allen getesteten Zellen nachweisbar. Vinculin und GAPDH dienen als Ladekontrollen. Zusammenfassend konnte durch den Western Blot mit den verschiedenen Zellmarkern belegt werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um Endothelzellen handelt (Abbildung 18).

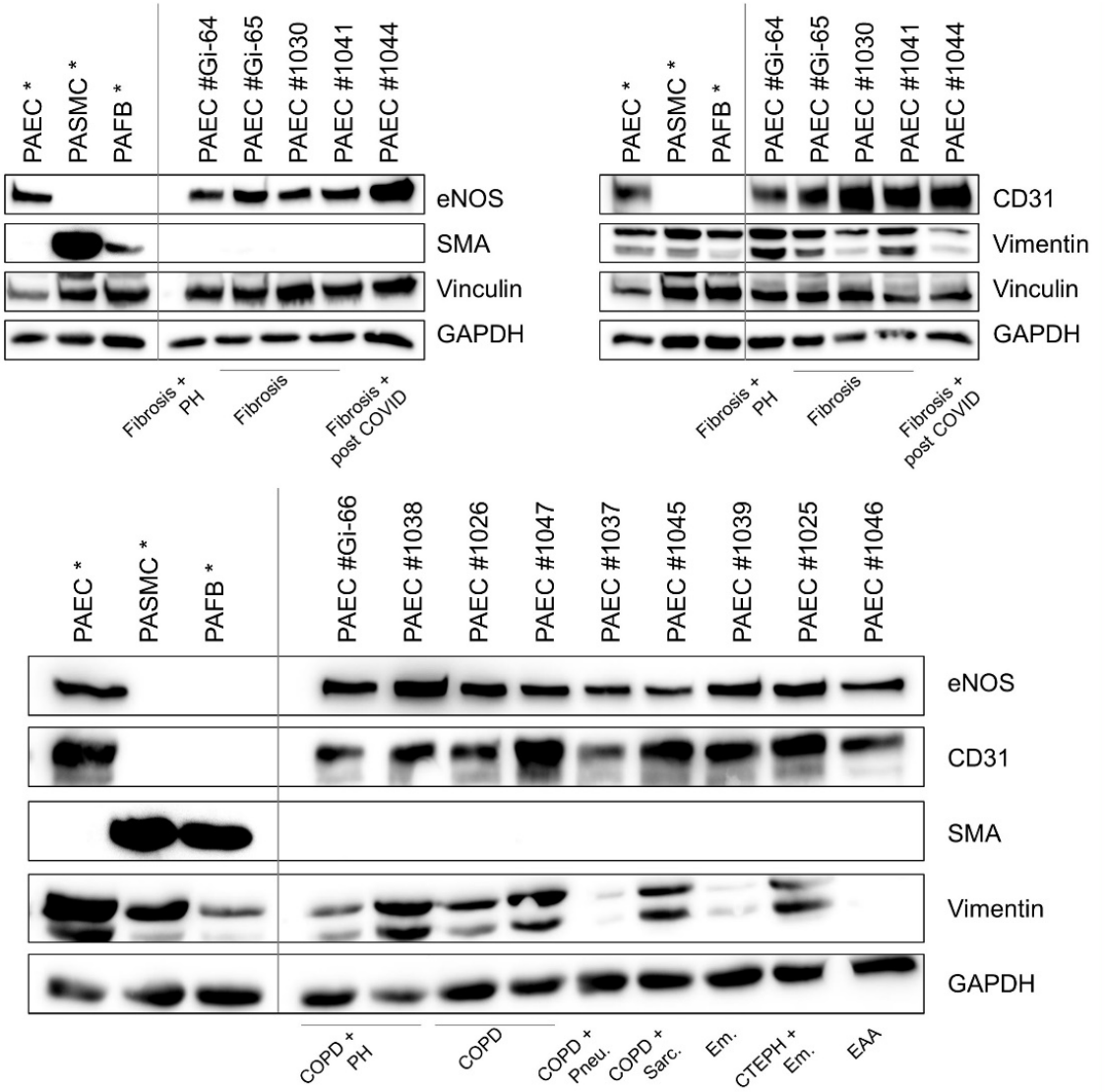


Abbildung 18: Western Blot.

Zu sehen sind die Western Blots der isolierten pulmonal-arteriellen Endothelzellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen (PAEC) im Vergleich zu gesunden Endothelzellen (PAEC), glatten Muskelzellen (PASMC) und Fibroblasten (PAFB). Die isolierten Endothelzellen exprimieren die gleichen endothelzellspezifischen Marker (eNOS und CD31) wie die käuflich erworbenen Endothelzellen eines gesunden Patienten. Davon lassen sich die glatten Muskelzellen und Fibroblasten klar abgrenzen,

da sie diese Marker nicht exprimieren. Vinculin und GAPDH fungieren hier als Ladekontrolle. *PAEC: (483Z028.1, 458Z016.15) gesund, Promocell (Heidelberg), PASMC: (´0000701036, 22TL073026) gesund, Lonza (Basel), PAFB (693, 868) COPD + sekundäre PH beziehungsweise IPAH mit Fibrose, Emphysem und Pulmonalarteriensklerose, UGMLC/DZL Biobank Gießen.

Insgesamt wurde der Western Blot mit Protein-Lysaten von Endothelzellen isoliert aus Pulmonalarterien von 14 verschiedenen Lungenpatienten durchgeführt. Zu den verschiedenen Erkrankungen zählen die Lungenfibrose, Lungenfibrose mit sekundärer pulmonaler Hypertonie, Lungenfibrose mit begleitendem Zustand nach Covid-19, COPD, COPD mit sekundärer PH, COPD mit Pneumonie, Sarkoidose und COPD, Emphysem, CTEPH mit Emphysem und die EAA.

3.3.3 Immunfluoreszenz

Auch die Immunfluoreszenz dient zum Nachweis der „Endothelzell-Identität“. Sie wurde als zweite Kontrolle an einer repräsentativen Auswahl an Zell-Isolaten durchgeführt, die sowohl gesunde als auch kranke Lungen beinhaltet. PASMC und PAFB dienten als Negativkontrolle. Als Endothelzellmarker fungierte, wie auch schon bei der magnetischen Aufreinigung und im Western Blot CD31. Es wurden nun auch verschiedene anti-CD31 Antikörper von verschiedenen Herstellern eingesetzt (siehe Anhang 2), deren passender Zweit-Antikörper jeweils mit einem grün-fluoreszierenden oder rot-fluoreszierenden Konjugat versehen ist (Abbildung 19).

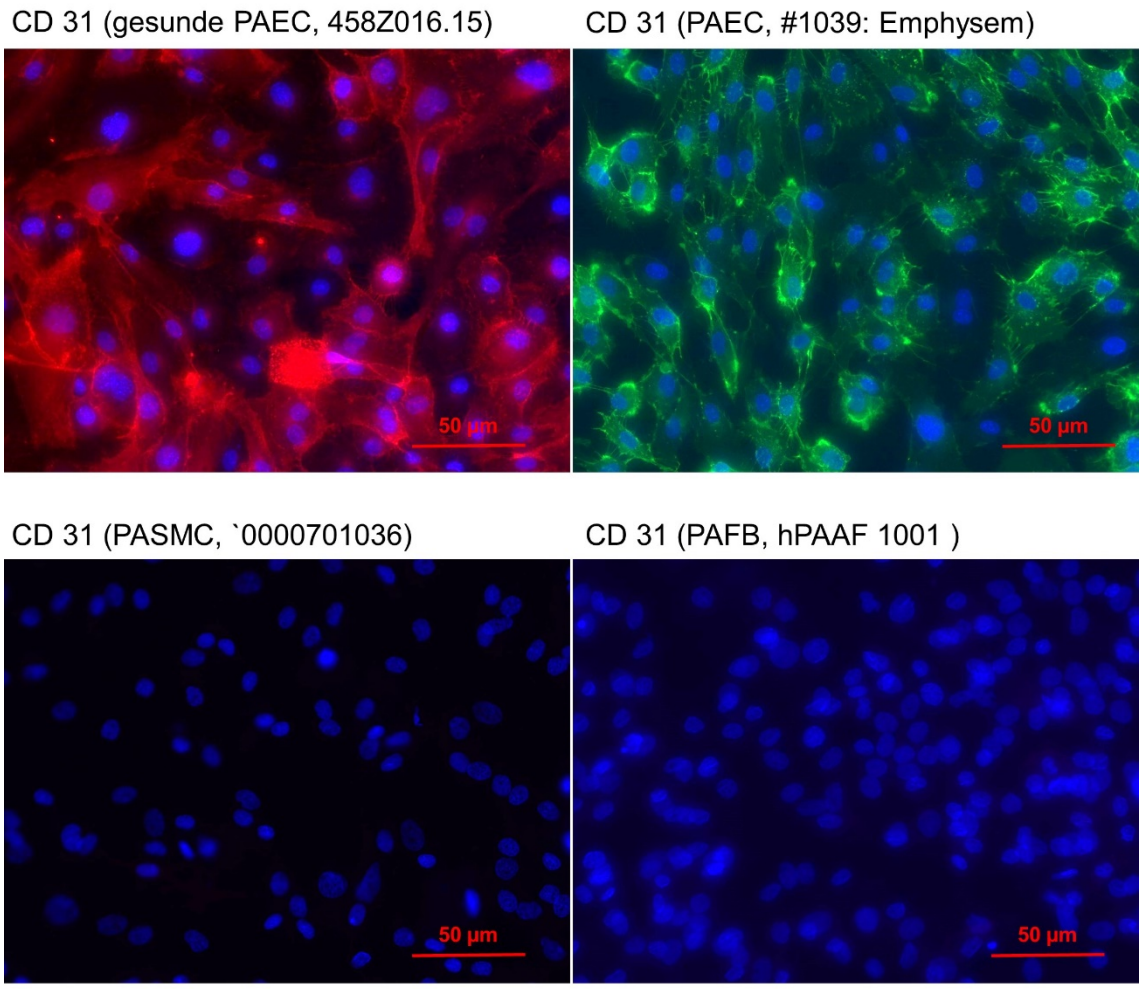


Abbildung 19: Immunfluoreszenz.

Zu sehen ist die Immunfluoreszenz von verschiedenen Zelltypen mit einem endothelzellspezifischen CD31 Antikörper. Die gesunden käuflich erworbenen Endothelzellen (rot) sowie die selbst isolierten Endothelzellen (hier #1039 beispielhaft gezeigt) (grün), exprimieren das CD31, was durch die Fluoreszenzfärbung deutlich wird. Im Gegensatz dazu sind PASMC und PAFB zu sehen, welche CD31 nicht exprimieren. Weitere Beispiele mit den CD31 Antikörpern verschiedener Hersteller befinden sich im Anhang.

In Abbildung 19 wird deutlich, dass sowohl die gesunden gekauften Zellen als auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Endothelzellen gleichermaßen den endothelzellspezifischen Marker CD31 deutlich exprimieren und damit eindeutig einen Endothelzell-Charakter aufweisen. Im Gegensatz dazu exprimieren die glatten Muskelzellen und Fibroblasten diesen Marker nicht, was sie von den Endothelzellen unterscheidet und nochmals unterstreicht, dass es sich bei den isolierten Zellen um Endothelzellen handelt.

3.4 Funktionelle Charakterisierung der isolierten Endothelzellen

3.4.1 Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung

Nachdem die Endothelzellen von humanen Lungen zuverlässig als Endothelzell-Population ohne Kontamination mit anderen Zelltypen betrachtet werden können, sollten diese in funktionellen Tests weitergehend charakterisiert werden. Hierzu dienen zwei verschiedene Testverfahren: Zum einen wurde der BrdU-Test genutzt, um die Proliferation der Endothelzellen zu untersuchen, während der Angiogenesetest zum anderen die Fähigkeit der Zellen beschreibt, sogenannte Röhren (englisch: *Tube formation assay*) zu bilden, welche *in vivo* die Gefäße von Innen auskleiden. Diese sogenannten phänotypischen Studien werden an nach der Kryokonservierung aufgetauten Endothelzellen durchgeführt, um den Versuchsbedingungen, wie sie für andere Experimente vorliegen, zu entsprechen. Denn im Allgemeinen werden Primärzellen kommerziell aber auch aus der UGMLC/DZL Biobank Gießen im gefrorenen Zustand bezogen. Dieses Vorgehen wurde auch hier gewählt, um eine Vergleichbarkeit herzustellen und um die beobachteten Effekte in Bezug auf das Zellwachstum und die Angiogenese standardisiert beurteilen zu können. Um das Verhalten der Endothelzellen bei den verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum gesunden Zustand beschreiben zu können, wurden Konditionen gewählt, die es erlauben, Aussagen über deren Reaktion hinsichtlich der Stimulation der Proliferation bzw. deren Inhibition treffen zu können, ohne einen spezifischen Bezug auf den Wirkmechanismus der einzelnen Inhibitoren zu nehmen.

3.4.2 BrdU-Test

3.4.2.1 Aufbau und Hintergrund

Der BrdU-Test ist in diesem Fall ein „Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA), der die Aufnahme der markierten Pyrimidin-Analoga Bromdesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese nachweist und somit Rückschlüsse über den Anteil proliferierender Zellen zulässt. Anhand der Menge der synthetisierten DNA von den sich teilenden Zellen kann somit die Häufigkeit der Zellteilung direkt erfasst werden. Es wurden sowohl zwei gesunde Endothelzell-Isolate (als Kontrolle) als auch die 18 erfolgreich isolierten Zelllots von Patienten mit Lungenerkrankungen eingesetzt. Als Zeitpunkte wurden 24 h und 48 h nach einer Behandlung der Zellen mit verschiedenen Stimulationen bzw. Inhibitoren gewählt, wobei in dieser Arbeit lediglich der 48 h Zeitpunkt gezeigt wird. Unter die

Konditionen fielen das Hungermedium (HM) d.h. Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicllin/Streptomycin, sowie Wachstumsmedium (WM) und WM mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren. Eingesetzt wurden Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 2), welche bereits alle in der Vergangenheit durch die Arbeitsgruppe vor allem in Bezug auf das Wachstum von glatten Muskelzellen erfolgreich getestet und etabliert werden konnten [66, 68, 72].

Namen	Ziele	Konzentrationen
Palbociclib	CDK4/CDK6	100 nM 500 nM
Regorafenib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFRß, Kit (c-Kit), RET (c-RET), Raf-1	100 nM 500 nM 1 µM
Ruxolitinib	JAK1/JAK2	1 µM 5 µM 10 µM

Tabelle 2: Kinase-Inhibitoren im Brdu-Test.

Zu sehen ist das Profil der Kinase-Inhibitoren (Palbociclib, Regorafenib, Ruxolitinib) und deren eingesetzte Konzentrationen.

3.4.2.2 Testergebnisse

Wie bereits erwähnt, soll durch den BrdU-Test untersucht werden, ob die in der vorliegenden Arbeit isolierten Endothelzellen nach der Kryokonservierung eine physiologische Reaktion auf Wachstumsstimulation bzw. -inhibition zeigen können. Als Kontrollen dienen hier Endothelzellen, die kommerziell erworben wurden und von lungengesunden Spendern stammen. Die nachstehende Abbildung zeigt das Proliferationsverhalten verschiedener Endothelzell-Isolate beispielhaft. Die Testergebnisse aller isolierten Endothelzellen finden sich nachstehend in Tabellenform und die zugehörigen Graphen im Anhang.

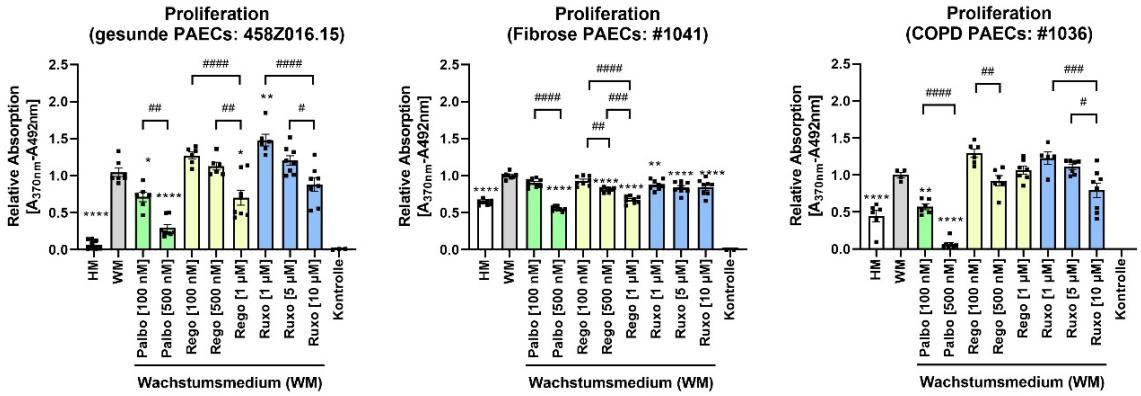


Abbildung 20: BrdU-Test 48 h nach Behandlung.

Die BrdU-Messungen von den Endothelzellen einer gesunden Lunge und zwei erkrankten Lungen zum 48 h Zeitpunkt. Die Kontrolle entspricht einer Hintergrundkontrolle, was bedeutet, dass die Zellen nicht mit BrdU markiert wurden. Zudem wurde eine Leerkontrolle ohne Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Die Absorptionswerte der relativen Absorption [370 nm-492 nm] sind in der y-Achse angegeben. Daten (n = 8) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen, die jeweils in Quadruplikaten gemessen wurden, sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ stellen die konzentrationsabhängigen Signifikanzen innerhalb eines Inhibitors dar.

Wie in Abbildung 20 und im Anhang dargestellt, sind beim Vergleich des Proliferationsverhaltens der gesunden mit den kranken PAEC keine Einschränkungen oder Veränderungen zu erkennen. Es wird deutlich, dass die Erkrankungen sowie die Kryokonservierung und auch das Auftauen trotz einer teilweise zuvor langen Kultivierung mit mehrfacher magnetischer Zellseparation, was Stress für die Zellen bedeutet, keinen Einfluss auf die Proliferation an sich und/oder die eingesetzten Inhibitoren haben. Aus Abbildung 20 wird zudem teilweise eine Konzentrationsabhängigkeit der Kinase-Inhibitoren ersichtlich.

		Induktion der Proliferation nach …	Inhibition der Proliferation durch Behandlung mit ..		
Erkrankung	**Patienten-ID**	**Stimulation mit Wachstumsfaktoren**	**Palbociclib**	**Regorafenib**	**Ruxolitinib**
Gesund	458Z015.16	ja	ab 100 nM	ab 1 µM	-
	483Z028.1	ja	ab 100 nM	ab 500 nM	-
COPD + PH	Gi-66	ja	ab 100 nM	ab 1 µM	-
	#1038	ja	ab 500 nM	Trend	-
COPD + Pneumonitis	#1037	ja	ab 100 nM	ab 1 µM	-
COPD	#1026	ja	ab 500 nM	-	-
	#1036	ja	ab 100 nM	-	Trend
	#1047	ja	ab 500 nM	-	-
Sarkoidose + COPD	#1045	ja	ab 100 nM	ab 1 µM	-
Emphysem	#1039	ja	ab 500 nM	ab 1 µM	-
CTEPH + Emphysem	#1025	ja	ab 500 nM	-	-
EAA	#1046	ja	ab 500 nM	ab 1 µM	-
Fibrose	#Gi-65	-	ab 100 nM	-	ab 10 µM
	#1030	Trend	Trend	-	-
	#1041	ja	ab 500 nM	ab 500 nM	ab 1 µM
Fibrose + post-Covid	#1044	ja	ab 100 nM	-	-
Fibrose + PH	#Gi-63	ja	ab 500 nM	ab 500 nM	ab 1 µM
	#Gi-64	ja	ab 100 nM	Trend	Trend
	#1023	ja	ab 500 nM	-	-
	#1027	ja	ab 100 nM	-	ab 1 µM

Tabelle 3: Induktion und Inhibition der Proliferation im BrdU-Test.

Die Tabelle zeigt das Verhalten aller isolierten PAEC sowie zwei gesunder PAEC-Kontrollen nach Induktion der Proliferation durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Inhibition der Proliferation durch Behandlung mit Kinase-Inhibitoren (siehe Tabelle 2). Bei einer Inhibition durch einen Kinase-Inhibitor ist immer die niedrigste Konzentration, bei der die Inhibition statistisch signifikant war, angegeben.

Deutlich wird, dass die Proliferation bei nahezu allen PAEC durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren induziert werden kann. Zudem lässt sich die Proliferation auch bei fast allen PAEC durch Palbociclib in verschiedenen Konzentrationen inhibieren. Regorafenib und Ruxolitinib führen teilweise zu einer Inhibition der Proliferation.

3.4.3 Angiogenesetest

3.4.3.1 Aufbau und Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung

Der Angiogenesetest (englisch: *Tube formation assay*) wurde in erster Hinsicht durchgeführt, um zu überprüfen, ob die isolierten Endothelzellen ihre charakteristische Fähigkeit Röhren (englisch: tubes) und Schleifen (englisch: loops) zu bilden auch nach der Kryokonservierung beibehalten. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob sich die verschiedenen Erkrankungen auf diese Eigenschaft auswirken können. Matrigel dient

als am häufigsten verwendete Beschichtungssubstanz, die aus Laminin, Kollagen IV, Entactin und dem Heparinsulfat Proteoglycan besteht und optimale Bedingungen für die Angiogenese der Endothelzellen bietet. Als Konditionen wurden ähnlich den Proliferationsexperimenten HM, WM und WM mit den bereits bekannten Kinase-Inhibitoren Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Tabelle 2). Nach Aussaat der Zellen in Medium mit den verschiedenen Wachstums- bzw. Inhibitionsbedingungen auf das Matrigel wurden jeweils Bilder zum Zeitpunkt 0 h, 6 h, 12 h und 24 h gemacht. In dieser Arbeit wird ausschließlich der 12 h Zeitpunkt gezeigt, da zu diesem Zeitpunkt die vollständige Ausbildung der Röhren und Schleifen zu sehen war, während sich diese nach längerer Zeit wieder auflösten (siehe Abbildung 21), was für die Auswertung am geeignetsten erschien. Der 12 h Zeitpunkt wurde auch zur Quantifizierung der Bilder mit der Software FastTrack AI von MetaVÍ Labs gewählt.

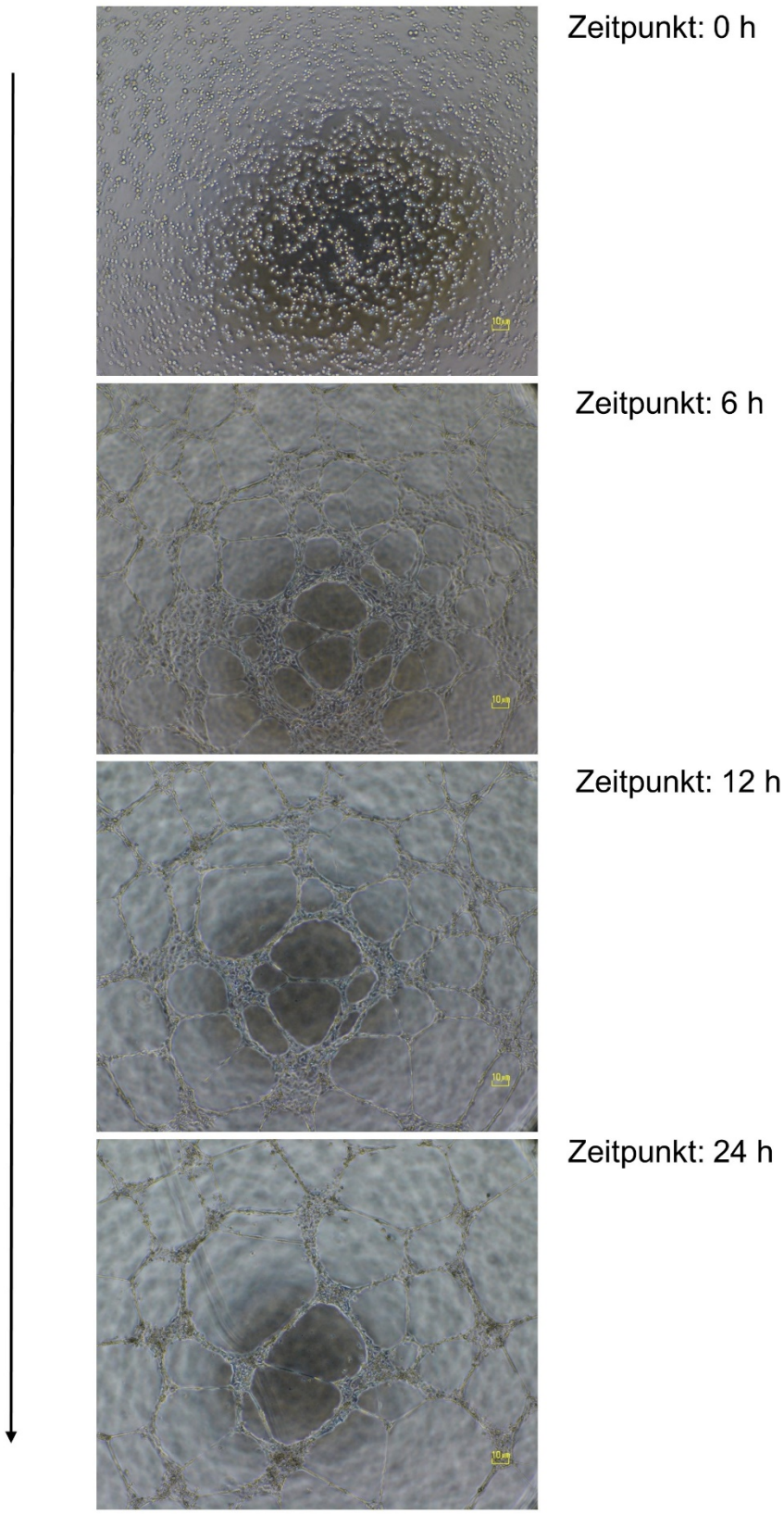


Abbildung 21: Zeitkinetik der Angiogenese.

Die Abbildung zeigt die endothelzellspezifische Bildung der Schleifen und Röhren im Verlauf der Zeit. Die Zeitpunkte 0 h, 6 h, 12 h und 24 h sind abgebildet. Für die

Auswertung wurde der 12 h Zeitpunkt gewählt, da die Röhren hier vollständig ausgebildet sind, während deren beginnendes Auflösen zum 24 h Zeitpunkt sichtbar ist.

Repräsentative Bilder und eine Erläuterung des Vorgehens können der nachstehenden Abbildung 22 anhand der Endothelzellen #Gi-65 (Fibrose) entnommen werden.

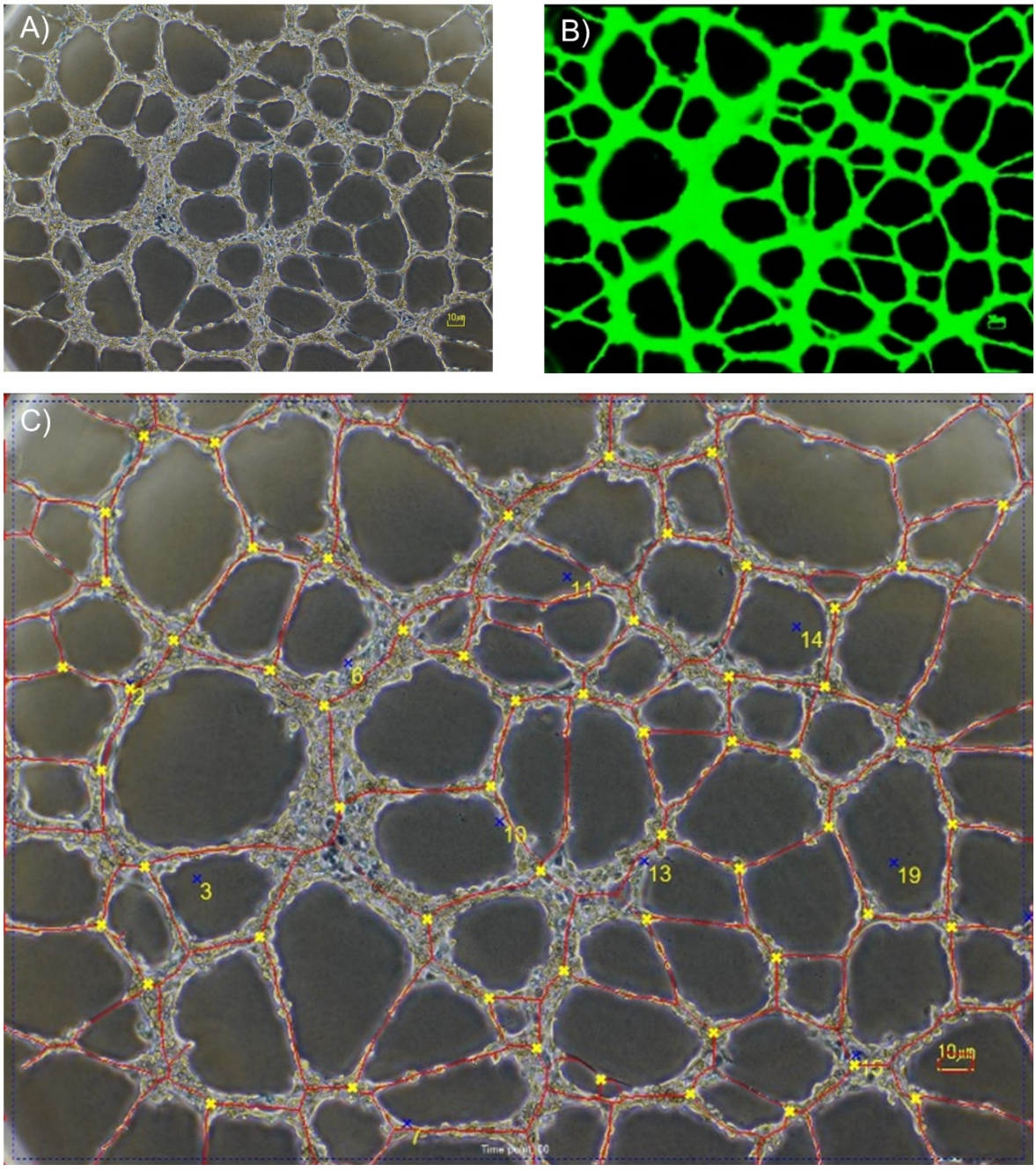


Abbildung 22: Methode zur Auswertung des Angiogenesetests.

Abbildung A zeigt das in FastTrack AI von MetaVÍ Labs hochgeladene Bild der Lunge #Gi-65 (Fibrose) mit Wachstumsmedium zum 12 h Zeitpunkt. Abbildung B zeigt das von der Software mit einem Farbfilter bearbeitete Bild, um die Kontraste zu erhöhen und somit die Strukturen besser abgrenzen zu können. Abbildung C ist das zuvor hochgeladene Bild, nachdem es von der Software bearbeitet und ausgewertet wurde.

Hierbei markieren die gelben Kreuze die Verzweigungspunkte und die roten Linien zeigen den Umriss der Schleifen an.

Nach Hochladen des auszuwertenden Bildes (siehe Abbildung 22 A), werden die Schleifen und Rohre von der Software mit Hilfe eines besser kontrastierten Bildes (siehe Abbildung 22 B) markiert und somit die Parameter Anzahl der Schleifen, durchschnittliche Schleifenfläche, Gesamtlänge des Rohrs, durchschnittliche Rohrlänge und Anzahl der Verzweigungen, bestimmt (siehe Abbildung 22 C). Alle hochgeladenen Bilder (zum 12 h Zeitpunkt mit WM) und die zugehörigen kontrastierten Bilder sind im Anhang zu finden.

3.4.3.2 Testergebnisse

Die nachstehende Abbildung zeigt eine Auswahl an Diagrammen der quantifizierten Daten zur Anzahl der Schleifen, durchschnittlichen Schleifenfläche, Gesamtlänge des Rohrs, durchschnittliche Länge des Rohrs und Anzahl der Verzweigungen (Abbildung 23) zum 12 h Zeitpunkt. Die Graphen zur Angiogenese aller isolierten Lungen befinden sich im Anhang.

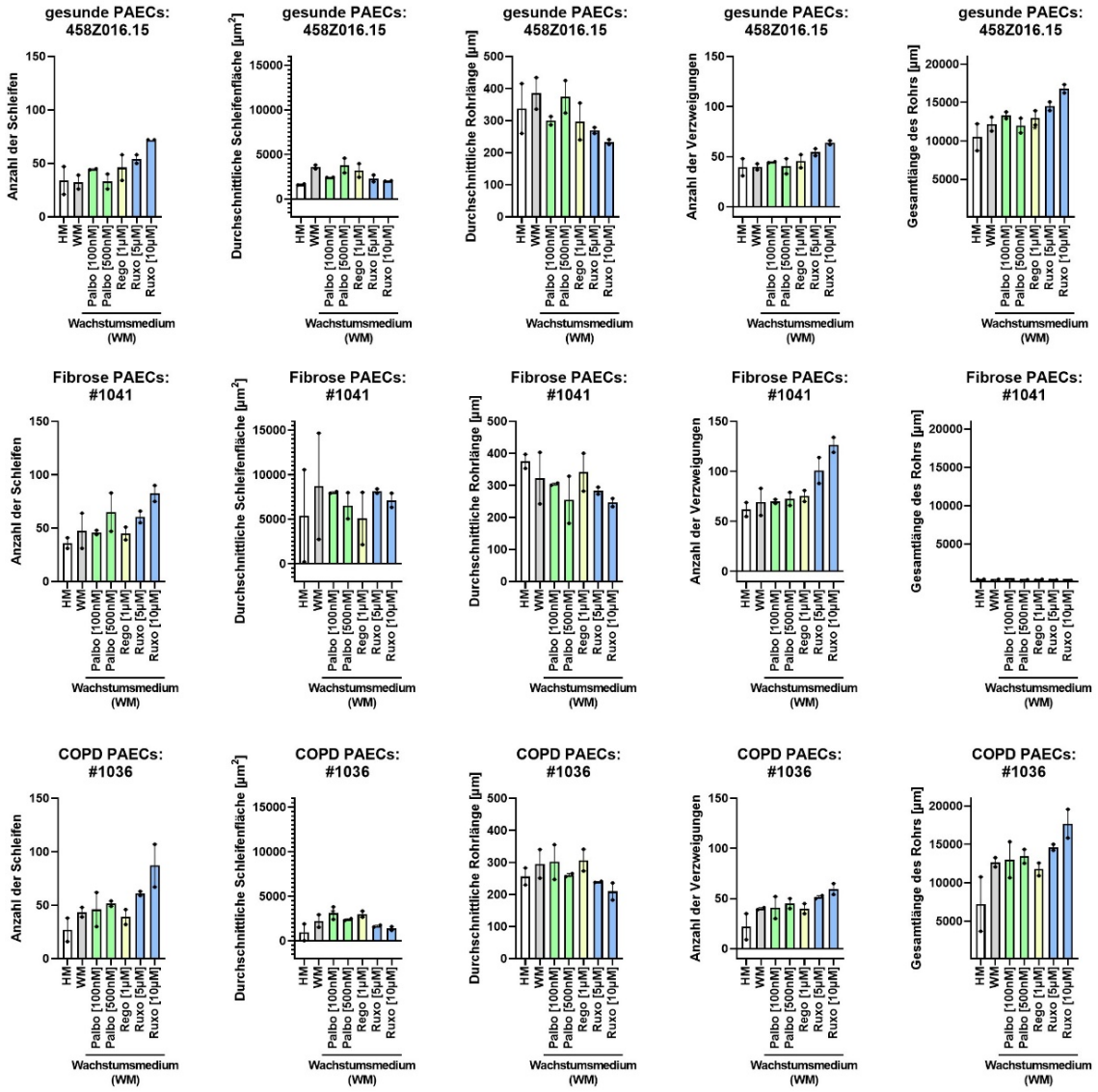


Abbildung 23: Angiogenesetest.

Dargestellt sind die Parameter Anzahl der Schleifen, durchschnittliche Schleifenfläche [µm^2], durchschnittliche Rohrlänge [µm], Anzahl der Verzweigungen und Gesamtlänge des Rohrs [µm] im Angiogenesetest von den Endothelzellen einer gesunden Lunge und zwei erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.

Es lassen sich keine Zusammenhänge oder Unterschiede der Angiogenese der Endothelzellen bei den verschiedenen Lungenerkrankungen erkennen. Es wird deutlich, dass die Angiogenese bei den erkrankten Zellen in vergleichbarem Maße zu den

gesunden Zellen abläuft. Die eingesetzten Inhibitoren haben im Gegensatz zu ihrem Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit keinen Einfluss auf die Angiogenesefähigkeit der Endothelzellen.

4. Diskussion

4.1 Einordung in den wissenschaftlichen Kontext bei den verschiedenen Lungenerkrankungen

Bereits bekannt ist, dass Endothelzellen bei der Pathogenese der PH eine große Rolle spielen. Durch ihre überschießende Proliferation tragen sie unter anderem zum Gefäßumbau, zur verstärkten Thrombenbildung und Vasokonstriktion bei, was im weiteren Verlauf in einer vaskulären Obstruktion resultiert. Aus diesen charakteristischen zellulären Veränderungen kann sich eine PH und im weiteren Verlauf ein Rechtsherzversagen entwickeln [10]. Wie eingangs beschrieben, war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit, ein Protokoll für die Isolation der humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen zu etablieren, um diese in anschließenden experimentellen Studien detailliert untersuchen und phänotypisch beschreiben zu können. Dadurch sollen die von den Endothelzellen ausgehenden Umbauprozesse bei der PH eingehender verstanden und auf Grundlage dessen neue, auf diesen Zelltyp ausgerichtete Therapien entwickelt werden.

Doch auch bei anderen Lungenerkrankungen sind Endothelzellen in die Prozesse der Krankheitsentstehung involviert. Bei der COPD beispielsweise ist bereits bekannt, dass die endotheliale Dysfunktion als Prognosefaktor für die Erkrankung dienen kann, da der Verlust von verschiedenen Endothelzellmarkern mit einer reduzierten Lungenfunktion korreliert [17]. Die Endothelzellschicht führt durch Zellverlust, Ablösung, frühzeitige Apoptose und Entzündungsprozesse zu Atherosklerose und geschwächten Zell-Zell-Kontakten, was wiederum zu Gefäßundichtigkeiten führen kann. Um die geschädigten Endothelzellen zu ersetzen, folgt eine erhöhte Proliferation, was allerdings einen erhöhten Energieumsatz und einen Sauerstoffmangel dieser Zellen zur Folge hat [17, 56, 59]. Das reduzierte Sauerstoffangebot aktiviert zudem neben anderen Prozessen Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF), woraus aufgrund eines komplexen Signalweges inklusive einer Anpassung des Genexpressionsmusters ein Gefäßumbau resultiert [59]. Bedingt durch die genannten Mechanismen weisen ca. 50 % der COPD Patienten eine begleitende pulmonale Hypertonie auf [17, 56, 59].

Auch bei der Lungenfibrose sind Endothelzellen in den Krankheitsverlauf involviert. Hierbei führen fehlregulierte Epithelzellen durch Interaktion mit Mesenchymal-, Immun- und Endothelzellen zu vermehrter Produktion von Fibroblasten und Myofibroblasten, welche daraufhin vermehrt Bestandteile der extrazellulären Matrix einlagern [39, 50]. Außerdem durchlaufen die Endothelzellen eine frühzeitige Umwandlung, wobei sie ihre

ursprüngliche Zellidentität verlieren. Dieser Prozess nennt sich Endothel-zu-Mesenchym-Transition und ist unter anderem charakteristisch für die Lungenfibrose [39, 50]. Während sich durch große dilatierte Gefäße eine abnormale Vaskularisation in den fibrotischen Arealen zeigt, ist die Vaskularisation um die fibrotischen Areale außenherum erhöht. Die Gefäßmängel in den fibrotischen Arealen führen auch hier zu einem erhöhten Gefäßwiderstand, weshalb über 60 % der Patienten mit einer Erkrankung im Endstadium eine begleitende PH aufweisen, was wiederum mit einer erhöhten Mortalität dieser Patienten einhergeht [39, 50].

All diese Erkenntnisse zeigen, dass die Endothelzellen neben der pulmonalen Hypertonie auch bei der Lungenfibrose und der COPD eine zentrale Funktion haben. Aus diesem Grund spielt die Charakterisierung dieser Zellen sowohl für das verbesserte Verständnis verschiedener Lungenerkrankungen als auch für mögliche endothelzell-spezifische Therapieansätze eine große Rolle.

4.2 Isolation von pulmonal-arteriellen Endothelzellen

Als Material für die Isolation der pulmonal-arteriellen Endothelzellen standen 1-2 cm große Teilstücke von Pulmonalarterien der explantierten Lungen aus Gießen und Wien über eine Kooperation mit der UGMLC/DZL Biobank in Gießen zur Verfügung. Basierend auf diversen Protokollen und Methoden zur Isolation der Endothelzellen wurde ein praktikables und standardisiertes Protokoll entwickelt. Sowohl das mechanische Entfernen (d.h. Abkratzen) der Zellen [37], als auch die Kombination der Enzyme Dispase und Kollagenase [64] brachte zunächst keinen Erfolg (Daten hier nicht gezeigt). Orientiert an der Vorgehensweise von Asosingh et al. wurde schließlich ein Protokoll entwickelt, bei dem es gelungen war, die Endothelzellen aus dem Gewebeverband herauszulösen und diese in der Lage waren, sich an die Oberfläche der Zellkulturschale anzuheften und zu vermehren (siehe Abbildung 10) [3]. Hierbei diente Fibronektin als ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix zur Beschichtung der Platte, während die Liberase, bestehend aus Kollagenase 1, Kollagenase 2 und Thermolysin, zum Herauslösen der Endothelzellen aus ihrem Verband in der Pulmonalarterie genutzt wurde. Nach regelmäßigem Mediumwechsel und dem Einsatz der magnetischen Separation (MACS) gelang es schließlich eine reine Endothelzellkultur zu erhalten, wobei der Herkunftsort der Lunge und somit auch die Zeit bis zum Eintreffen einen Einfluss auf die benötigte Anzahl der MACS-Durchgänge haben könnte (Abbildung 17). Anschließend wurden die Zellen kryokonserviert, wobei ein Zusammenhang zwischen der Zeitspanne der Isolation bis zur Kryokonservierung und der Tatsache, ob die

Endothelzellen direkt nach Eintreffen der Lunge isoliert wurden oder die Lunge eine Nacht im Kühlschrank zwischengelagert wurde, beobachtet werden konnte (Abbildung 16). Nach dem Auftauen der Zellen wurde die Identität der Endothelzellen mittels Western Blot und Immunfluoreszenz gesichert und die isolierten Zellen durch einen Proliferations- und einen Angiogenesetest charakterisiert. Nun stehen die Endothelzellen der verschiedenen Lungenerkrankungen den Kollegen für weitere Experimente zur Verfügung.

Eine grundlegende Limitation bei der Endothelzell-Isolation, bezogen auf die „geringe Verfügbarkeit“, ist die Tatsache, dass die explantierten Lungen in dem zur Verfügung stehenden Zeitraum ausschließlich von Transplantationen aus Gießen und Wien bereitgestellt wurden. Ein weiterer Faktor neben der Logistik, Infrastruktur, den Chirurgen und dem Team der Gießener UGMLC/DZL Biobank rund um das Thema Transport und Aufarbeitung, ist selbstverständlich auch das Einverständnis der Patienten, das Gewebe für Forschungszwecke nutzen zu dürfen. D.h. weder die Lungenerkrankung bzw. der Explantationsgrund noch der Zeitpunkt der Operation waren vorhersehbar, weshalb bspw. keine Lunge mit der Einzeldiagnose PAH in diese Arbeit mit aufgenommen werden konnte. Zudem hatten die Patienten, deren explantierte Lungen genutzt wurden, häufig verschiedene Diagnosen oder zusätzliche Begleiterkrankungen. Dies sorgte dafür, dass die daraus isolierten Endothelzellen nicht immer über einen einzelnen Diagnose-spezifischen Phänotyp verfügten und Schlussfolgerungen über die Charakteristika für einzelne Erkrankungen erschwert waren. Die Diagnosen der in dieser Arbeit untersuchten Lungen sind in Abbildung 15 dargestellt. Des Weiteren war es sehr selten möglich, Gewebe von gesunden Spender-Lungen (sogenannte Donoren) zu erhalten, da dieses in aller Regel vollständig transplantiert wird. Nur in seltenen Fällen stand davon Material zur Verfügung, und oftmals waren mehrere Arbeitsgruppen daran sowie auch an den explantierten Pulmonalarterien interessiert, wodurch die Gewebemenge teilweise reduziert und nicht zu beeinflussen war.

4.3 Bestätigung der Endothelzellidentität

Wie bereits angesprochen, sollte nach der Isolation der Zellen sowohl die Identität als auch die Reinheit im Sinne der Abwesenheit anderer Zelltypen bestätigt werden, um zu gewährleisten, dass es sich bei den zu charakterisierenden Zellen ausschließlich um Endothelzellen handelt. Durch optischen Vergleich zu Abbildungen von Endothelzellen in der Literatur [7] sowie das Einsetzen von anti-CD31-Antikörper-beschichtete Kugeln

in der magnetischen Separation konnte bereits sichergestellt werden, dass es sich um Endothelzellen handelt, da CD31 kaum von anderen Zelltypen exprimiert wird [40, 44]. Die Ergebnisse im Western Blot (Abbildung 18) und in der Immunfluoreszenz (Abbildung 19) validieren diese Annahme. Hier wurden zur Bestätigung der Endothelzellidentität die endothelzell-spezifischen Marker CD31 sowie eNOS genutzt [30, 31, 49], während als spezifischer Marker für glatte Muskelzellen (SMC) das entsprechende Muskelzell-Aktin [73], und für Fibroblasten das für diese Zellen typische Protein Vimentin, diente [45]. Im Western Blot (Abbildung 18) zeigten die Marker CD31 und eNOS eine Expression in den Endothelzellen, während diese bei den Vergleichszellen, d.h. SMC und Fibroblasten, nicht zu sehen waren. Unterstützend zu dieser Erkenntnis exprimierten die Endothelzellen im Gegensatz zu den anderen beiden Zellentitäten kein glattes Muskelzellaktin. Vimentin hingegen wurde von allen drei Zelltypen exprimiert (siehe Abbildung 18). Das Auftreten einer Vimentin-Proteinexpression ist eine mit zunehmender Kultivierung von Endothelzellen aufkommende Veränderung. Endothelzellen können nach einer gewissen Zeit eine bereits angesprochene Transdifferenzierung durchlaufen, wobei sie von ihrer reinen Endothelzellidentität abweichen und unter anderem fibroblasten-spezifische Marker wie Vimentin exprimieren können [32]. Diese Endothel-zu-Mesenchym-Transition ist charakteristisch für Endothelzellen vor allem im Zusammenhang mit verschiedenen Lungenerkrankungen [13] und könnte im geschilderten Fall die Expression von Vimentin erklären. Als letzte Methode zur Verifizierung des Endothelzell-Charakters wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, wodurch die Annahme, dass es sich um eine reine Endothelzell-Population handelt, abermals bestätigt werden konnte. Es war eine Expression des endothelzell-spezifischen Oberflächenproteins CD31 unter Verwendung von entsprechenden anti-CD31-Antikörpern verschiedener Hersteller (siehe Abbildung 19, Anhang 2) zu erkennen, wodurch die Identität der Endothelzellen nochmals gesichert wurde.

4.4 Charakterisierung der Endothelzellen

4.4.1 Kinase-Inhibitoren zur Hemmung der zellulären Proliferation

Zur Charakterisierung der isolierten und kryokonservierten Endothelzellen wurden bei den verschiedenen Tests die Kinase-Inhibitoren Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib eingesetzt (siehe Tabelle 2). Diese sind bisher ausschließlich für die Therapie verschiedener maligner Erkrankungen zugelassen, wurden jedoch auch schon im

Zusammenhang mit der PH und hier vor allem in Bezug auf ihre Effekte auf pulmonal-vaskuläre Zellen wie SMC und auch Endothelzellen getestet [66, 68, 72]. Durch die Erfahrung mit diesen Inhibitoren im Zusammenhang mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen in der Arbeitsgruppe und die dadurch bedingte gute Verfügbarkeit der Substanzen, wurde auf genau diese Inhibitoren zurückgegriffen, wenngleich auch die Wirkung COPD-spezifischer bzw. Fibrose-spezifischer Inhibitoren wie Nintedanib oder Pirfenidon von Interesse gewesen wäre [36]. Jedoch wurde durch die Etablierung des Protokolls für die Isolation der Endothelzellen und die Kryokonservierung der bereits isolierten Zellen, die Möglichkeit geschaffen, den Einfluss der für diese Erkrankungen spezifischen Inhibitoren weiter zu untersuchen. Palbociclib ist bisher bei Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs bei Fortschreiten des Tumors unter bisheriger Therapie in Kombination mit dem Anti-Östrogen Fulvestrant zugelassen. Die Wirkung beruht auf einer Inhibition der Zyklin-abhängigen Kinasen (deutsch für *Cyclin-dependent kinases, CDK*) CDK 4 und CDK 6, welche durch Phosphorylierung des Rb (Retinoblastom) Proteins, einem Tumorsuppressor, den Eintritt in den Zellzyklus fördern. Der Einsatz bei Brustkrebs-Patienten zeigt unter den genannten Bedingungen ein längeres progressionsfreies Überleben sowie eine höhere Lebensqualität [9, 61, 74].

Im Gegensatz dazu ist der Einsatz von Regorafenib für die Behandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen bei Refrakterität gegenüber einer vorangegangenen Chemotherapie gerechtfertigt. Durch Inhibition von VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TIE-2, PDGFR, FGFR-1, FGFR-2, C-KIT, RAF-1, BRAF, RET und CSF1R sorgt Regorafenib für eine anti-angiogenetische Wirkung auf abnormal wachsende Tumorgefäße und eine Verbesserung der anti-tumoralen-Immunantwort [2]. Gezeigt wurde eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Einsatz von Regorafenib zusätzlich zur Standardtherapie bei Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom [15] sowie ein Überlebensvorteil bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, welches unter alleiniger Therapie mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib weiter fortschreitet [6]. Aktuell werden in klinischen Studien eine Reihe neuartiger Ansätze getestet, die Regorafenib mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren kombinieren [2, 6, 15].

Der JAK 1 und JAK 2 Inhibitor Ruxolitinib ist zur Behandlung von Erkrankungen aus dem myeloproliferativen und histiozytären Formenkreis, wie der Myelofibrose, Polycythämia vera und der hämophagozytären Lymphohistiozytose, zugelassen [8, 23, 65]. Bei der Polycythämia vera beispielsweise ist Ruxolitinib bei unzureichendem Ansprechen auf die Standardtherapie mit Hydroxyharnstoff oder starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen überlegen. Es führt unter anderem zu einer Kontrolle des

Hämatokrits, einer Verringerung des Milzvolumens und einer allgemeinen Verbesserung der Symptomatik [8, 23, 65].

Der Einsatz der genannten Kinase-Inhibitoren ist jedoch auch bei Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie durchaus plausibel, da diese unter anderem als pseudomaligne Erkrankung beschrieben wird. Dies ist durch die Ähnlichkeit der pathogenen Mechanismen, wie die Eigenschaft, dass sich ruhende Zellen sowohl bei Karzinomen als auch bei der pulmonalen Hypertonie in einen pro-proliferativen, Apoptose-resistenten und pro-inflammatorischen Gefäßzellphänotyp entwickeln, begründet [47]. Wie auch bei malignen Erkrankungen gibt es häufig eine Inaktivierung oder einen Mangel an Tumorsuppressoren wie p53 und Rb. Zudem kommt es zur Überexpression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen, was wie auch bei malignen Erkrankungen zu anhaltender Proliferationsfähigkeit führt. VEGF und VEGFR-2 beispielsweise fand man vermehrt in pulmonal-arteriellen Endothelzellen aus plexiformen Läsionen bei Patienten mit PH. Das hyperproliferative Potenzial isolierter Lungengefäßzellen von PAH-Patienten trotz fehlender oder verminderter Wachstumsfaktoren spricht für einen zelleigenen, autonomen Wachstumsmechanismus. Des Weiteren ist die bei pulmonal-arteriellen Endothelzellen zu beobachtende Apoptose-Resistenz, die durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren hervorgerufen wird, der PAH und Erkrankungen aus dem malignen Formenkreis gemein [47]. Erwähnt werden sollte trotz allem, dass für Ruxolitinib sowohl eine Verbesserung der PAH, als auch eine Exazerbation derer beschrieben ist, wobei der Grund der Verschlechterung aktuell noch unklar ist [34, 38].

4.4.2 Proliferation der Endothelzellen

Nach ihrer erfolgreichen Isolation aus dem Gewebeverband der Pulmonalarterie und der Sicherung deren Identität sollten die kryokonservierten Endothelzellen hinsichtlich ihrer Proliferation charakterisiert werden. Dies diente dazu, herauszufinden, ob die Fähigkeit zum Wachstum der frisch isolierten Endothelzellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen im gleichen Maße vorliegt wie bei den gekauften und in diesem Fall gesunden Zellen. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob es Unterschiede in der Proliferation unter den einzelnen Krankheitsgruppen gibt und ob die verwendeten Inhibitoren Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib (siehe Tabelle 2), die in der Literatur beschriebenen Effekte als Proliferations-Hemmer zeigen [66, 68, 72]. Hierfür wurden sie in verschiedenen Konzentrationen jeweils im direkten Vergleich zu Hungermedium (HM), d.h. Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, und

Wachstumsmedium (WM), d.h. mit einer Mischung aus unterschiedlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, eingesetzt. Es zeigt sich, dass alle Inhibitoren einen Einfluss auf nahezu alle isolierten Endothelzellen unabhängig von ihrer Erkrankung hatten (Abbildung 20). Anzumerken ist allerdings, dass die Wirkung der Inhibitoren von der Gesamtproliferation mit WM abhängig ist und die Proliferationsrate unter anderem mit der benötigten Zeit bis zum Einfrieren in Zusammenhang steht. Teilweise konnte auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitoren gezeigt werden (siehe Abbildung 20).

Leider konnten aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an Lungengewebe von PH-Patienten keine Endothelzellen mit dieser Diagnose mit in die Arbeit aufgenommen werden. Das bedeutet, dass das initial geplante Versuchsziel zur Verbesserung der Untersuchungsmöglichkeiten dieses speziellen Zelltyps inklusive der in der Literatur beschriebenen Effekte der Inhibitoren sowie auch der Hyperproliferation bei PH nicht überprüft werden konnte [71]. Allerdings konnte die anti-proliferative Funktion der drei Inhibitoren bei anderen Lungenerkrankungen, bei deren Pathogenese die Endothelzellen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, bestätigt und mit gesunden, kommerziell erworbenen Endothelzellen verglichen werden.

4.4.3 Angiogenese

Zur weiteren Charakterisierung der kryokonservierten Endothelzellen wurde ein für diesen Zelltyp klassischer Angiogenese-Test genutzt, bei dem die Fähigkeit zur Bildung von Blutgefäßstrukturen unter *in vitro* Bedingungen untersucht wird. Hierbei wurden die Zellen auf einem speziellen Untergrund (hier Matrigel) ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Die entstandenen Aufnahmen wurden anschließend mit einer für dieses Testsystem entwickelten, web-basierten, kommerziellen KI- (künstliche Intelligenz) Software ausgewertet. Endothelzellen sind im Allgemeinen nach ihrer Isolation und unter *in vitro* Kultivierung in der Lage, sogenannte Schleifen (englisch: loops) und Röhren (englisch: tubes) zu bilden. Diese Eigenschaft sollte nun bei allen hier isolierten Endothelzellen analysiert werden. Zudem war es von Interesse, zu bestimmen, ob es hier Unterschiede zwischen den verschiedenen Erkrankungen gibt und ob die eingesetzten Inhibitoren (siehe Tabelle 2) auch einen Einfluss auf die Schleifenbildungsfähigkeit (deutsch für *tube formation*) der Endothelzellen haben. Hierfür wurden die Bilder hinsichtlich Anzahl der Schleifen pro Bild, durchschnittliche Schleifenfläche, durchschnittliche Rohrlänge, Gesamtlänge des Rohrs und der Anzahl der Verzweigungen ausgewertet. Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen im direkten Vergleich zu Hungermedium (HM), d.h. Basalmedium mit

0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin und Wachstumsmedium (WM), d.h. mit einer Mischung aus unterschiedlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren eingesetzt. Gezeigt werden konnte, dass beinahe keine der Lungenerkrankungen einen Einfluss auf die Angiogenese hat und auch die eingesetzten Inhibitoren nahezu keinen Effekt auf diese Eigenschaft der Endothelzellen zeigen (siehe Abbildung 23). Limitierend ist hier, dass lediglich der 12 Stunden Zeitpunkt mittels der KI-Analyse-Software genauer untersucht wurde. Mögliche, zu einem früheren bzw. späteren Zeitpunkt auftretende Effekte können nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu vermeiden, wäre die kontinuierliche Aufnahme im Zeitverlauf im Rahmen einer detaillierten Studie zu empfehlen. Außerdem wären auch hier die die Ergebnisse von PH-Patienten von großem Interesse, da in der Literatur unter anderem eine pro-angiogenetische Signaltransduktion beschrieben wird [71].

Die drei ausgewählten Inhibitoren Palbociclib, Ruxolitinib und Regorafenib zeigten gemäß ihrem Wirkungsprofil eine eindeutige Hemmung der Proliferation der kryokonservierten Endothelzellen. Sie haben aber keinen Einfluss auf deren Potential, nach dem Auftauen die für Blutgefäßzellen typischen Strukturen (d.h. Schleifen und Röhren) zu bilden. Dies unterstreicht in Kombination mit der vorangegangenen Charakterisierung durch den positiven Nachweis von klassischen Endothelzell-Proteinen und das Fehlen von Markern für glatte Muskelzellen und Fibroblasten erneut, wie erfolgreich das hier etablierte Isolationsprotokoll mit anschließender Kryokonservierung für die Endothelzellen aus der Pulmonalarterie von Patienten mit unterschiedlichen Lungenerkrankungen funktioniert. Auch mehrere Stunden nach der Explantation des Gewebes konnte dieser Zelltyp erfolgreich isoliert, kryokonserviert und damit für weitere Studien verfügbar gemacht werden.

4.5 Limitationen der Arbeit

Trotz der die Hypothesen bestätigenden Ergebnisse sind einige Punkte im Rahmen des Vorhabens kritisch zu beurteilen. Die Limitationen der einzelnen Methoden wurden bereits in den jeweiligen Teilen besprochen, allerdings sind auch einige allgemeine Einschränkungen zu nennen. Die geringe Anzahl der Replikate insgesamt schmälert die Übertragbarkeit auf die große Allgemeinheit, wobei diese letztendlich von den verfügbaren Lungen an den kooperierenden Transplantationsstandorten Wien und Gießen abhängig war. Außerdem lassen sich die Ergebnisse durch die unterschiedlichen Anzahlen an Lungen pro Erkrankung schwer miteinander vergleichen. Weder die Menge an Gewebematerial noch die Erkrankungen waren zu beeinflussen,

weshalb sich die Gruppen der Erkrankungen inhomogen darstellen. Der Vergleich zum gesunden Zellmaterial wurde durch die Endothelzellen von PromoCell sichergestellt. Allerdings konnten keine gesunden Endothelzellen von Donoren aus Wien oder Gießen selbst isoliert werden, da die Pulmonalarterien verständlicherweise mit den Lungenlappen gemeinsam in den Empfänger transplantiert wurden und damit nicht zur Verfügung standen.

Zudem sind die allgemeinen Nachteile von *in vitro* Studien nicht zu vernachlässigen, da diese nur bedingt auf die *in vivo* Situation zu übertragen sind. Zum einen ist eine Zell-Zell-Kommunikation im physiologischen Zellverband vorhanden und auch die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen sollte nicht außer Acht gelassen werden. Die durchgeführten Tests sind demnach alle als Modelle zu verstehen und sollen die *in vivo* Bedingung so gut wie möglich nachahmen, wobei klar wird, dass dieses nicht auf allen Ebenen umsetzbar ist. Insgesamt bilden die in der Arbeit dargestellten, mittels Standard-Verfahren erhaltenen *in vitro* Ergebnisse daher einen kleinen, aber wichtigen Teilaspekt der physiologischen in vivo Situation ab.

4.6 Ausblick

Nachdem die Endothelzellen mittels des hier beschriebenen Protokolls erfolgreich aus Pulmonalarterien isoliert, kultiviert, aufgereinigt, charakterisiert und kryokonserviert werden konnten, können diese nun für weitere Experimente genutzt werden. Die bereits isolierten Zellen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen werden den Kollegen für Versuche zur Verfügung gestellt und können hinsichtlich ihres Verhaltens bei den diversen Erkrankungen weiter untersucht werden. Auf Grundlage dessen gibt es die Möglichkeit, eventuelle Therapien im Zusammenhang mit der Pathogenese der Endothelzellen zu entwickeln, um eine Lebensverlängerung beziehungsweise Verlängerung der Zeit bis zur Transplantationspflichtigkeit bei Erkrankungen wie Lungenfibrose und COPD zu ermöglichen. Zudem wurden nun perfekte Voraussetzungen für die Isolation und Charakterisierung von Endothelzellen aus PH-Lungen geschaffen, wenn sich in Zukunft diese Möglichkeit an einem der beiden Standorte ergibt. Ziel ist es insbesondere hier, neue Therapieoptionen im Zusammenhang mit den bereits beschriebenen und noch gefundenen Verhaltensweisen der Endothelzellen zu etablieren. Diese neuartigen Ansätze sollen dann nicht nur eine Dilatation der Gefäße bewirken, sondern greifen bereits bei der Entstehung der PH ein und wirken somit kausal und nicht nur symptomatisch. Bezüglich der durchgeführten Methoden wäre es daher von großem Interesse, diese nochmals mit Endothelzellen von

Patienten mit PAH durchzuführen. Zudem sind beim Angiogenese-Test, wie bereits beschrieben, auch frühere Zeitpunkte gegebenenfalls durch eine dauerhafte Echtzeit-Aufnahme über einen längeren Zeitraum indiziert. Nach den *in vitro* Tests der hier vorgestellten Inhibitoren im Hinblick auf die Proliferationshemmung der Endothelzellen könnte ein nächster Schritt auch die Testung weiterer vielversprechender Substanzen bzw. Analyse-Verfahren zur Identifizierung neuer Zielstrukturen sein. Zudem wurden von allen Zell-Isolationen Protein-Lysate hergestellt, welche auch für weitere Experimente, wie z.B. eine Peptid-basierte Kinase-Aktivitätsmessung, genutzt werden können. Gleichzeitig wurden RNA-Lysate angefertigt, die in einem nächsten Schritt für eine geplante RNA-Sequenzierung zur Verfügung stehen, um bei den verschiedenen Lungenerkrankungen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene analysieren zu können.

Alles in allem wurde durch die vorliegende Arbeit ein sehr großer Schritt getan, um die Rolle der Endothelzellen bei der Pathogenese diverser Lungenerkrankungen besser verstehen und diese weiter charakterisieren zu können. Dies bildet eine fundierte Grundlage für weitere Experimente und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte. Insbesondere das nun etablierte Protokoll zur Isolation der Endothelzellen bildet einen wichtigen und unverzichtbaren Beitrag für das Team der UGMLC/DZL Biobank und die damit kooperierenden Lungenforschergruppen am Standort Gießen.

5. Zusammenfassung

Der Aufbau der Gefäßwand umfasst drei Schichten: die Tunica adventitia ganz außen, die Tunica media mit Membrana elastica externa und der Muskelschicht sowie die Tunica intima, welche wiederum aus der Membrana elastica interna, dem Stratum subendotheliale und dem Endothel besteht. Die Endothelzellen bilden das Endothel, welches sich als einschichtige Reihe eher flacher Zellen darstellt und damit die innere zum Blut zeigende Zellschicht der Herzhöhlen, Blut- und Lymphgefäßwand bildet. Die Endothelzellen sind wichtige Akteure bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung des funktionellen Kreislaufsystems, der Versorgung mit Sauerstoffen und Nährstoffen, der Regulierung des Blutflusses und beim Transport von Immunzellen, weshalb sie bei Dysfunktionalität eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einiger Lungenerkrankungen einnehmen können.

Aus diesem Grund war es von großem Interesse die Rolle der Endothelzellen bei diversen Lungenerkrankungen besser verstehen und nachvollziehen zu können, um anhand dessen eventuelle neue Therapiemöglichkeiten abzuleiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Protokoll für die Isolation humaner pulmonal-arterieller Endothelzellen von Patienten mit Lungenerkrankungen etabliert. Nach Isolation der Endothelzellen konnte deren Identität mittels Western Blot und Immunfluoreszenz gesichert werden, bevor eine Charakterisierung der Zellen erfolgte. Hinsichtlich der Proliferation waren keine Unterschiede zwischen den isolierten Endothelzellen von Patienten mit Lungenerkrankungen und gesunden Endothelzellen feststellbar und es zeigte sich, dass die Proliferation durch gezielte Inhibition von Zyklin-abhängigen Kinasen mittels den Substanzen Palbociclib, Regorafenib und Ruxolitinib dosisabhängig signifikant limitiert werden kann. Auch im Angiogenesetest konnten keine Differenzen zwischen den selbst isolierten „kranken“ Zellen und den Endothelzellen von gesunden Spendern festgesellt werden. Die eingesetzten Kinase-Inhibitoren hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Angiogenese der Endothelzellen.

Die isolierten Endothelzellen mit Sicherung deren Identität stehen nun den Kollegen zur Verfügung und können für weitere erkrankungsspezifische Versuche genutzt werden. Zudem ist es möglich die verwendeten Kinase-Inhibitoren auch im Zusammenhang mit Endothelzellen von Patienten mit PAH zu überprüfen und auf Grundlage dessen mögliche neue Therapien zu entwickeln.

6. Summary

The structure of the vessel wall comprises three layers: the tunica adventitia on the very outside, the tunica media with the membrana elastica externa and the muscle layer, and the tunica intima, which consists of the membrana elastica interna, the stratum subendotheliale and the endothelium. The endothelial cells form the endothelium, which appears as a single-layered row of rather flat cells and thus forms the inner cell layer of the heart cavities, blood and lymph vessel wall facing the blood. Endothelial cells are important players in the development and maintenance of the functional circulatory system, the supply of oxygen and nutrients, the regulation of blood flow, and the transport of immune cells, and therefore, when dysfunctional, they may play a key role in the pathogenesis of some lung diseases.

For this reason, it was of great interest to understand and comprehend the role of endothelial cells in various lung diseases better in order to derive possible new therapeutic options. In this work, a protocol for the isolation of human pulmonary arterial endothelial cells from patients with lung diseases was established. After isolation of the endothelial cells, their identity was confirmed by Western blot and immunofluorescence before characterization of the cells. With regard to proliferation, no differences were found between the isolated endothelial cells from patients with lung diseases and healthy endothelial cells, and it was shown that proliferation can be significantly limited in a dose-dependent manner by targeted inhibition of cyclin-dependent kinases using the substances palbociclib, regorafenib and ruxolitinib. In the angiogenesis assay, no differences between the self-isolated "diseased" cells and the endothelial cells from healthy donors could be detected. However, the kinase had no significant effect on the angiogenesis of the endothelial cells.

The isolated endothelial cells with confirmed identity are now available to colleagues and can be used for further disease-specific experiments. In addition, it is possible to test the used kinase inhibitors also in the context of endothelial cells from patients with PAH and to develop possible new therapies on this basis.

7. Abkürzungsverzeichnis

ø	Durchmesser
BM	Basalmedium
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	5-bromo-2´-desoxyuridin
CDK	Cyclin-Dependent-Kinase, Zyklin-abhängige Kinase
CO	Cardiac Output, Herzzeitvolumen
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DDR2	Discoidin-Domain-Rezeptor-Tyrosinkinase 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAA	Exogen allergische Alveolitis
ECGS/H	Endothelial Cell Growth Supplement
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
Eph2A	Ephrin-Typ-A-Rezeptor 2
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
G1-, G2-, G0-Phase	Gap1-, Gap2-, Gap0-Phase
GA	Gentamicin-Amphotericin
GM, WM	Growth Medium, Wachstumsmedium
hbFGF	basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human)
HC	Hydrokortison
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF	human Fibroblast Growth Factor
HIF	Hypoxie induzierender Faktor

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HM	Hungermedium
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
JAK	Januskinase
MACS	Magnetic Assisted Cell Sorting
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
M-Phase	Mitose-Phase
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
PAFB	Pulmonal-arterielle Fibroblasten
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PAPW	Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck
PASMC	Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PH	Pulmonale Hypertonie
PDE-4	Phosphodiesterase-4
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PTK5	Protein-Tyrosinkinase 5
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
r	Radius
Rb	Retinoblastom
rhFGF	recombinant human Fibroblast Growth Factor B
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SMC	Smooth Muscle Cells, Glatte Muskelzellen
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TIE 2	TEK-Rezeptor-Tyrosinkinase-2
UGMLC	Lungenzentrum der Universitäten Gießen und Marburg

VEGFR	Vascular Endothelial Cell-Derived Growth Factor Receptor

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer Arterie im Querschnitt und Endothelzellen. 1
Abbildung 2: Pathogenese der PAH (Vaskuläre Obstruktion).....5
Abbildung 3: Pathogenese der COPD.....8
Abbildung 4: Rolle der Endothelzellen bei verschiedenen Lungenerkrankungen. 12
Abbildung 5: Zeitstrahl der präklinischen und klinischen Entwicklung der Kinase-Inhibitoren für die Therapie der PH. 13
Abbildung 6: Aufbau der magnetischen Zellseparation.....28
Abbildung 7: Western-Blot-Verfahren.....31
Abbildung 8: Konditionen des Proliferationstests. 35
Abbildung 9: Aufbau einer Kammer im Angiogenesetest.....36
Abbildung 10: Schema der Endothelzellisolation. 40
Abbildung 11: Pulmonalarterie. 41
Abbildung 12: Vergleich zwischen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten.....43
Abbildung 13: Experimenteller Aufbau. 44
Abbildung 14: Isolierte Endothelzellen. 45
Abbildung 15: Zellisolation und Diagnosen. 46
Abbildung 16: Kryokonservierung der Zellen. 47
Abbildung 17: Magnetische Zellseparation. 48
Abbildung 18: Western Blot.....50
Abbildung 19: Immunfluoreszenz. 52
Abbildung 20: BrdU-Test 48 h nach Behandlung. 55
Abbildung 21: Zeitkinetik der Angiogenese. 58
Abbildung 22: Methode zur Auswertung des Angiogenesetests. 59
Abbildung 23: Angiogenesetest.....61

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der PH. 4
Tabelle 2: Kinase-Inhibitoren im Brdu-Test. 54
Tabelle 3: Induktion und Inhibition der Proliferation im BrdU-Test. 56

10. Literaturverzeichnis

[1] Adcock, I. M. and Caramori, G. 2004. Kinase targets and inhibitors for the treatment of airway inflammatory diseases: the next generation of drugs for severe asthma and COPD? *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 18, 3, 167–180.

[2] Arai, H., Battaglin, F., Wang, J., Lo, J. H., Soni, S., Zhang, W., and Lenz, H.-J. 2019. Molecular insight of regorafenib treatment for colorectal cancer. *Cancer treatment reviews* 81, 101912.

[3] Asosingh, K., Comhair, S., Mavrakis, L., Xu, W., Horton, D., Taylor, I., Tkachenko, S., Hu, B., and Erzurum, S. 2021. Single-cell transcriptomic profile of human pulmonary artery endothelial cells in health and pulmonary arterial hypertension. *Scientific reports* 11, 1, 14714.

[4] Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., and Frings, S. 2021. *Duale Reihe Physiologie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.

[5] Bhagwani, A. R., Hultman, S., Farkas, D., Moncayo, R., Dandamudi, K., Zadu, A. K., Cool, C. D., and Farkas, L. 2019. Endothelial cells are a source of Nestin expression in Pulmonary Arterial Hypertension. *PloS one* 14, 3, e0213890.

[6] Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.-H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J.-P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A.-L., Llovet, J. M., Finn, R. S., LeBerre, M.-A., Baumhauer, A., Meinhardt, G., and Han, G. 2017. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 389, 10064, 56–66.

[7] Comhair, S. A. A., Xu, W., Mavrakis, L., Aldred, M. A., Asosingh, K., and Erzurum, S. C. 2012. Human primary lung endothelial cells in culture. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46, 6, 723–730.

[8] Devos, T., Selleslag, D., Granacher, N., Havelange, V., and Benghiat, F. S. 2022. Updated recommendations on the use of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 27, 1, 23–31.

[9] Dueñas, E. M. de, Gavila-Gregori, J., Olmos-Antón, S., Santaballa-Bertrán, A., Lluch-Hernández, A., Espinal-Domínguez, E. J., Rivero-Silva, M., and Llombart-Cussac, A. 2018. Preclinical and clinical development of palbociclib and future perspectives. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation*

of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 20, 9, 1136–1144.

[10] Evans, C. E., Cober, N. D., Dai, Z., Stewart, D. J., and Zhao, Y.-Y. 2021. Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 58, 3.

[11] Ferrer, E., Peinado, V. I., Díez, M., Carrasco, J. L., Musri, M. M., Martínez, A., Rodríguez-Roisin, R., and Barberà, J. A. 2009. Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. *Respiratory research* 10, 1, 76.

[12] Frump, A. L. and Lahm, T. 2020. Tips for success in pulmonary hypertension treatment: progress in isolating endothelial cells from pulmonary artery catheters. *The European respiratory journal* 55, 3.

[13] Gorelova, A., Berman, M., and Al Ghouleh, I. 2021. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Arterial Hypertension. *Antioxidants & redox signaling* 34, 12, 891–914.

[14] Gredic, M., Blanco, I., Kovacs, G., Helyes, Z., Ferdinandy, P., Olschewski, H., Barberà, J. A., and Weissmann, N. 2021. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *British journal of pharmacology* 178, 1, 132–151.

[15] Grothey, A., van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., Adenis, A., Tabernero, J., Yoshino, T., Lenz, H.-J., Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Cihon, F., Cupit, L., Wagner, A., and Laurent, D. 2013. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 381, 9863, 303–312.

[16] Herold, G. 2025. *Innere Medizin 2026*. De Gruyter.

[17] Hisata, S., Racanelli, A. C., Kermani, P., Schreiner, R., Houghton, S., Palikuqi, B., Kunar, B., Zhou, A., McConn, K., Capili, A., Redmond, D., Nolan, D. J., Ginsberg, M., Ding, B.-S., Martinez, F. J., Scandura, J. M., Cloonan, S. M., Rafii, S., and Choi, A. M. K. 2021. Reversal of emphysema by restoration of pulmonary endothelial cells. *The Journal of experimental medicine* 218, 8.

[18] Hoeper, M. M., Ghofrani, H.-A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H., and Rosenkranz, S. 2017. Pulmonary Hypertension. *Deutsches Arzteblatt international* 114, 5, 73–84.

[19] Horn, F. and Moc, I. 2015. *Biochemie des Menschen*. *Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme ElectronicBook Library. Thieme, Stuttgart.

[20] Huang, P. L. 2003. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Current hypertension reports* 5, 6, 473–480.

[21] Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M. M., Badagliacca, R., Berger, R. M. F., Brida, M., Carlsen, J., Coats, A. J. S., Escribano-Subias, P., Ferrari, P., Ferreira, D. S., Ghofrani, H. A., Giannakoulas, G., Kiely, D. G., Mayer, E., Meszaros, G., Nagavci, B., Olsson, K. M., Pepke-Zaba, J., Quint, J. K., Rådegran, G., Simonneau, G., Sitbon, O., Tonia, T., Toshner, M., Vachiery, J. L., Vonk Noordegraaf, A., Delcroix, M., and Rosenkranz, S. 2022. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European heart journal* 43, 38, 3618–3731.

[22] Kaur, M., Chandel, J., Malik, J., and Naura, A. S. 2022. Particulate matter in COPD pathogenesis: an overview. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society … [et al.]* 71, 7-8, 797–815.

[23] Keenan, C., Nichols, K. E., and Albeituni, S. 2021. Use of the JAK Inhibitor Ruxolitinib in the Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Frontiers in immunology* 12, 614704.

[24] King, T. E., Pardo, A., and Selman, M. 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)* 378, 9807, 1949–1961.

[25] Kreuter, M., Ladner, U. M., Costabel, U., Jonigk, D., and Heussel, C. P. 2021. The Diagnosis and Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Deutsches Arzteblatt international* 118, Forthcoming, 152–162.

[26] Lamb, Y. N. 2021. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs* 81, 5, 575–586.

[27] Lancaster, L. H., Andrade, J. A. de, Zibrak, J. D., Padilla, M. L., Albera, C., Nathan, S. D., Wijsenbeek, M. S., Stauffer, J. L., Kirchgaessler, K.-U., and Costabel, U. 2017. Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 26, 146.

[28] Lapenna, S. and Giordano, A. 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 8, 7, 547–566.

[29] Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S., and Humbert, M. 2017. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology* 14, 10, 603–614.

[30] Le, N.-T. and Abe, J.-I. 2018. MicroRNA 199a and the eNOS (Endothelial NO Synthase)/NO Pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38, 10, 2278–2280.

[31] Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y., and Newman, P. J. 2016. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Current opinion in hematology* 23, 3, 253–259.

[32] Li, Y., Lui, K. O., and Zhou, B. 2018. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nature reviews. Cardiology* 15, 8, 445–456.

[33] Liu, L. and Shi, G.-P. 2012. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res* 94, 1, 3–5.

[34] Low, A. T., Howard, L., Harrison, C., and Tulloh, R. M. R. 2015. Pulmonary arterial hypertension exacerbated by ruxolitinib. *Haematologica* 100, 6, e244-5.

[35] Lv, Q., Wang, J., Xu, C., Huang, X., Ruan, Z., and Dai, Y. 2020. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3β/β-catenin and TGF-β1/Smad2/3 signaling pathways. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 26, 1, 49.

[36] Maher, T. M. and Strek, M. E. 2019. Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: time to treat. *Respiratory research* 20, 1, 205.

[37] Manz, X. D., Albers, H. J., Symersky, P., Aman, J., van der Meer, A. D., Bogaard, H. J., and Szulcek, R. 2020. In Vitro Microfluidic Disease Model to Study Whole Blood-Endothelial Interactions and Blood Clot Dynamics in Real-Time. *Journal of visualized experiments : JoVE,* 159.

[38] McGee, M., Whitehead, N., Martin, J., and Collins, N. 2018. Drug-associated pulmonary arterial hypertension. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 56, 9, 801–809.

[39] Moss, B. J., Ryter, S. W., and Rosas, I. O. 2022. Pathogenic Mechanisms Underlying Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual review of pathology* 17, 515–546.

[40] Müller, A. M., Skrzynski, C., Skipka, G., and Müller, K.-M. 2002. Expression of von Willebrand factor by human pulmonary endothelial cells in vivo. *Respiration; international review of thoracic diseases* 69, 6, 526–533.

[41] Müller, M., Graeve, L., Heinrich, P. C., Petrides, P. E., and Löffler, G., Eds. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin.

[42] Neunhäuserer, D., Patti, A., Niederseer, D., Kaiser, B., Cadamuro, J., Lamprecht, B., Ermolao, A., Studnicka, M., and Niebauer, J. 2021. Systemic Inflammation, Vascular Function, and Endothelial Progenitor Cells after an Exercise Training Intervention in COPD. *The American journal of medicine* 134, 3, e171-e180.

[43] Noble, P. W., Barkauskas, C. E., and Jiang, D. 2012. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *The Journal of clinical investigation* 122, 8, 2756–2762.

[44] O'Brien, C. D., Ji, G., Wang, Y. X., Sun, J., Krymskaya, V. P., Ruberg, F. L., Kotlikoff, M. I., and Albelda, S. M. 2001. PECAM-1 (CD31) engagement activates a phosphoinositide-independent, nonspecific cation channel in endothelial cells.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 15, 7, 1257–1260.

[45] Ostrowska-Podhorodecka, Z. and McCulloch, C. A. 2021. Vimentin regulates the assembly and function of matrix adhesions. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 29, 4, 602–612.

[46] 2010. *Physiologie*. *93 Tabellen*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.

[47] Pullamsetti, S. S., Nayakanti, S., Chelladurai, P., Mamazhakypov, A., Mansouri, S., Savai, R., and Seeger, W. 2020. Cancer and pulmonary hypertension: Learning lessons and real-life interplay. *Global cardiology science & practice* 2020, 1, e202010.

[48] Rassow, J. 2006. *Biochemie*. *50 Tabellen*. Duale Reihe. Georg Thieme, Stuttgart.

[49] Ribatti, D., Tamma, R., Ruggieri, S., Annese, T., and Crivellato, E. 2020. Surface markers: An identity card of endothelial cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 27, 1, e12587.

[50] Richeldi, L., Collard, H. R., and Jones, M. G. 2017. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)* 389, 10082, 1941–1952.

[51] Roskoski, R. 2019. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacological research* 139, 471–488.

[52] Sahay, S., Sisk, M., Nelsen, A., Wu, B., and Ryan, J. 2025. Real-world use of initial combination treatment in the management of pulmonary arterial hypertension. *Therapeutic advances in respiratory disease* 19, 17534666251390070.

[53] Saito, S., Alkhatib, A., Kolls, J. K., Kondoh, Y., and Lasky, J. A. 2019. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Journal of Thoracic Disease* 11, Suppl 14, S1740-S1754.

[54] Sawhney, A., Piatt, R., Rathod, M., Stack, R. N., Whitworth, C. P., and Polacheck, W. J. 2025. Endothelial-smooth muscle microgauges for modeling pulmonary arterial vasoregulation. *Lab on a chip* 25, 23, 6177–6190.

[55] Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., and Grimminger, F. 2011. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology* 8, 8, 443–455.

[56] Song, Q., Chen, P., and Liu, X.-M. 2021. C. *Respiratory research* 22, 1, 39.

[57] Su, Y., Cao, W., Han, Z., and Block, E. R. 2004. Cigarette smoke extract inhibits angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells: the role of calpain. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287, 4, L794-800.

[58] Suzuki, T., Carrier, E. J., Talati, M. H., Rathinasabapathy, A., Chen, X., Nishimura, R., Tada, Y., Tatsumi, K., and West, J. 2018. Isolation and characterization of

endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 314, 1, L118-L126.

[59] Szucs, B., Szucs, C., Petrekanits, M., and Varga, J. T. 2019. Molecular Characteristics and Treatment of Endothelial Dysfunction in Patients with COPD: A Review Article. *International journal of molecular sciences* 20, 18.

[60] Trimm, E. and Red-Horse, K. 2023. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nature reviews. Cardiology* 20, 3, 197–210.

[61] Turner, N. C., Ro, J., André, F., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Loibl, S., Huang Bartlett, C., Zhang, K., Giorgetti, C., Randolph, S., Koehler, M., and Cristofanilli, M. 2015. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine* 373, 3, 209–219.

[62] Uwagboe, I., Adcock, I. M., Lo Bello, F., Caramori, G., and Mumby, S. 2022. New drugs under development for COPD. *Minerva medica* 113, 3, 471–496.

[63] Vachhani, P., Mesa, R., Mascarenhas, J., Rampal, R., Oh, S. T., Vannucchi, A. M., Fox, M. L., Palandri, F., Passamonti, F., Kiladjian, J.-J., Azimi, M., Harrison, C., and Bose, P. 2025. JAK inhibitor selection in challenging scenarios of myelofibrosis: a review. *Haematologica*.

[64] van Beijnum, J. R., Rousch, M., Castermans, K., van der Linden, E., and Griffioen, A. W. 2008. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nature protocols* 3, 6, 1085–1091.

[65] Vannucchi, A. M., Kiladjian, J. J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C. N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., He, S., Jones, M. M., Garrett, W., Li, J., Pirron, U., Habr, D., and Verstovsek, S. 2015. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *The New England journal of medicine* 372, 5, 426–435.

[66] Veeroju, S., Kojonazarov, B., Weiss, A., Ghofrani, H. A., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., Novoyatleva, T., and Schermuly, R. T. 2021. Therapeutic Potential of Regorafenib-A Multikinase Inhibitor in Pulmonary Hypertension. *International journal of molecular sciences* 22, 3.

[67] Vogelmeier, C. F., Román-Rodríguez, M., Singh, D., Han, M. K., Rodríguez-Roisin, R., and Ferguson, G. T. 2020. Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respiratory medicine* 166, 105938.

[68] Weiss, A., Neubauer, M. C., Yerabolu, D., Kojonazarov, B., Schlueter, B. C., Neubert, L., Jonigk, D., Baal, N., Ruppert, C., Dorfmuller, P., Pullamsetti, S. S., Weissmann, N., Ghofrani, H.-A., Grimminger, F., Seeger, W., and Schermuly, R. T.

2019. Targeting cyclin-dependent kinases for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nature communications* 10, 1, 2204.

[69] Wittig, C., Akmeriç, E. B., Michalick, L., König, J. M., Kuebler, W. M., Gerhardt, H., and Szulcek, R. 2025. Caspase-6 Is a Non-Apoptotic Effector of Shear-Induced Morphological Adaptation in Pulmonary Artery Endothelial Cells In Vitro. *Cells* 14, 21.

[70] Wollin, L., Distler, J. H. W., Redente, E. F., Riches, D. W. H., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Maher, T. M., and Kolb, M. 2019. Potential of nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *The European respiratory journal* 54, 3.

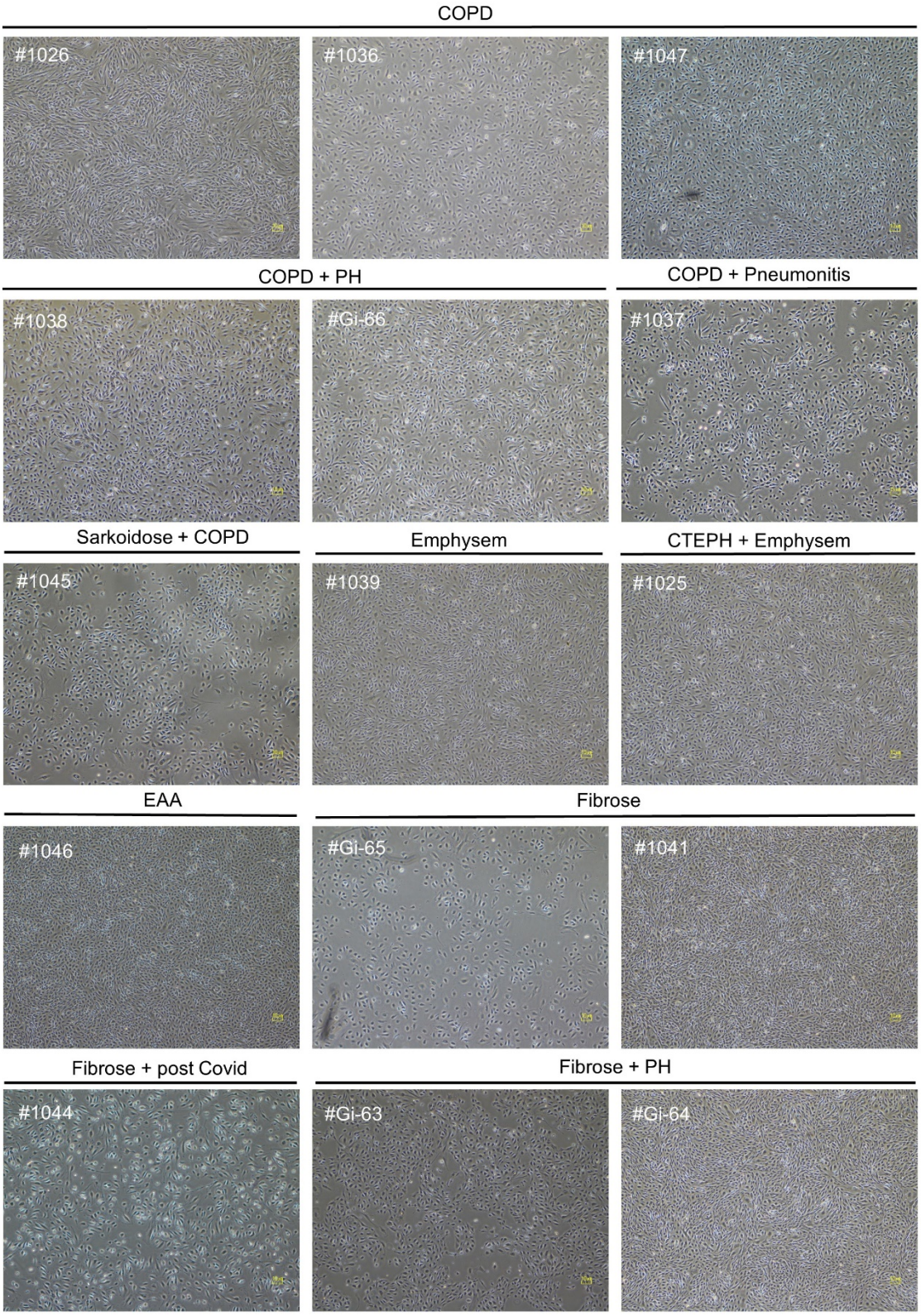
[71] Xu, W. and Erzurum, S. C. 2011. Endothelial cell energy metabolism, proliferation, and apoptosis in pulmonary hypertension. *Comprehensive Physiology* 1, 1, 357–372.

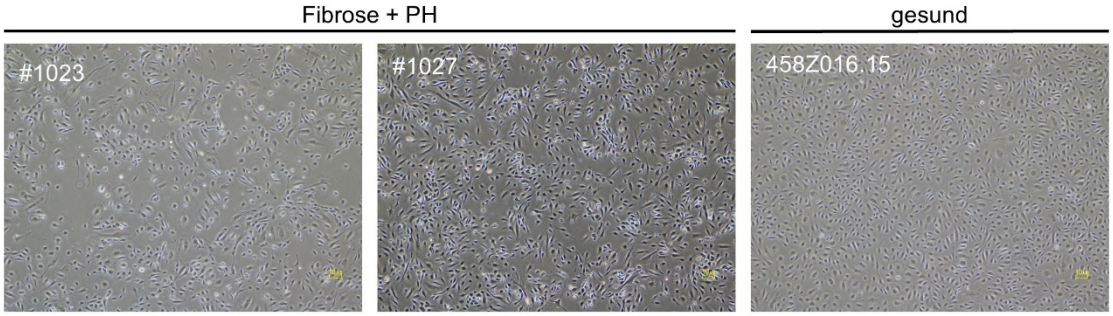
[72] Yerabolu, D., Weiss, A., Kojonazarov, B., Boehm, M., Schlueter, B. C., Ruppert, C., Günther, A., Jonigk, D., Grimminger, F., Ghofrani, H.-A., Seeger, W., Weissmann, N., and Schermuly, R. T. 2021. Targeting Jak-Stat Signaling in Experimental Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 64, 1, 100–114.

[73] Yuan, S.-M. 2015. α-Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Brazilian journal of cardiovascular surgery* 30, 6, 644–649.

[74] Zhang, S., Zhang, R., Xia, Y., and Cao, D. 2025. Safety assessment of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors and comparison of time to adverse events. *PloS one* 20, 11, e0336767.

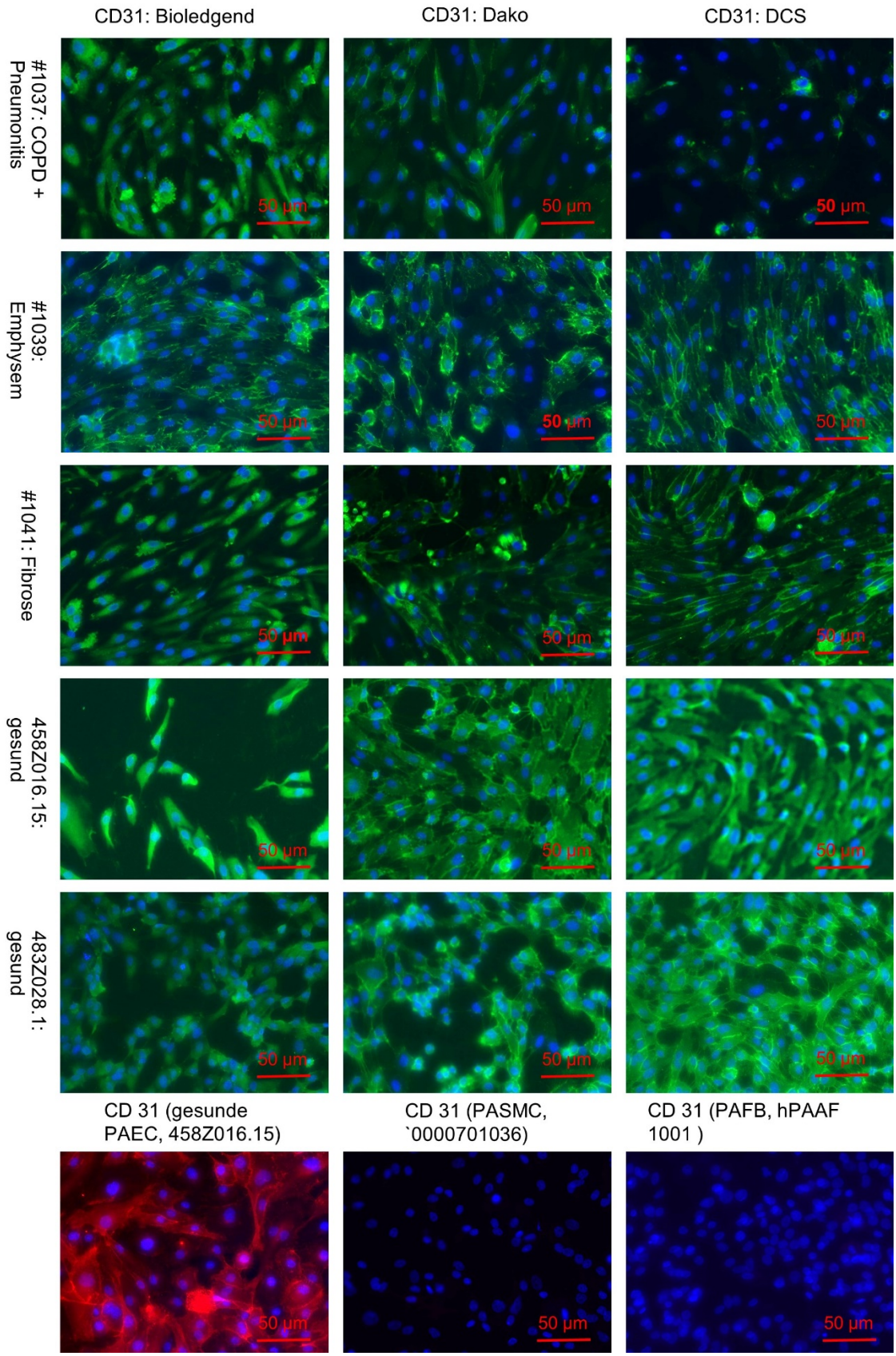
11. Anhang


COPD
#1026
#1036
#1047
COPD + PH
COPD + Pneumonitis
#1038
#Gi-66
#1037
Sarkoidose + COPD
Emphysem
CTEPH + Emphysem
#1045
#1039
#1025
EAA
Fibrose
#1046
#Gi-65
#1041
Fibrose + post Covid
Fibrose + PH
#1044
#Gi-63
#Gi-64



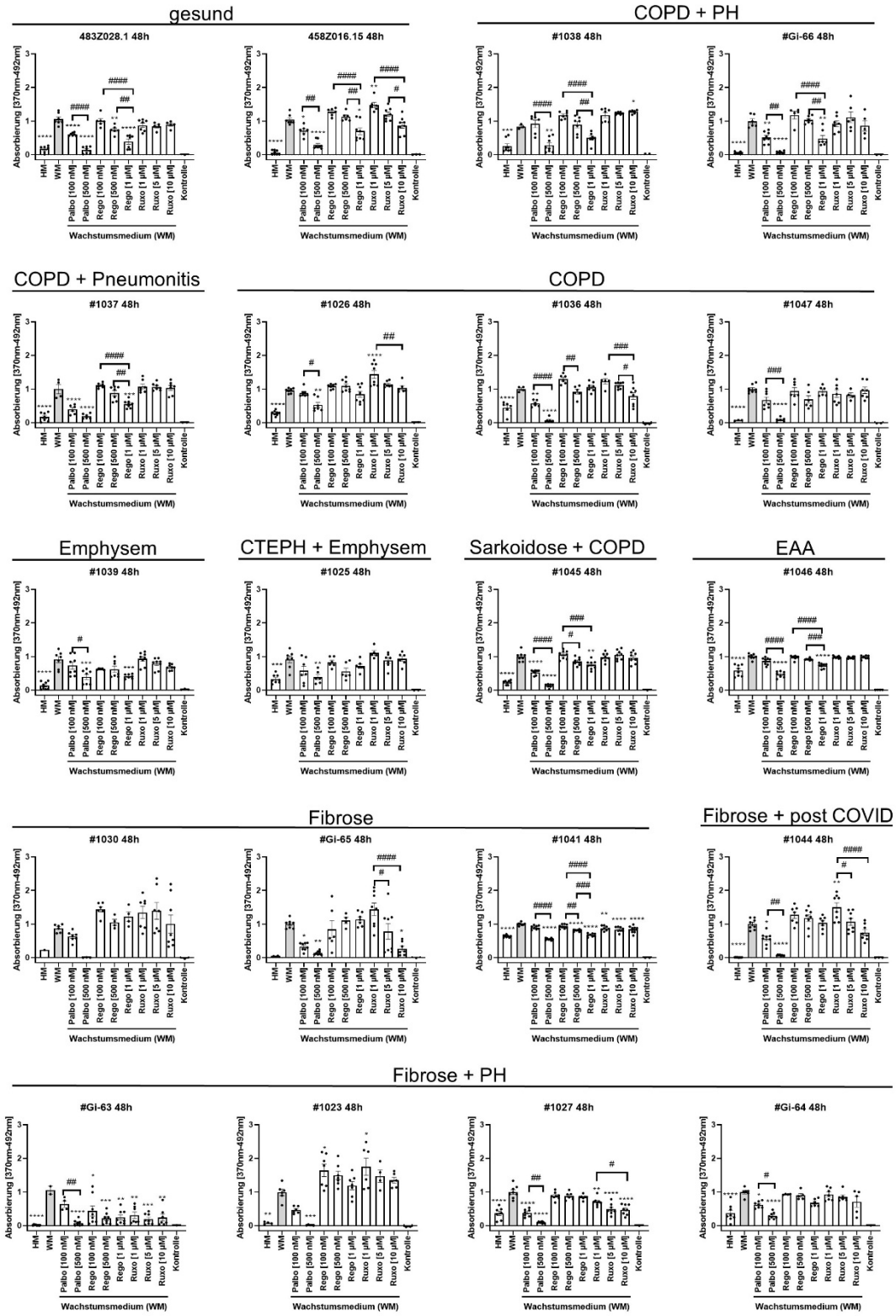
Anhang 1: Abbildungen der isolierten Endothelzellen.

Zu sehen sind die Abbildungen der isolierten Endothelzellen (#1030 fehlt). Diese dienen zum einen als Nachweis der erfolgreichen Endothelzellisolation und zum anderen als zusätzliche Bestätigung der „Endothelzell-Identität“ anhand der Morphologie der Zellen.



Anhang 2: Immunfluoreszenz.

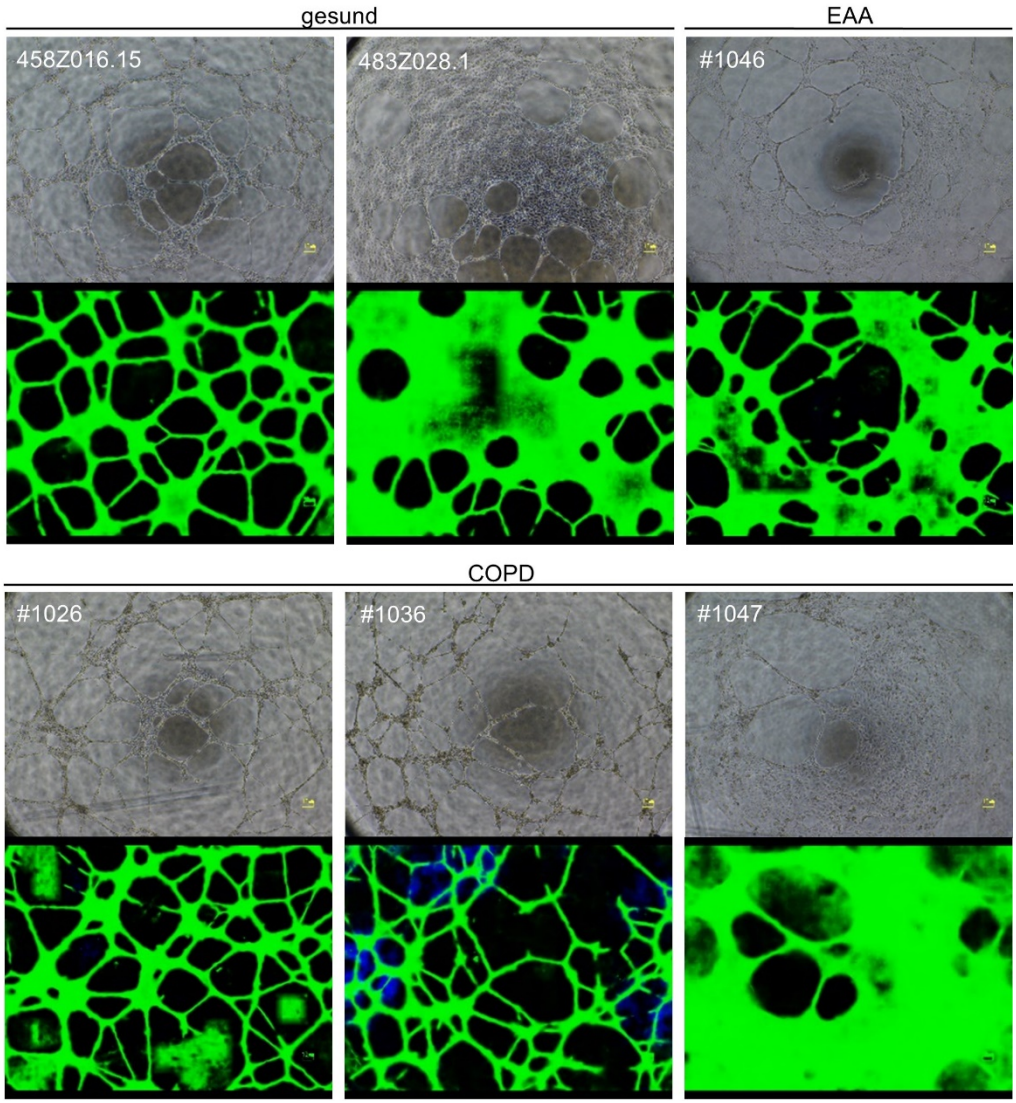
Zu sehen ist eine beispielhafte Auswahl an Fluoreszenzbildern von PAEC von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen. CD31 wurde als endothelzellspezifischer Marker gewählt und von verschiedenen Firmen (BioLegend, Dako, DCS) vergleichend eingesetzt. Deutlich wird, dass sowohl die kommerziell erworbenen Endothelzellen von gesunden Patienten als auch die selbst isolierten PAEC von Patienten mit Lungenerkrankungen den Marker CD31 exprimieren. Dies ist durch die grüne beziehungsweise rot fluoreszierende Farbe erkennbar. PASMC und PAFB wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Die Abbildungen dieser Zelltypen zeigen eindeutig, dass diese CD31 nicht exprimieren, was sie von den Endothelzellen abgrenzt und zur wiederholten Bestätigung der „Endothelzell-Identität“ dient.

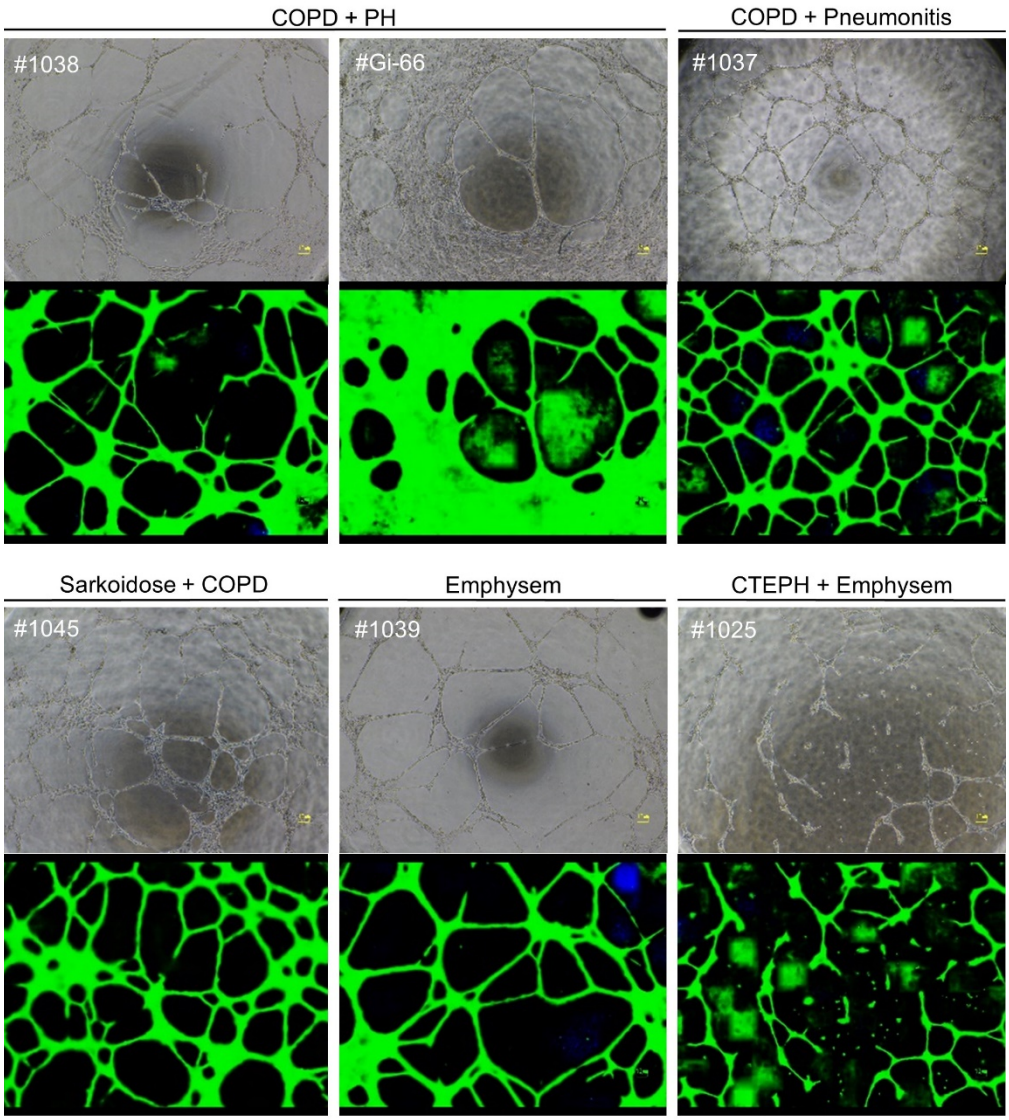


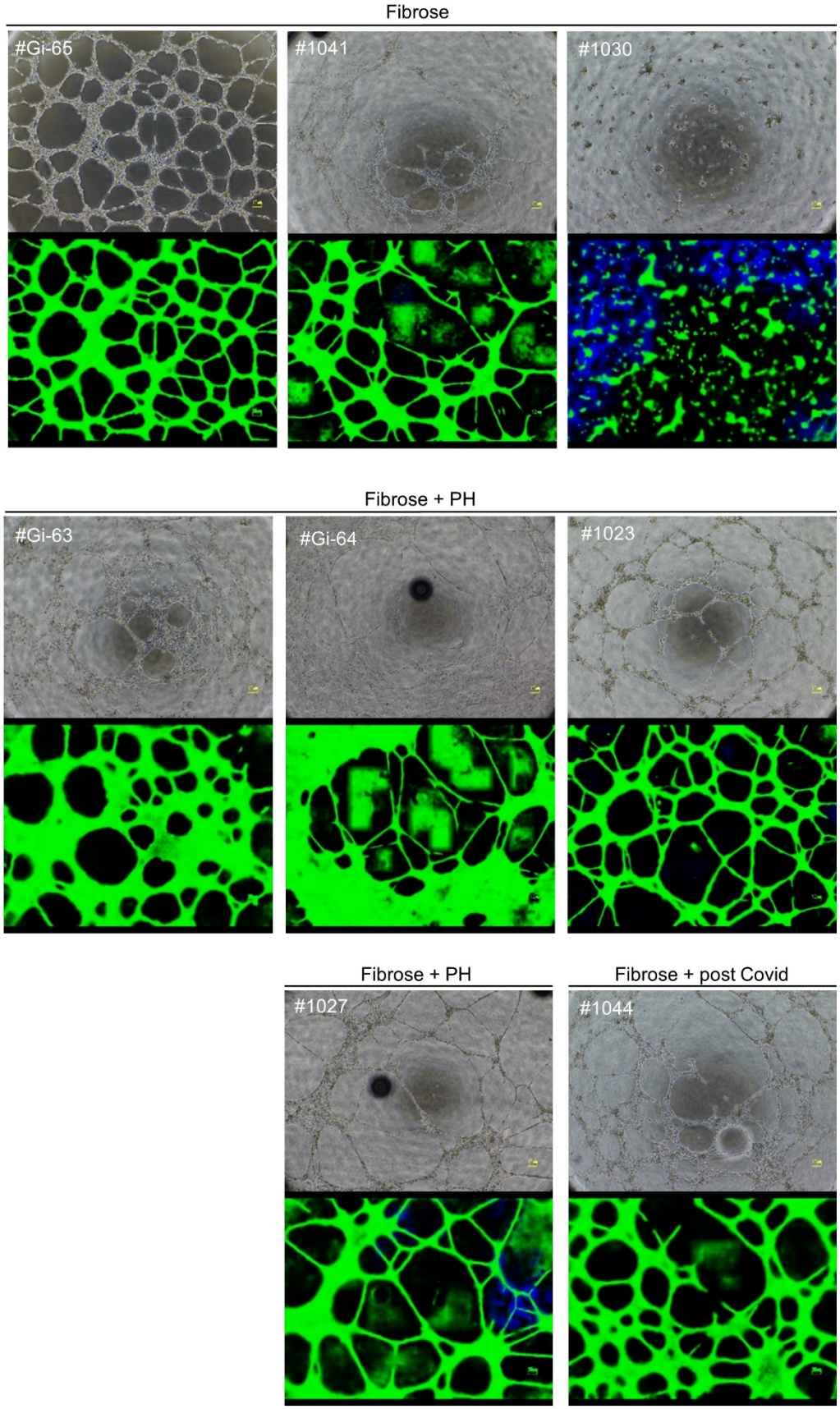
Anhang 3: BrdU-Test 48 h nach Behandlung.

Die BrdU-Messungen von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 48 h Zeitpunkt. Die Kontrolle entspricht einer Hintergrundkontrolle, was bedeutet, dass die Zellen nicht mit BrdU markiert wurden. Zudem wurde eine Leerkontrolle ohne Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). HM

entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Die Absorptionswerte der relativen Absorption [370 nm-492 nm] sind in der y-Achse angegeben. Daten (n = 8) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen, die jeweils in Quadruplikaten gemessen wurden, sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ stellen die konzentrationsabhängigen Signifikanzen innerhalb eines Inhibitors dar.

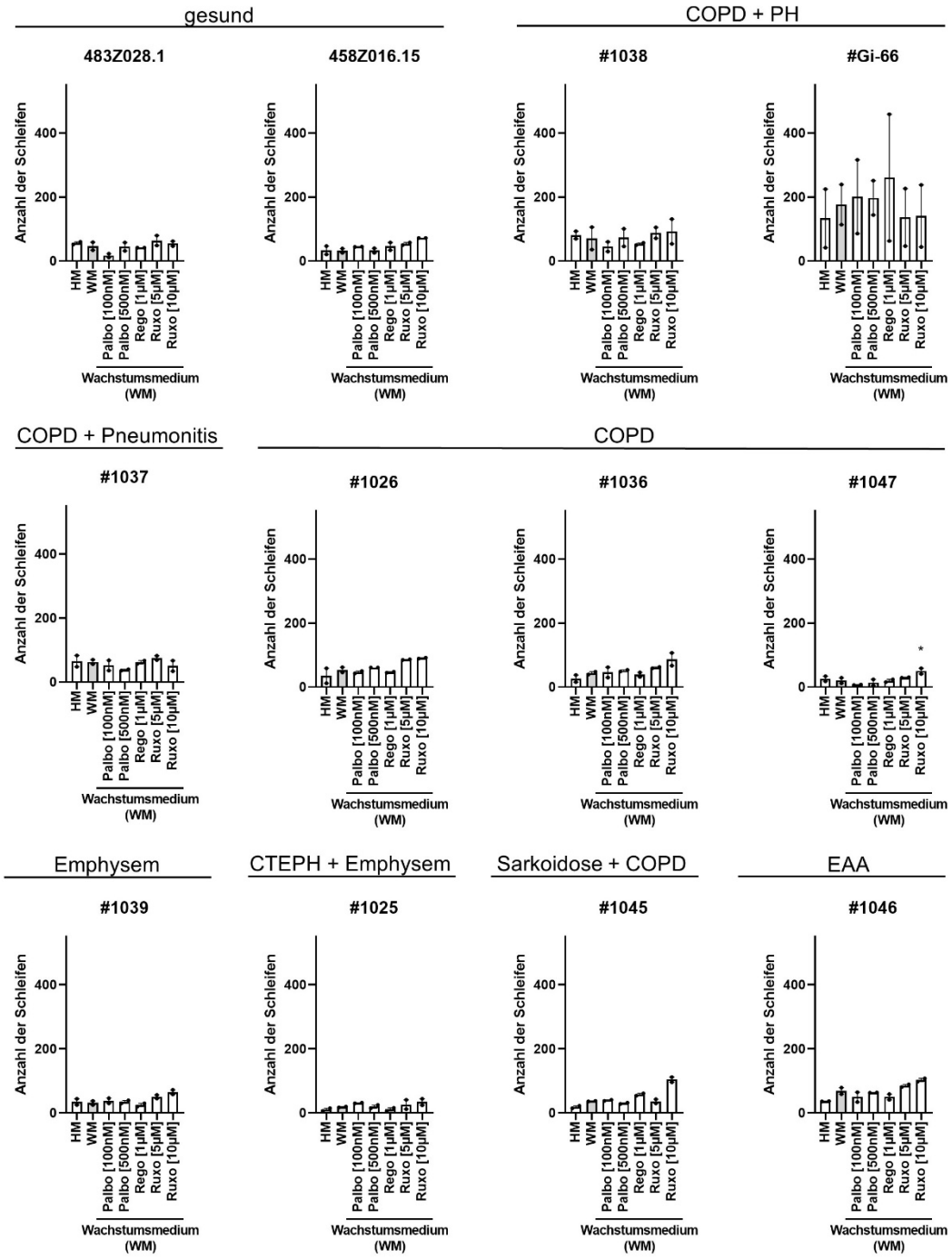

gesund
EAA
458Z016.15
483Z028.1
#1046
COPD
#1026
#1036
#1047

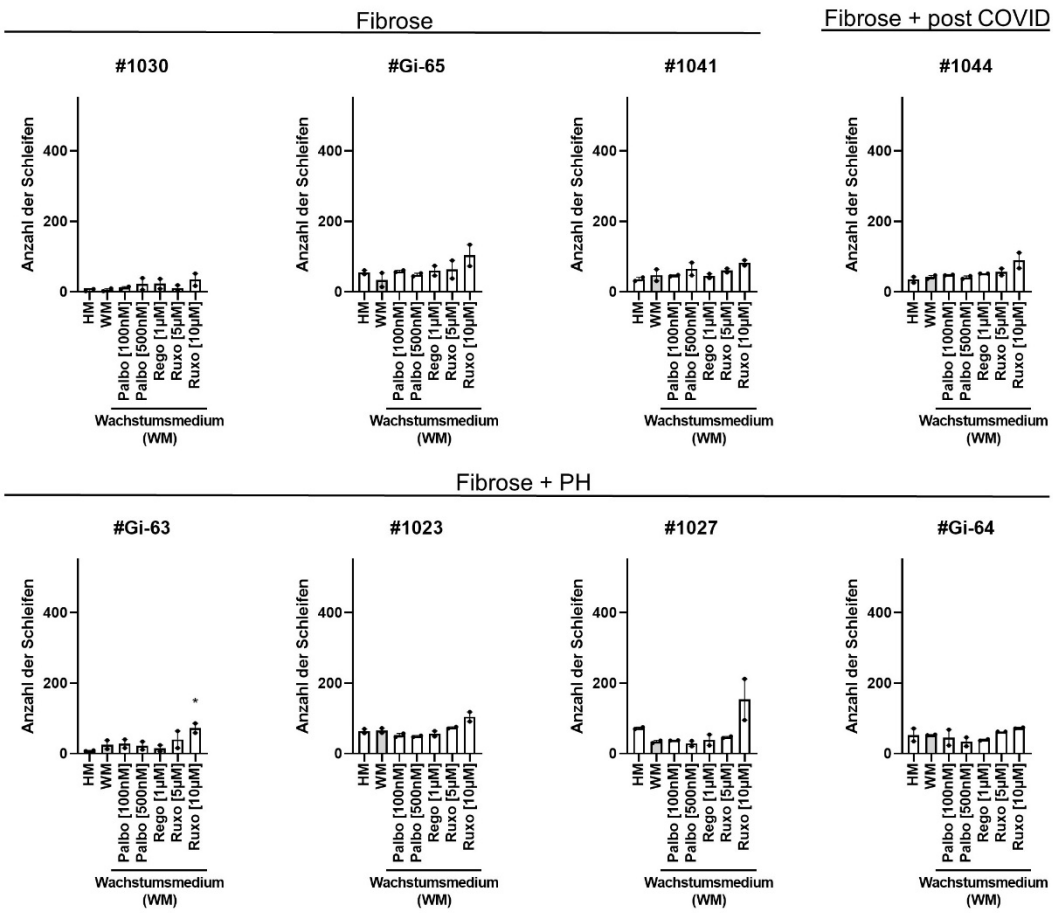

COPD + PH
COPD + Pneumonitis
#1038
#Gi-66
#1037
Sarkoidose + COPD
Emphysem
CTEPH + Emphysem
#1045
#1039
#1025



Anhang 4: Abbildungen aller Lungen im Angiogenesetest.

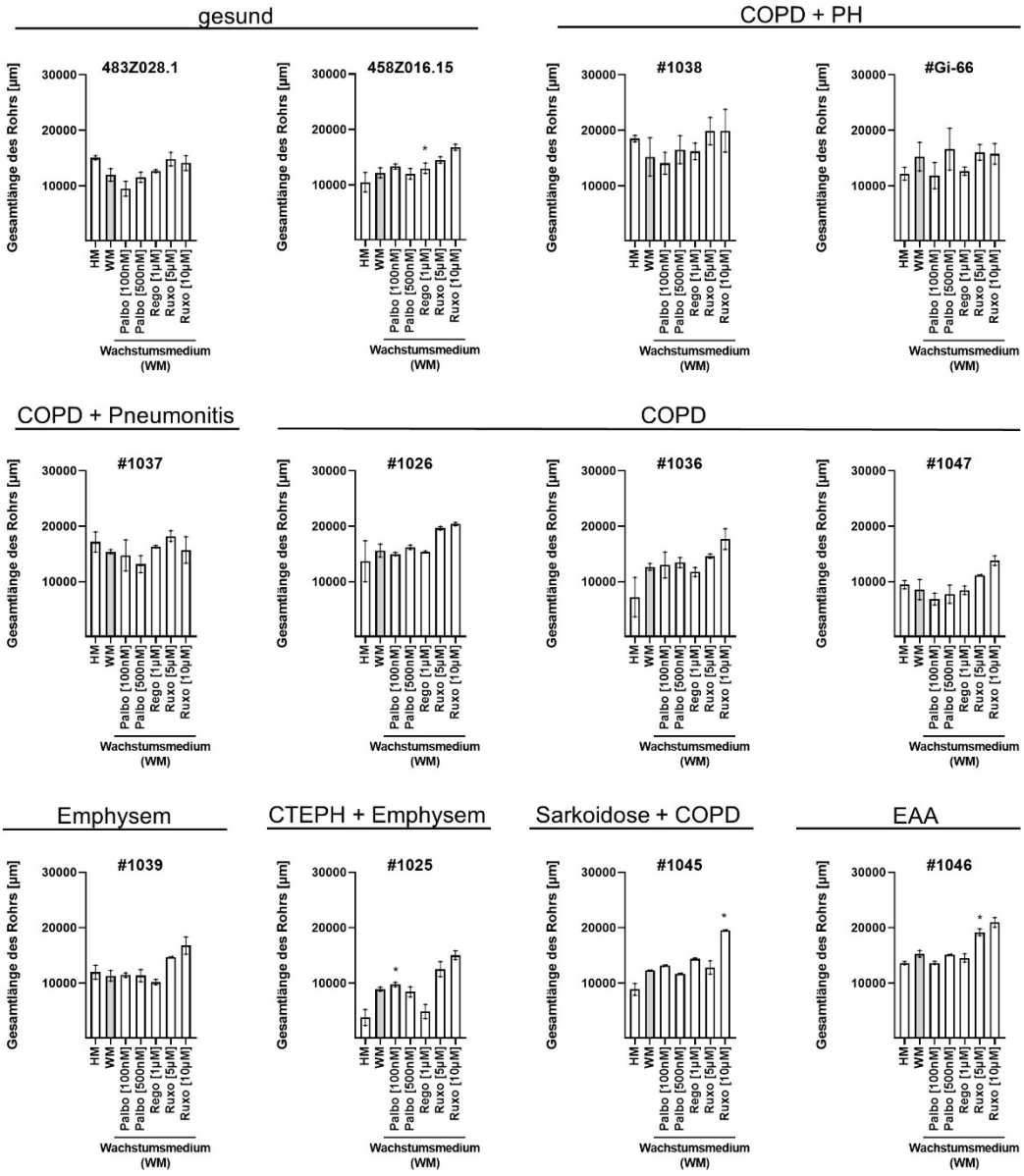
Die Abbildungen zeigen die in die FastTrack AI Software hochgeladenen Bilder aller isolierten PAEC im Angiogenesetest zum 12 h Zeitpunkt, Außerdem ist das von der Software kontrastierte Bild zu sehen, welches für die bessere Auswertung durch die künstliche Intelligenz genutzt wird. Von der Software ausgewertet werden die Parameter Anzahl der Schleifen, durchschnittlichen Schleifenfläche, Gesamtlänge des Rohrs, durchschnittliche Länge des Rohrs und Anzahl der Verzweigungen.

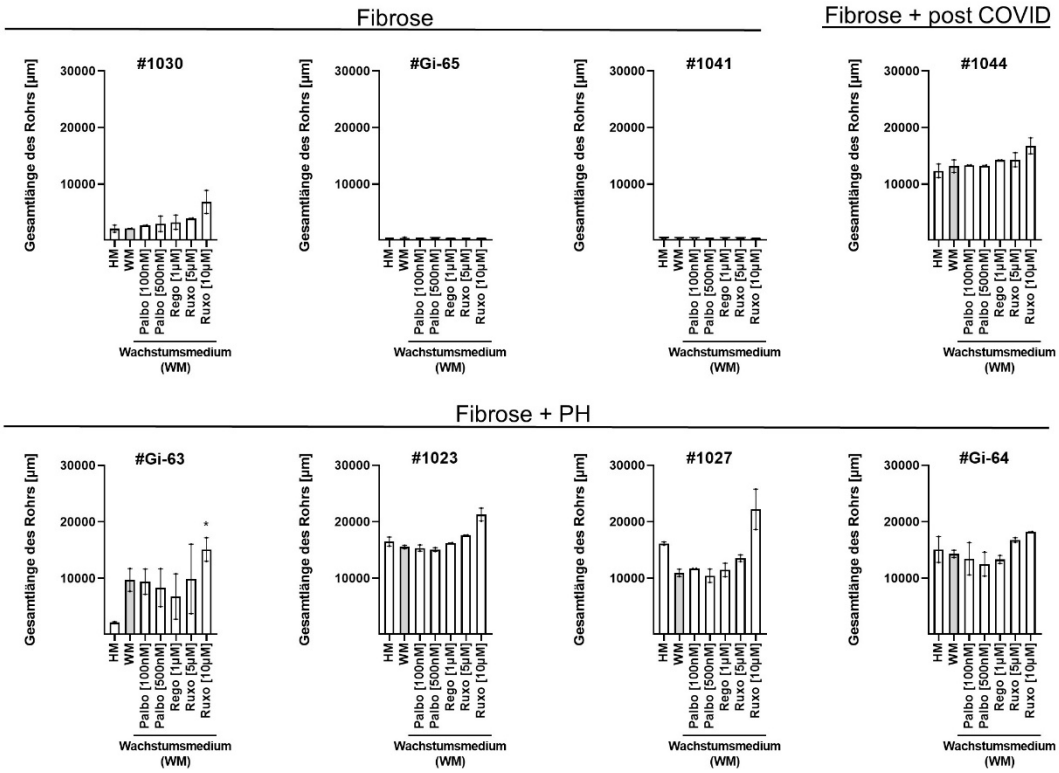

gesund
COPD + PH
483Z028.1
458Z016.15
#1038
#Gi-66
COPD + Pneumonitis
COPD
#1037
#1026
#1036
#1047
Emphysem
CTEPH + Emphysem
Sarkoidose + COPD
EAA
#1039
#1025
#1045
#1046
Anzahl der Schleifen
0
200
400
HM
WM
Palbo [100nM]
Palbo [500nM]
Rego [1µM]
Ruxo [5µM]
Ruxo [10µM]
Wachstumsmedium (WM)
*



Anhang 5: Anzahl der Schleifen.

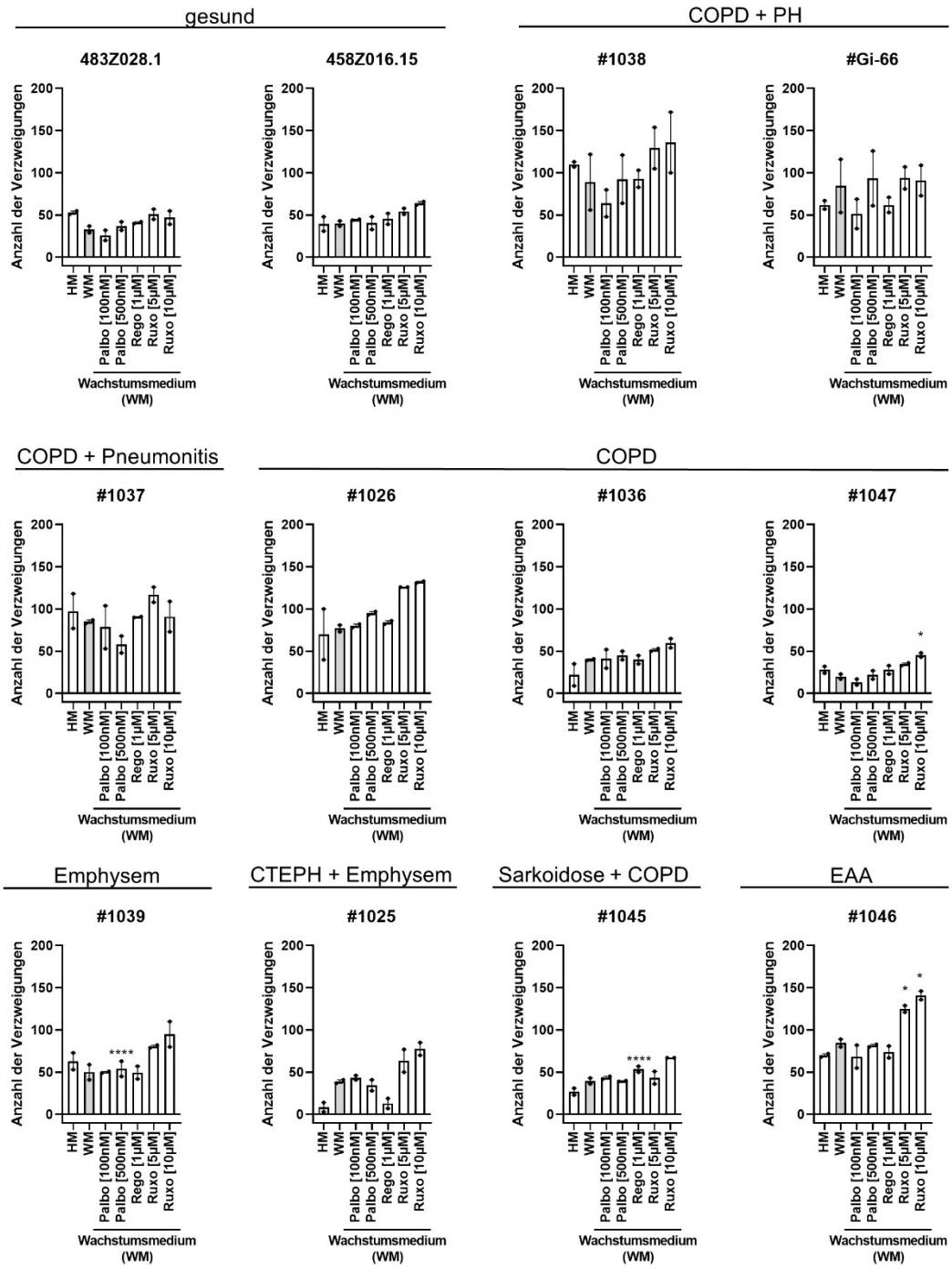
Dargestellt ist die Anzahlen der Schleifen im Angiogenesetest von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.

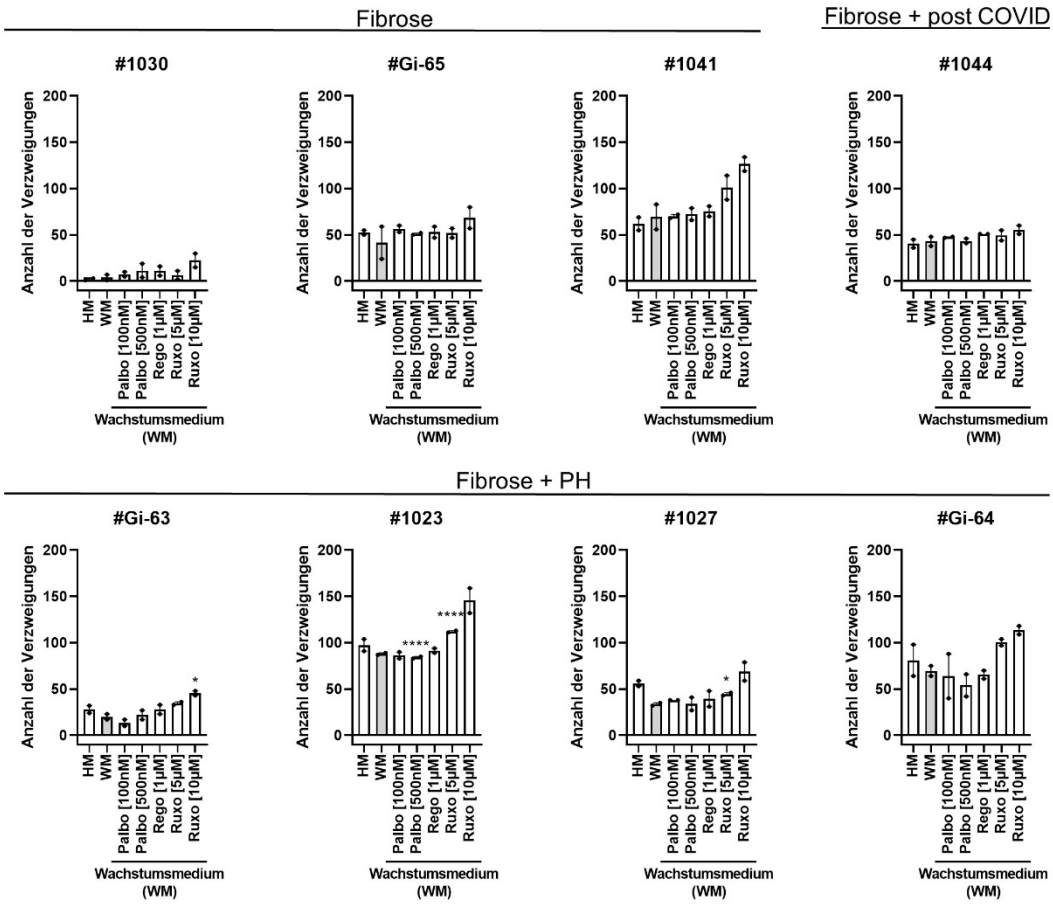

gesund
COPD + PH
COPD + Pneumonitis
COPD
Emphysem
CTEPH + Emphysem
Sarkoidose + COPD
EAA
483Z028.1
458Z016.15
#1038
#Gi-66
#1037
#1026
#1036
#1047
#1039
#1025
#1045
#1046
Gesamtlänge des Rohrs [µm]
30000
20000
10000
HM
WM
Palbo [100nM]
Palbo [500nM]
Rego [1µM]
Ruxo [5µM]
Ruxo [10µM]
Wachstumsmedium (WM)



Anhang 6: Gesamtlänge des Rohrs [µm].

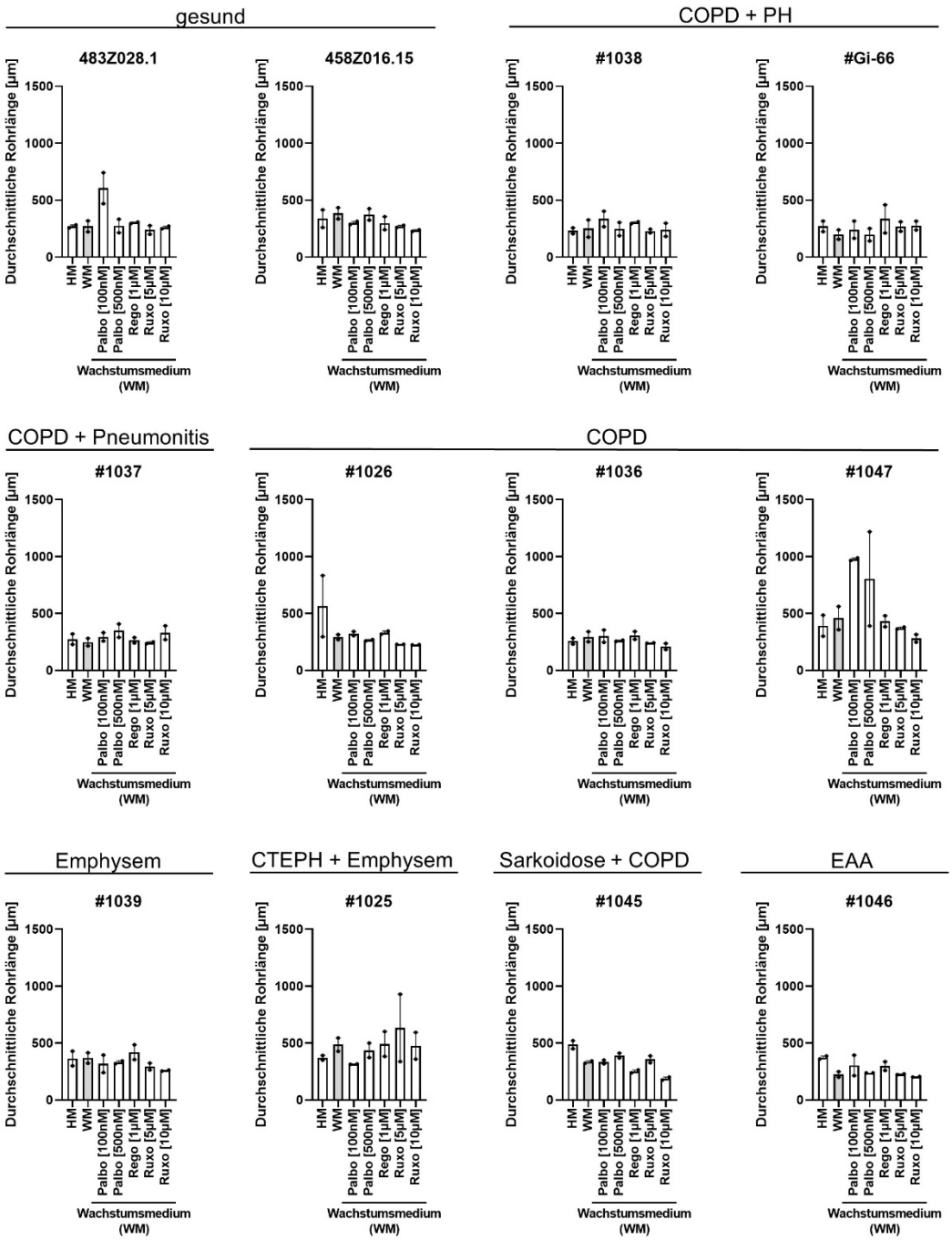
Dargestellt ist die Gesamtlänge des Rohrs [µm] im Angiogenesetest von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.

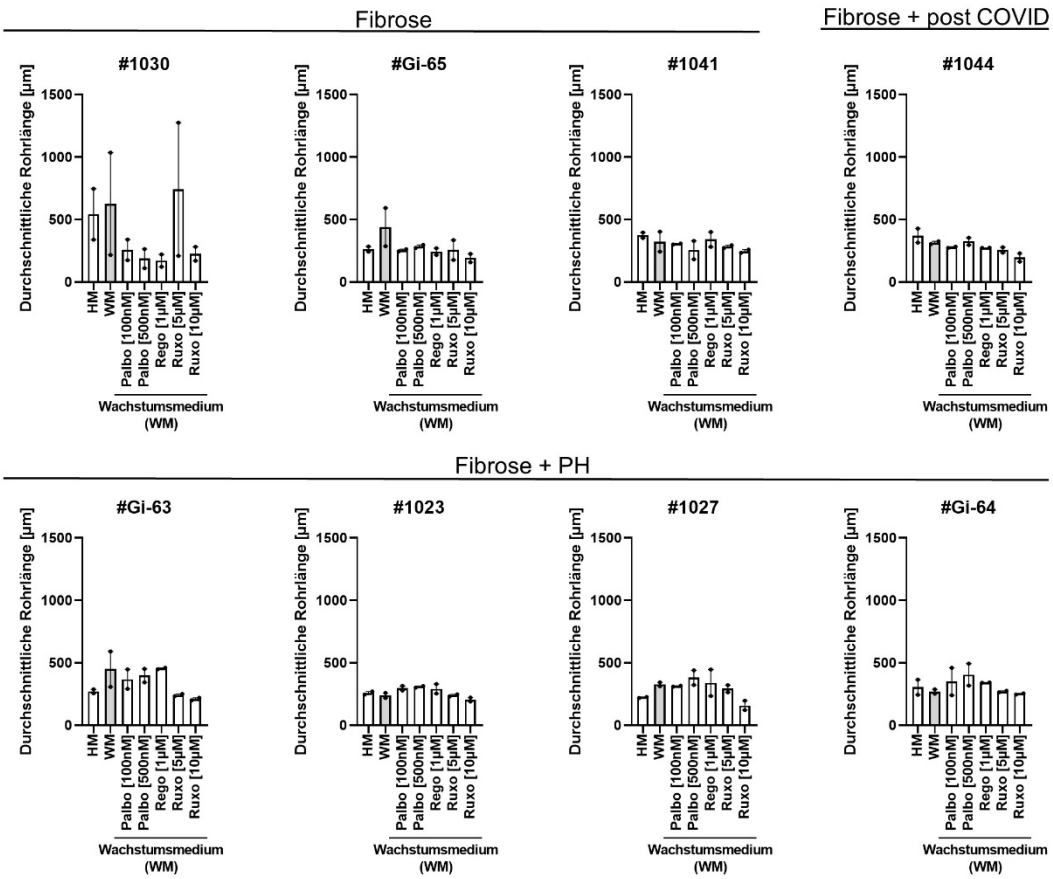

gesund
COPD + PH
483Z028.1
458Z016.15
#1038
#Gi-66
COPD + Pneumonitis
COPD
#1037
#1026
#1036
#1047
Emphysem
CTEPH + Emphysem
Sarkoidose + COPD
EAA
#1039
#1025
#1045
#1046
Anzahl der Verzweigungen
HM
WM
Palbo [100nM]
Palbo [500nM]
Rego [1µM]
Ruxo [5µM]
Ruxo [10µM]
Wachstumsmedium (WM)



Anhang 7: Anzahl der Verzweigungen.

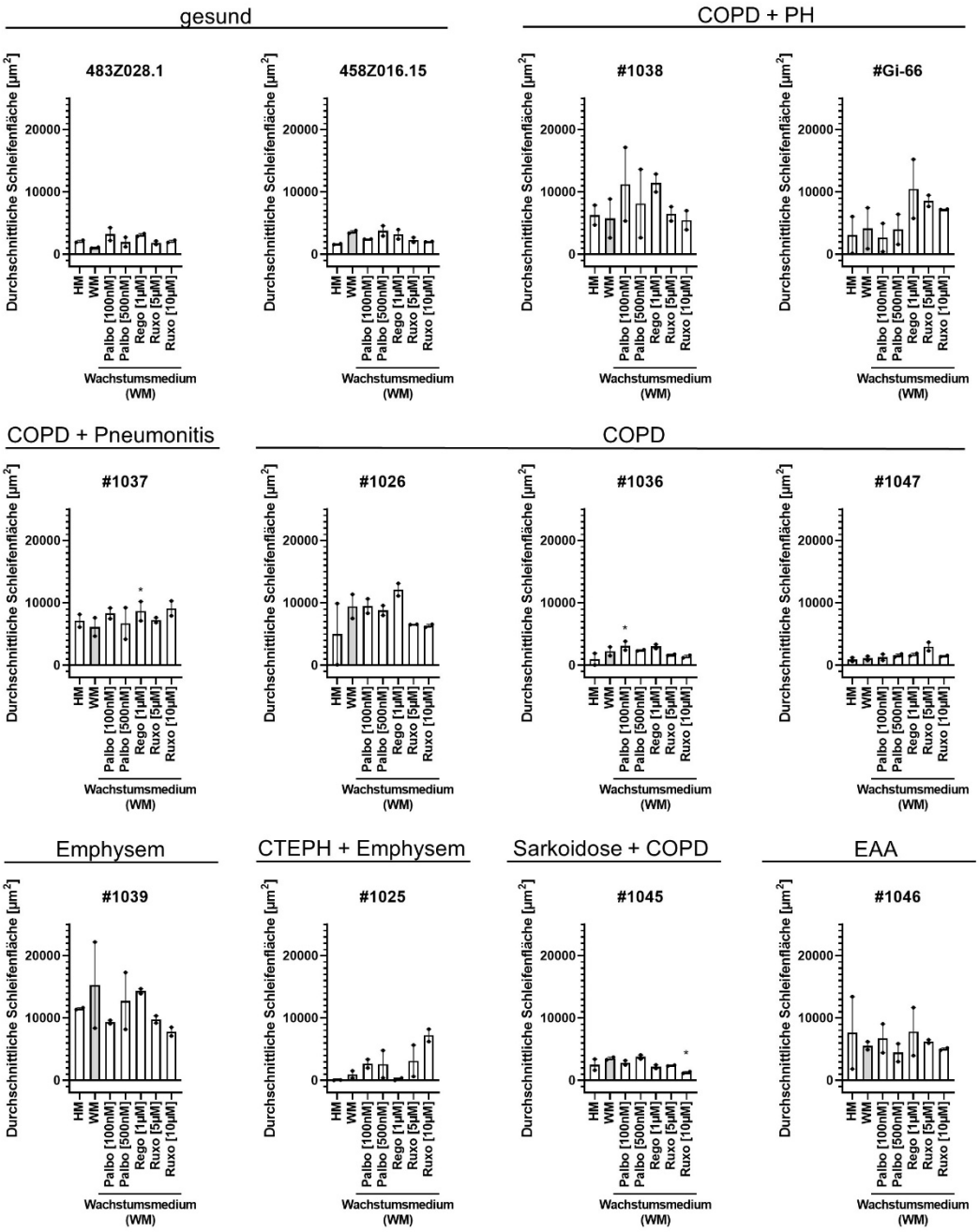
Dargestellt ist die Anzahl der Verzweigungen im Angiogenesetest von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.

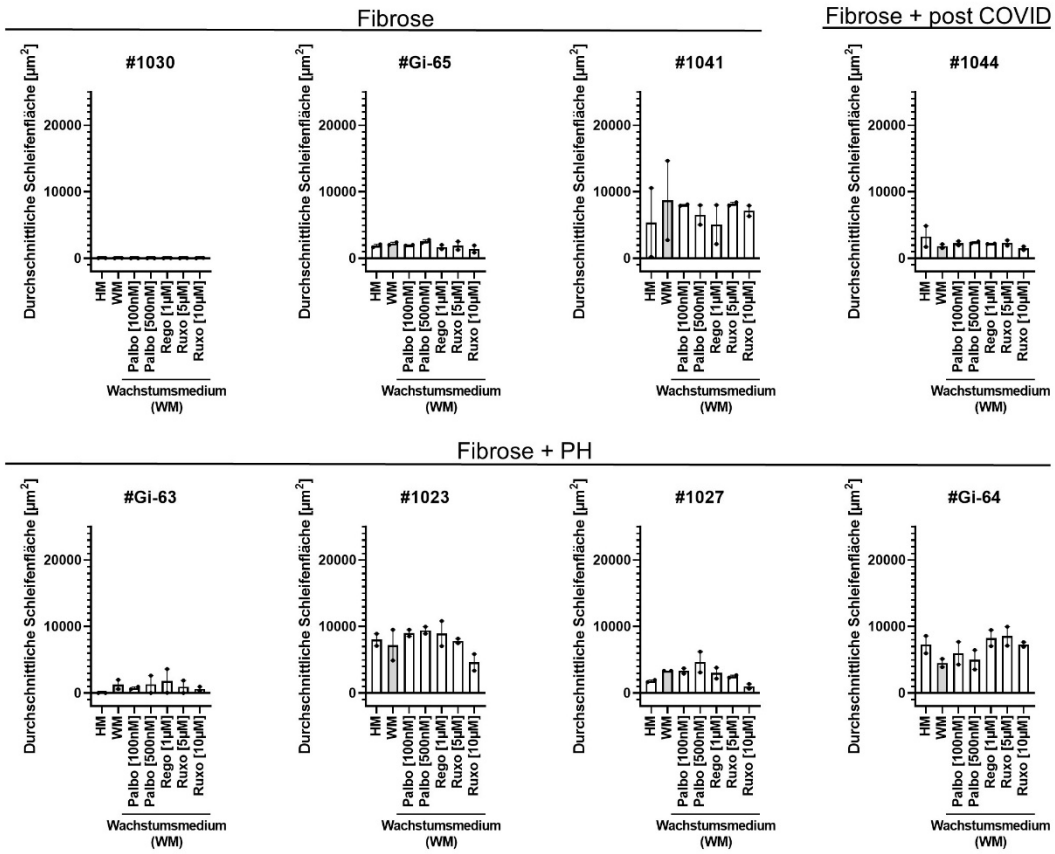

gesund
COPD + PH
483Z028.1
458Z016.15
#1038
#Gi-66
Durchschnittliche Rohrlänge [µm]
1500
1000
500
0
HM
WM
Palbo [100nM]
Palbo [500nM]
Rego [1µM]
Ruxo [5µM]
Ruxo [10µM]
Wachstumsmedium (WM)
COPD + Pneumonitis
COPD
#1037
#1026
#1036
#1047
Emphysem
CTEPH + Emphysem
Sarkoidose + COPD
EAA
#1039
#1025
#1045
#1046



Anhang 8: Durchschnittliche Rohrlänge [µm].

Dargestellt ist die durchschnittliche Rohrlänge [µm] im Angiogenesetest von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.


gesund
COPD + PH
483Z028.1
458Z016.15
#1038
#Gi-66
Durchschnittliche Schleifenfläche [µm²]
20000
10000
0
HM
WM
Palbo [100nM]
Palbo [500nM]
Rego [1µM]
Ruxo [5µM]
Ruxo [10µM]
Wachstumsmedium (WM)
COPD + Pneumonitis
COPD
#1037
#1026
#1036
#1047
Emphysem
CTEPH + Emphysem
Sarkoidose + COPD
EAA
#1039
#1025
#1045
#1046



Anhang 9: Durchschnittliche Schleifenfläche [µm²].

Dargestellt ist die durchschnittliche Schleifenfläche [µm²] im Angiogenesetest von den Endothelzellen der zwei gesunden Lungen und der 18 erkrankten Lungen zum 12 h Zeitpunkt. HM entspricht dem Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Dem angegebenen Wachstumsmedium (WM) sind verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Daten (n = 2) aus zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen sind hier als Mittelwert ±SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit dem Tukey-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Diese P-Werte wurden nur im Vergleich zum Wachstumsmedium berechnet.

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Abbildungen der isolierten Endothelzellen. 88
Anhang 2: Immunfluoreszenz 89
Anhang 3: BrdU-Test 48 h nach Behandlung. 91
Anhang 4: Abbildungen aller Lungen im Angiogenesetest. 95
Anhang 5: Anzahl der Schleifen. 98
Anhang 6: Gesamtlänge des Rohrs [µm]. 100
Anhang 7: Anzahl der Verzweigungen. 102
Anhang 8: Durchschnittliche Rohrlänge [µm]. 104
Anhang 9: Durchschnittliche Schleifenfläche [µm²]. 106

12. Publikationsverzeichnis

Kongressbeiträge

Die Arbeit wurde als Poster auf folgenden Veranstaltungen präsentiert:

- JLU Career Retreat (10.10.2023)
- Science Day des Fachbereich 11 der JLU Gießen (17.11.2023)

Die Arbeit wurde als Vortrag auf folgender Veranstaltung präsentiert:

- Im Rahmen des JLU Trainee Programms (16.11.2022)

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum Unterschrift

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Personen entgegenbringen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly, meinem Doktorvater, danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die sich daraus ergebende Möglichkeit der Doktorarbeit, die fachkundige Betreuung meiner Arbeit sowie die Bereitstellung der Materialien und die finanzielle Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Weiß für die hervorragende Betreuung, Projektplanung, das Beibringen molekularbiologischer Methoden und ihren Rat bei allen Fragen und Problemen. Die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit sowie ihre konstruktiven und differenzierten Anmerkungen haben mich zur kritischen Auseinandersetzung mit der Themenkomplex und dem wissenschaftlichen Arbeiten bewegt.

Zudem danke ich Frau Julia Baldauf, die mir allzeit zur Seite stand und in jeder Situation eine Lösung fand, für ihre große Unterstützung und Geduld beim Erlernen und Durchführen verschiedenster Labortechniken sowie die vielen großartigen und motivierenden Gespräche.

Als sehr bereichernd und interessant empfand ich auch den Austausch mit allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und deren Anregungen im Rahmen des Labmeetings.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herr Dr. Clemens Ruppert und dem Team der Biobank für die außerordentlich gute Kooperation und sich daraus ergebende Möglichkeit der Endothelzellisolation aus Pulmonalarterien, bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich zudem den Kollegen der Lungentransplantationsstandorte Gießen, Wien und Hannover.

Für die finanzielle Unterstützung und wissenschaftstheoretische Ausbildung möchte ich mich beim JLU-Trainee Programm unter der Leitung von Prof. Dr. Till Acker und Frau Prof. Dr. Katrin Lips als Seminarleitung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, die mir jederzeit den Rücken freigehalten hat, für die Ermutigung und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation, meinem Freund Sören sowie meinen Freunden für den moralischen Beistand und menschlichen Halt.