

Der Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen

vorgelegt von

Kevin Lo

aus Rheinfelden (Baden)

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Excellence Cluster “Cardio-Pulmonary Institute (CPI)”
und Medizinische Klinik II

Gutachterin: Prof. Dr. med. Natascha Sommer, PhD

Gutachterin: PD Dr. med. Birgit Bassaly

Tag der Disputation: 18.01.2024

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 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 oder ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/Datum Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 KLASSEFİKATION DER PULMONALEN HYPERTONIE (PH)	7
1.2 MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER PH	10
1.3 HYPOXIE-INDUZIERT E PULMONALE HYPERTONIE.....	11
1.3.1 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF).....	13
1.3.2 Interleukin-6 und Tumor-Necrosis-Factor α	14
1.4 RESOLVIN E1	15
1.4.1 Synthese und Funktion von Resolvin E1.....	15
1.4.2 Lokalisation und Wirkung des Chemokin-like-Rezeptors 1(ChemR23).....	17
1.4.3 Lokalisation und Wirkung des Leukotrien-B4-Rezeptors 1(BLT1-Rezeptor)..	19
1.5 CHEMR23 UND BLT1 IN DER PH	20
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2. MATERIALIEN.....	23
2.1 GERÄTE.....	23
2.2 CHEMIKALIEN	24
2.3 ZELLKULTUR.....	26
2.4 ALLGEMEINE VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	27
2.5 KITS	27
2.6 ANTIKÖRPER	27
2.7 PRIMER FÜR QRT-PCR.....	28
2.8 PUFFER UND LÖSUNGEN	28
3. METHODEN.....	29
3.1 ZELLKULTUR.....	29
3.2 WESTERN BLOT.....	30
3.3 RNA-ISOLATION UND CDNA-SYNTHESE.....	31
3.4 QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASE-KETTENREAKTION (QRT-PCR)	32
3.5 PROLIFERATIONS-ASSAY.....	34
3.6 MIGRATIONS-ASSAY	35
4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	36

5. ERGEBNISSE	37
5.1 PROTEINEXPRESSION VON CHEMR23 NACH NORMOXISCHER UND HYPOXISCHER EXPOSITION.....	37
5.2 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE PROLIFERATION VON hPASMCMACH NORMOXISCHER UND HYPOXISCHER EXPOSITION	42
5.3 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE PROLIFERATION VON hPASMCMACH INKUBATION MIT TNF α UND IL-6 IN ABHÄNGIGKEIT VON NORMOXISCHER UND HYPOXISCHER EXPOSITION.....	43
5.4 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE PROLIFERATION VON hPASMCMACH INKUBATION MIT PDGF	45
5.5 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE MIGRATION VON hPASMCMACH NORMOXISCHER UND HYPOXISCHER EXPOSITION	46
5.6 EXPRESSION VON CHEMR23 UND <i>CMKLR1</i> IN PATIENTEN MIT IPAH	47
6. DISKUSSION	50
6.1 DISKUSSION DER METHODEN	50
6.2 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE HYPOXIE - INDUZIERTEPROLIFERATION UND MIGRATION	51
6.3 EINFLUSS VON RESOLVIN E1 AUF DIE STIMULATION MIT PDGF, INTERLEUKIN-6 UND TNF α	52
6.4 REGULATION DER CHEMR23-EXPRESSION UNTER HYPOXIE	53
6.5 REGULATION VON CHEMR23 IN IPAH-PATIENTEN.....	54
6.6 FAZIT UND AUSBLICK.....	54
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	56
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
9. TABELLENVERZEICHNIS	58
10. LITERATURVERZEICHNIS	59
11. ZUSAMMENFASSUNG	68
12. SUMMARY.....	69
13. DANKSAGUNG	70
14. LEBENS LAUF	72

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter.

1. Einleitung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine chronisch progrediente Lungenerkrankung, die durch einen erhöhten pulmonal-arteriellen Mitteldruck (mPAP) im Lungenkreislauf gekennzeichnet ist. Die Diagnose einer PH wird mittels Rechtsherzkatheterisierung gestellt und ist durch einen mPAP von > 20 mmHg definiert (Humbert *et al.*, 2022). Eine Therapieindikation mit spezifischen pulmonal-vasoaktiven Medikamenten besteht jedoch weiterhin erst ab einem mPAP von ≥ 25 mmHg und einer pulmonal-vaskulären *Resistance* (PVR) von ≥ 3 *Wood-Units* (WU) (Humbert *et al.*, 2022). Bei einer PH mit einem erhöhten pulmonal-arteriellen *Wedge-Druck* (PAWP) von > 15 mmHg liegt eine postkapilläre PH vor (siehe Kapitel 1.1)

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist sehr vielfältig, was bei der Klassifizierung berücksichtigt wird (siehe Kapitel 1.1). Im Verlauf der Erkrankung führt der erhöhte Druck im Lungenkreislauf zu einer Belastung des rechten Herzens, woraus eine kompensatorische Hypertrophie des Herzmuskels resultiert. Bei Erschöpfung der Kompensationsmechanismen kommt es zum Rechtsherzversagen und Tod der Erkrankten (Bogaard *et al.*, 2009).

1.1 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH)

Die PH wird nach klinischen, pathologischen und funktionalen Gesichtspunkten in 5 Hauptgruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 1). Die aktuellste Einteilung wurde auf dem 6. Welt-Symposium in Nizza 2018 festgelegt (Simonneau *et al.*, 2019). Kurz zusammengefasst beschreibt die erste Gruppe zum großen Teil Fälle von PH, welche aufgrund einer Veränderung der präkapillären Lungengefäße hervorgerufen werden. Die Gruppe 1 wird aufgrund von histopathomorphologischer Gemeinsamkeiten zusammengefasst, z. B. die Ausbildung von plexiformen Läsionen (Foris, Kovacs and Olschewski, 2017). Auch Erkrankungsfälle, deren genaue Ätiologie noch nicht bekannt sind, werden zur ersten Gruppe gezählt, zum Beispiel bei der pulmonal venookklusiven Erkrankung (PVOD).

Die Gruppe 2 umfasst PH-Formen, die als Folge einer Erkrankung des linken Herzens hervorgerufen wird. Beispiele hierfür sind Kardiomyopathien oder Klappenfehler, die zu einer postkapillären PH führen. Diese ist durch einen erhöhten pulmonal-arteriellen-

Wedge-Druck (PAWP) von >15 mmHg definiert, der dabei keinen PVR von ≥ 3 WU erzeugt. Bei Patienten, die sowohl einen erhöhten PAWP (>15 mmHg) als auch einen erhöhten PVR (≥ 3 WU) in der Rechtsherzkatheter-Untersuchung aufweisen, spricht man von einer gemischten prä- und postkapillären PH (Humbert *et al.*, 2022).

Eine PH, die durch eine chronische Exposition mit Hypoxie oder einer anderweitigen Lungenerkrankung hervorgerufen wird, wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), werden in die 3. Gruppe eingeordnet. Dazu zählt auch eine PH, die aus einem Aufenthalt in einer Höhenlage resultiert.

Die Gruppe 4 umfasst eine PH, welche auf Gefäßobstruktionen wie Thromboembolien oder anderweitigen Verlegungen beruht. Eine Hauptgruppe ist die chronisch-thromboembolische-PH (CTEPH), die ein thromboembolisches Geschehen voraussetzt. Neben den bereits erwähnten Kriterien für eine PH definiert die CTEPH vor allem Perfusionsausfälle der Lungenstrombahn, die durch eine Angiographie der Pulmonalarterien bewiesen werden kann (Wilkens *et al.*, 2017). Weitere Auslöser können insbesondere Tumore sein, welche durch ihren Wachstum und ihre Ausbreitung Lungengefäße verlegen genauer gesagt einengen und dadurch zu einer Druckerhöhung im Lungenkreislauf führen.

Die fünfte Gruppe fasst weitere mögliche Ursachen für eine PH zusammen, die nicht einer der vorigen genannten Gruppen zuzuordnen sind, beispielsweise hämatologische oder metabolische Erkrankungen (Humbert *et al.*, 2022).

Tabelle 1 Klassifikation der PH nach Nizza (Humbert *et al.*, 2022)

1. PULMONAL ARTERIELLE HYPERTONIE
1.1 idiopathisch
1.2 hereditär
1.2.1 BMPR2-Mutationen
1.2.2 Sonstige Mutationen
1.3 durch Medikamente oder Toxine verursacht
1.4. assoziiert mit:
1.4.1 Bindegewebserkrankungen
1.4.2 Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV)
1.4.3 portaler Hypertension
1.4.4 angeborenen Herzfehlern

<p>1.4.5 Schistosomiasis</p> <p>1.5. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose</p> <p>1.6. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen</p>
<p>2. PULMONALE HYPERTONIE INFOLGE VON LINKSHERZERKRANKUNGEN</p>
<p>2.1 Herzinsuffizienz</p> <p> 2.1.1 mit erhaltener Pumpfunktion</p> <p> 2.1.1 mit reduzierter oder leicht reduzierten Pumpfunktion</p> <p>2.2 Klappenerkrankungen</p> <p>2.4 Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Konditionen, die zu einer postkapillären PH führen</p>
<p>3. PULMONALE HYPERTONIE INFOLGE VON LUNGENERKRANKUNGEN UND/ODER HYPOXIE</p>
<p>3.1 chronisch obstruktive Lungenerkrankung</p> <p>3.2 interstitielle Lungenerkrankungen</p> <p>3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem und obstruktivem Muster</p> <p>3.4 alveoläre Hypoventilationssyndrome</p> <p>3.5 chronischer Aufenthalt in großer Höhe</p> <p>3.6 Entwicklungsstörungen der Lunge</p>
<p>4. CHRONISCHE THROMBOEMBOLISCHE PULMONALE HYPERTONIE UND ANDERE PULMONALARTERIEN-OBSTRUKTIONEN</p>
<p>4.1 chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie</p> <p>4.2 andere Pulmonalarterien-Obstruktionen</p> <p> 4.2.1 Angiosarkom</p> <p> 4.2.2 andere intravaskuläre Tumore</p> <p> 4.2.3 Arteriitis</p> <p> 4.2.4 angeborene Pulmonalarterienstenose</p> <p> 4.2.5 Parasiten (Hydatidose)</p>
<p>5. PULMONALE HYPERTONIE MIT UNKLAREM UND/ODER MULTIFAKTORIELLEM MECHANISMUS</p>
<p>5.1 Hämatologische Erkrankungen: chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie</p>

- | | |
|------|--|
| 5.2 | Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose |
| 5.3 | Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen |
| 5.4 | Chronische Niereninsuffizienz mit/ohne Hämodialyse |
| 5.5 | Pulmonale tumorbedingte thrombotische Mikroangiopathie |
| 5.6. | Fibrotisierende Mediastinitis |

1.2 Medikamentöse Therapie der PH

Ist die zugrundeliegende Ursache der PH ermittelbar, steht die Behandlung ebendieser im Vordergrund. Insbesondere für die pulmonal-arterielle PH (PAH) gibt es aktuell keine kurative Therapie, der Verlauf der Erkrankung kann bisher nur verlangsamt werden (Galiè *et al.*, 2016). Intensive Forschung führte allerdings zur Entwicklung verschiedener Wirkstoffe, welche die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung vervielfacht haben. Grundsätzlich erfolgt die Wahl der Therapiestrategie durch spezialisierte Zentren. Aktuell gibt es nur eine spezifische pulmonal-vasoaktive Therapie für die PAH und die chronisch-thromboembolische PH (CTEPH). Zur Behandlung der PAH sind derzeit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase 5 (PDE5)-Hemmer, Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase, Prostacyclin Analoga sowie Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten zugelassen (Mandras *et al.*, 2020). Zudem werden verschiedene weitere Substanzklassen zur symptomatischen und ursächlichen Therapie verschiedener Grunderkrankungen angewendet, wie z. B. Sauerstoff bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), Diuretika bei Überwässerung oder Antikoagulantien bei chronisch thromboembolischer PH. Als einzige Form der PH herrscht bei der chronisch Hypoxie-induzierten PH prinzipiell die Reversion nach Zuführung von normoxischen Bedingungen (Young *et al.*, 2019).

1.3 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie

Die Hypoxie ist der Zustand, in der ein Mangel an verfügbarem Sauerstoff vorliegt. Dabei ist es ein starker Stimulus für die Vasokonstriktion und vaskuläres *Remodeling*. Der hypoxische Zustand kann sich auf einen ganzen Organismus oder nur einzelne Zellen beziehen, daher ist es eine relative Bezeichnung (Welsh and Peacock, 2013). Man kann zwischen einer akuten Hypoxie (Sekunden bis Tage) und einer chronischen Hypoxie (Tage bis Wochen) unterscheiden. Die Übergänge sind dabei fließend (Welsh and Peacock, 2013). Die Umbildung der Lungengefäße und speziell die Zunahme der Muskularisierung der Lungenarterien ist eine Reaktion auf eine länger anhaltende Hypoxie in der Lunge. Eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Hypoxiereaktion nimmt der *hypoxia-inducible factor* (HIF) ein (Stenmark et al., 2006). Für die Beschreibung der Funktionsweise des HIF wurden die Entdecker 2019 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet. Durch die Aktivierung von HIF wird die Proliferation direkt, z. B. durch die Aktivierung von *vascular-endothelial growth factor* (VEGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) erhöht. Wie in Abbildung 4 dargestellt, werden neben den proliferativen Mechanismen auch inflammatorischen Signalwege aktiviert, unter anderem der *necrosis-factor-„kappa-light-chain“ of B-cells* (NF- κ B)-Signalweg (Pugliese et al., 2015a). So führt in der chronischen Höhenkrankheit die anhaltende Hypoxie neben der proliferativen Verdickung der Gefäßwände auch zu einer entzündlichen Reaktion ebendieser, die in einer ähnlichen Form beispielsweise bei der COPD vorkommt (Pugliese et al., 2015b).

Wie oben bereits zu entnehmen ist, bestehen für die PH je nach Ätiologie unterschiedliche Pathomechanismen. Die Veränderungen, die in den meisten Fällen zu einer Erhöhung des PVR führen, sind dabei in einer Trias aus Vasokonstriktion, Thrombosierung und strukturellem Gefäßumbau gekennzeichnet (Ralph T. Schermuly et al., 2011).

Die pulmonale Vasokonstriktion wird durch verschiedene Trigger ausgelöst. Ein direkter Auslöser hierfür ist die Hypoxie. So kommt es bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), welche auf dem Euler-Liljestrand-Mechanismus beruht, durch eine Inhibition von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen in den pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) zu einer Membrandepolarisation, welches eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung und Vasokonstriktion hervorrufen. Dies begünstigt auch eine erhöhte Proliferation der PASMC (Rabinovitch, 2008; Schermuly et al., 2011). Neben diesem

Mechanismus können auch eine endotheliale Sekretion von vasoaktiven Substanzen eine Vasokonstriktion hervorrufen.

Wie oben bereits erwähnt, ist eine Hauptursache für die Widerstandserhöhung ein pulmonal-vaskuläres *Remodeling*. Ähnlich wie in anderen Systemen des Organismus herrscht in den pulmonalen Gefäßen eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose. Bei einer PH ist dieses Gleichgewicht zugunsten der Proliferation verschoben, welche zu einer fortschreitenden Zunahme der Gefäßwanddicke, Gefäßsteifigkeit und PVR führt (Mandegar *et al.*, 2004). Ein vaskuläres *Remodeling* betrifft dabei neben den Endothelzellen auch PASMC und Fibroblasten, und somit alle Schichten des Gefäßes (Jia *et al.*, 2023)

Im Bereich der Adventitia kann die Dicke in Relation zum Gefäßdurchmesser von 15 % auf bis zu 29 % zunehmen (Tuder, 2007). Dies wird vor allem durch eine hyperproliferative Antwort der adventitiellen Fibroblasten auf vaskuläre Stresssignale hervorgerufen. Hinzu kommt eine häufige Umwandlung der Fibroblasten in glatte Muskelzellen mit einer Einwanderung in die Media. Dabei werden Wachstumsfaktoren sezerniert, welche PASMC zur Proliferation stimulieren (Wang *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2023).

Auch in der Media kommt es zu hypertrophen Veränderungen, dabei lassen sich diese vor allem im Bereich kleiner pulmonaler Arterien (70-500 µm Durchmesser) und präkapillärer Gefäße (<70 µm Durchmesser) finden (Pak *et al.*, 2007). Zusätzlich zeigte sich, dass die Hypoxie-induzierte PH unter anderem durch die Adventitia und daraus resultierend der pulmonal-arteriellen Gefäßendothelzellen (PAEC) beeinflusst werden (Jia *et al.*, 2023).

Ein weiterer wichtiger Mediator für die Vasokonstriktion ist das Kalzium (Ca^{2+}). Daneben ist es auch für das Wachstum und die Proliferation von PASMC notwendig. Durch Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexe ist es ruhenden PASMC möglich, sowohl in den Zellzyklus einzutreten, als auch den Zellzyklus zu modulieren (Mandegar *et al.*, 2004). Gleichzeitig führt Ca^{2+} zu einer vermehrten Synthese von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder PDGF (siehe Kapitel PDGF) (Mandegar *et al.*, 2004). Ein erhöhter Spiegel von VEGF in plexiformen Läsionen lässt sich auch bei Patienten mit einer PAH nachweisen (Schermuly *et al.*, 2011).

Neben Wachstumsfaktoren, Ionenkanälen und Gefäßmediatoren nehmen inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle am vaskulären *Remodeling* ein (Pullamsetti *et al.*, 2011).

Dabei zeigt sich, dass in der Hypoxie-induzierten PH Signalkaskaden, die durch die Hypoxie ausgelöst werden, inflammatorische Mechanismen aktivieren. So werden neben der HIF-Signalkaskade auch pro-inflammatorische Signalkaskaden wie NF κ B aktiviert (Pugliese *et al.*, 2015a). Zusätzlich werden durch Fibroblasten, die sich an der Adventitia befinden Immunzellen wie Monozyten rekrutiert, welche sich im weiteren Verlauf zu Makrophagen weiter differenzieren (Pugliese *et al.*, 2015a). Des Weiteren zeigte sich in der Hypoxie die Bildung von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* (ROS)), die wiederum zusätzlichen inflammatorischen Signalkaskaden begünstigen (Weissmann *et al.*, 2006)

1.3.1 *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF)

Der PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der bei der Aktivierung seiner Rezeptoren (PDGF-Rezeptor α und β) proliferationsfördernd wirkt (Li *et al.*, 2015). Die genaue Signaltransduktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass PDGF Zellwachstum und -teilung, wie auch Zellmigration stimuliert und dass eine Überstimulation mit PDGF zu strukturellem Gefäßumbau führen kann (Kardas *et al.*, 2020). Auf der anderen Seite präsentieren sich bei der Einschränkung vom PDGF-*Signaling* im Mausmodell mit PDGF β -Rezeptor-*knockout*-Mäusen sowohl kardiovaskuläre als auch organoide Malformationen, beispielsweise an der Niere (Birgitta *et al.*, 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PDGF nicht nur durch die direkte Aktivierung seines Rezeptors die wachstumsfördernde Wirkung durch die Ras-Kaskade aktiviert, sondern auch durch Aktivierung von anderen Kaskaden, beispielsweise der *mitogen-activated-protein* (MAP)-Kinase, welche eine Transkription von Genen des Zellwachstums und -differenzierung auslöst (Andrae, Gallini and Betsholtz, 2008). PDGF ist außerdem als Hauptmediator bei Arteriosklerose und bei weiteren Gefäßveränderungen bekannt (Balasubramaniam *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass PDGF die Proliferation von Progenitorzellen und dadurch den vaskulären Umbau fördert. Dies hat eine Induktion der PH zur Folge (Solinc *et al.*, 2022). In Ratten mit Monocrotalin-induzierter PH kann durch die Verabreichung eines PDGF-Rezeptorblockers der Lungendruck wieder normalisiert werden (Schermuly *et al.*, 2005).

1.3.2 Interleukin-6 und *Tumor-Necrosis-Factor* α

Das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) ist ein Botenstoff, welcher vor allem nach inflammatorischen Stimuli z. B. bei Infektionen mit Bakterien oder Viren vermehrt von unterschiedlichen Zellen, z. B. Endothelzellen, Monozyten ect. ausgeschüttet werden und wiederum proinflammatorische Signalwege im Organismus aktiviert. Eine direkte Gabe von IL-6 kann beispielsweise eine Leukozytenzahlerhöhung hervorrufen und somit die Freisetzung von wachstumsfördernden Mediatoren induzieren (Tanaka et al., 2014). Dieses kann über eine Steigerung der Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen unter anderem zum Umbau des systemischen Gefäßsystems beitragen (Nishimoto, 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch eine vermehrte Gabe von IL-6 eine zunehmende Erhöhung des PVR und eine Rechtsherzhypertrophie in Mäusen entsteht (M Kathryn Steiner et al., 2009). Zusätzlich ließ sich zeigen, dass in einer Hypoxie-induzierten PH eine vermehrte Aktivierung von IL-6-Rezeptoren in PASMC nachweisbar war und vor allem eine Steigerung der Migration von murinen PASMC dargestellt werden konnte (Maston *et al.*, 2018). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Aktivierung von Chemokin-like Rezeptor 1 (ChemR23) im Mausmodell eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 erfolgte, welche an der allgemeinen Entzündungsreaktion des Organismus beteiligt war (Takayasu *et al.*, 2013).

TNF α ist ebenfalls ein wichtiges Zytokin, das durch den BMP6-Signalweg in Mäusen eine exzessive Proliferation von PASMC sowie eine Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten auslöst (Hurst *et al.*, 2017). Im TNF α -*knockout*-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine fehlende TNF α Antwort zu einer Insuffizienz der primären B-Zell-Follikeln und Organisation der dendritischen Zellen in der Milz führte (Pasparakis et al., 1996).

Zusätzlich zeigte sich, dass eine Überstimulation mit TNF α oftmals mit einer Autoimmunerkrankung wie rheumatoiden Arthritis vergesellschaftet war.

1.4 Resolvin E1

1.4.1 Synthese und Funktion von Resolvin E1

Resolvin E1 (5S, 12R, 18R-Trihydroxyeicosapentaensäure) ist ein antiinflammatorischer Lipid-Mediator, welcher aus der Eicosapentaensäure (EPA), die aus der α -Linolensäure, einer essenziellen Omega-3-Fettsäure, in vaskulären Endothelzellen gebildet wird. Die α -Linolensäure wird durch die Nahrung aufgenommen. Über die Aspirin-acetylierte Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Endothelzellen wird aus der α -Linolensäure über die Stearidonsäure die EPA gebildet, die im direkten Anschluss zu 18R-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-EPA (18-R-HEPE) umgewandelt wird. Daraufhin erfolgt, wie in Abb. 1 dargestellt, eine COX-unabhängige Synthese von Resolvin E1 über die Lipoxygenase 5 (5-LOX) in den neutrophilen Granulozyten (Ishihara et al., 2019; Moi et al., 2018). Eine erhöhte Konzentration von Resolvin E1 kann bei lokalen Entzündungsreaktionen mit einer vermehrten Anzahl von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen beobachtet werden, welche einen Effekt, der die Entzündung auflöst, zeigt (Haworth, Cernadas and Levy, 2011). Die Makrophagen vom M1-Typ und NK-Zellen stellen normalerweise ein proinflammatorisches Milieu, wobei vor allem die Eliminierung von Krankheitserregern oder anderen Fremdkörpern im Vordergrund steht. Unter dem Resolvin E1 überwiegt stattdessen die inflammations-auflösende Komponente. Daraus folgt auch, dass M1-Makrophagen in *resolute-phase*-Makrophagen umgewandelt werden (Herová et al., 2015). Außerdem präsentierte sich eine verminderte

Konzentration von entzündungsfördernden Cytokinen, wie Interleukin 6 (IL-6) an Orten der Resolvin E1 Ausschüttung (Buckley et al., 2014).

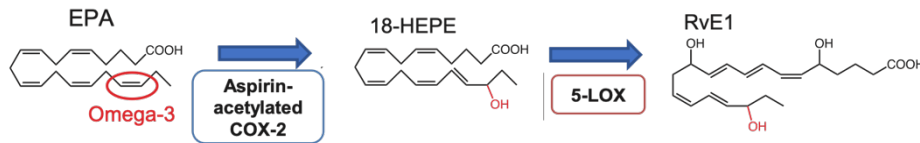


Abbildung 1 Syntheseweg von Resolvin E1 modifiziert nach (Ishihara, Yoshida and Arita, 2019)

EPA: Eicosapentaensäure; COX-2: Cyclooxygenase-2; 18-HEPE: 18R-Hydroxy-

Resolvin E1 führt zur Linderung bis hin zur Auflösung von Entzündungsprozessen und Entzündungssignalkaskaden, unter anderem indem es die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren beispielsweise IL-6 reduziert, dabei wirkt es unabhängig vom Interleukin 10-Signalweg, welches ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung besitzt (Hiroyuki Seki, 2010). Besonders die entzündungs-stabilisierende Wirkung von Resolvin E1 kann in verschiedenen Modellen, beispielsweise im Periodontitis-Modell an Hasen oder Morbus Crohn-Modell in der Maus, gezeigt werden (Serhan et al., 2008). Zum Wirkmechanismus ist bisher bekannt, dass Resolvin E1 als Botenstoff sowohl den Chemokin-like Rezeptor 1 (ChemR23), sowie mit geringerer Affinität auch den Leukotrien B4-Rezeptor (BLT1) aktiviert. Beide Rezeptoren triggern verschiedene Immunreaktionen: Die Aktivierung des ChemR23 durch Resolvin E1 oder den weiteren Liganden für ChemR23, Chemerin, führt vornehmlich zum Einstrom von Immunzellen wie Makrophagen und NK-Zellen im Organismus, wodurch die Auflösung der Entzündung gefördert wird. So besitzt ChemR23 die Fähigkeit Monozyten zunächst zu aktivieren, um proteolytische Peptide zur Immunantwort zu produzieren, gleichzeitig ist es in der Lage die aktivierten Monozyten in ein antiinflammatorischen und entzündungsrückbildenden Phänotypen zurückzuführen (Cash et al., 2014). Serhan et al. postulieren, dass bei einer akuten Infektion der Rezeptor von Resolvin E1 (ChemR23) hochreguliert wird, welche durch seine antiinflammatorische Wirkung ein Überschießen der Entzündung und damit einhergehende Gewebeschäden verhindert (Arita *et al.*, 2005; Serhan, C., Chiang N., 2008). Die Aktivierung des BLT1 löst bei akuten Infektionen ebenfalls eine entzündungsstabilisierenden Immunreaktion aus. Bei einem chronischen

Geschehen verhindert die Aktivierung von BLT1 ein Überschießen der entzündlichen Reaktion, beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis und es folgt eine Homeostase der chronischen Entzündung (Arita *et al.*, 2007; Ishihara, Yoshida and Arita, 2019; Sasaki and Yokomizo, 2019).

1.4.2 Lokalisation und Wirkung des Chemokin-like-Rezeptors 1 (ChemR23)

Der ChemR23 ist ein vom *CMKLR1*-Gen codierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher durch Resolvin E1, aber auch durch andere Substanzen wie z.B. Chemerin aktiviert wird (Kennedy and Davenport, 2018). Eine besonders hohe Dichte dieser Rezeptoren lässt sich in der Maus an dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, vornehmlich an antigenpräsentierenden Zellen, an der Zellmembran verankert, nachweisen. Aber auch an vaskulären glatten Muskelzellen, Adipozyten, Endothelzellen und in NK-Zellen ist die Rezeptordichte überdurchschnittlich ausgeprägt. Auf Organebene sind vermehrt Rezeptoren in der Milz und den Lymphknoten nachweisbar (Wittamer *et al.*, 2003). Durch die vorwiegende Lokalisation auf T-Lymphozyten ist eine Schlüsselrolle in der Initiierung der adaptiven Immunantwort annehmbar (Mariani and Roncucci, 2014).

ChemR23 kann, vermutlich liganden-gesteuert, sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Signalwege aktivieren. Die Bindung des Liganden Resolvin E1 an ChemR23 führt zur Hemmung der TNF α -induzierten proinflammatorischen NF- κ B-Aktivierung (Pirault and Bäck, 2018). In Versuchen mit ChemR23- *knockout* Tieren konnte gezeigt werden, dass die Resolvin E1-vermittelte vermehrte Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen ChemR23 abhängig ist (Pirault and Bäck, 2018), was neben der bereits beschriebenen antiinflammatorischen Wirkung auf eine zusätzlich entzündungsaflösende Wirkung des Resolvin E1-stimulierten Rezeptors schließen lässt. Die Bindung des Liganden Chemerin löste dagegen auch proinflammatorische Effekte aus (Pirault and Bäck, 2018). Es ist jedoch unklar, inwiefern der inflammatorische Effekt physiologisch eine Bedeutung hat, so wird in der Mehrzahl der Veröffentlichungen der anti-inflammatorische Effekt in der Wirkung beschrieben (Serhan & Schwab, 2013): ChemR23 überexprimierende Mäuse zeigten eine schnellere Auflösung der Entzündung im Peritonitismodell (Arita *et al.*, 2007). Gleichzeitig zeigte sich, dass in ChemR23-*knockout* Mäusen eine Aufhebung der Entzündungsreaktion

deutlich verlangsamt auftritt. Im Mausmodell mit akutem Lungenversagen zeigte sich, dass die Anzahl an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei ChemR23-*knockout* Mäusen deutlich höher ist, als beim Wildtyp (Luangsay *et al.*, 2009; Herová *et al.*, 2015). So lässt sich auch zeigen, dass bei ChemR23-*knockout* Mäusen im PVM (*pneumonia virus of mice*)-Modell bei einer akuten Pneumonie die Rekrutierung von dendritischen Zellen in der Lunge stark gemindert war. Interessanterweise ist dieses nicht protektiv, sondern ist mit einer höheren Sterblichkeit der Mäuse im Vergleich zum Wildtyp verbunden. Die Ursache für die reduzierte Rekrutierung von dendritischen Zellen lässt sich aktuell noch nicht genau sagen, jedoch zeigte sich in parallelen Versuchen in der Haut, dass kutane dendritische Zellen durch die Behandlung mit Resolvin E1 ebenfalls vermindert rekrutiert wurden. Gleichzeitig konnte in diesem Modell eine Signalblockade des BLT1-Signalweges dargestellt werden, welche eine mögliche Erklärung für die fehlende Rekrutierung der dendritischen Zellen darstellt. Die immunmodulierende Wirkung auf den Organismus durch die Aktivierung von BLT1 wird im folgenden Kapitel näher erläutert (Sawada *et al.*, 2015).

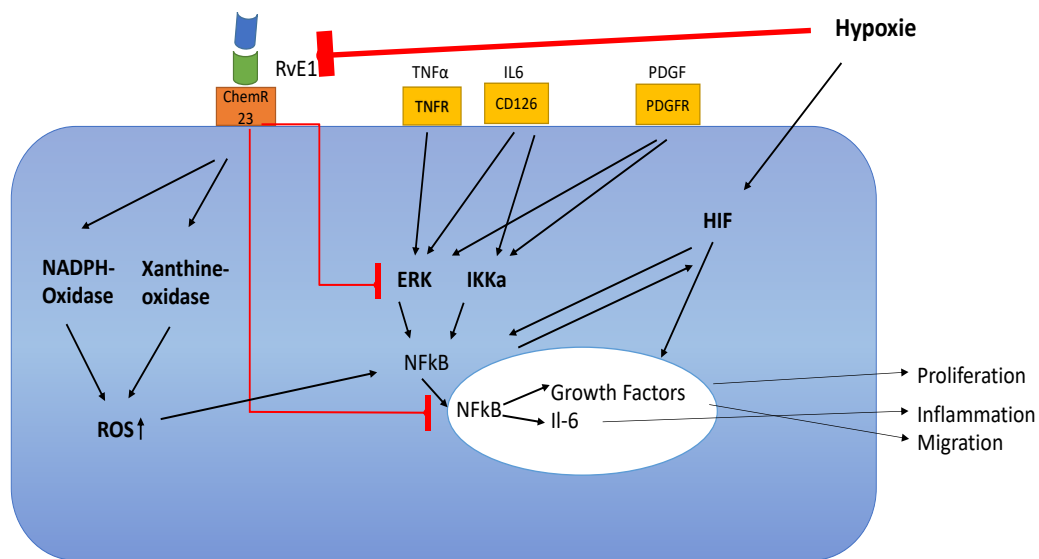
Neben der Beteiligung an pro- und antiinflammatorischen Prozessen werden dem ChemR23 Rezeptor auch proliferative Effekte zugeschrieben. So führte die Bindung von Chemerin an ChemR23 über eine erhöhte Aktivität der NADPH- und Xanthin-Oxidase zu einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in glatten Muskelzellen und damit zu verstärkter Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in Mesenterialarterien in Mäusen (Kunimoto *et al.*, 2015).

1.4.3 Lokalisation und Wirkung des Leukotrien-B4-Rezeptors 1 (BLT1-Rezeptor)

Der BLT1-Rezeptor ist ein vom *BLT4R*-Gen codierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher sieben transmembranöse Helix-Strukturen aufweist und in der Zellmembran verankert ist (Sasaki and Yokomizo, 2019). Das *BLT4R*-Gen und dessen Rezeptor BLT1 wird vor allem von Leukozyten exprimiert, die höchste Dichte ist auf den Granulozyten zu finden (Saeki and Yokomizo, 2017). Bei der Aktivierung des Rezeptors durch Resolvin oder Chemerin werden vor allem proinflammatorische Chemokine wie IL-13 verstärkt ausgeschüttet. Im Mausmodell mit K/BxN *serum-transfer arthritis* (STA), also Tieren, die an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, konnte gezeigt werden, dass bei *knockout* des *BLT4R*-Gens eine Arthritis nicht auslösbar war, weshalb auf eine inflammatorische Wirkung von BLT1 geschlossen wurde (Kim et al., 2006). Allerdings zeigte sich, dass der BLT1-Rezeptor im alveolarem Gewebe zu einer vermehrten Ausbildung von regulatorischen T-Zellen (Treg) führte und somit ein anti-inflammatorisches Milieu erzeugte (Wang *et al.*, 2012). Dies steht jedoch im Widerspruch zur oben beschriebenen pro-inflammatorischen Reaktion bei Aktivierung des Rezeptors. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der BLT1-Rezeptor je nach Zelltyp sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Signalkaskaden induzieren kann (Pettersson *et al.*, 2005). Jedoch, wie bereits im Kapitel 1.3.2 angeführt wurde, zeigte sich eine Stimulation der Rekrutierung von dendritischen Zellen durch die Aktivierung des BLT1-Rezeptors in der Haut (Sawada *et al.*, 2015). Des Weiteren konnte im BLT1-*knockout*-Mausmodell für Arteriosklerose gezeigt werden, dass eine Aktivierung des BLT1-Rezeptors eine Proliferationsreaktion der vaskulären glatten Muskelzellen (SMC) zur Folge hatte (Heller *et al.*, 2005).

1.5 ChemR23 und BLT1 in der PH

Bisher konnte gezeigt werden, dass es unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* zu einer Reduktion der ChemR23-Expression in PASMC von Mäusen kam. Zusätzlich führte eine Deletion des *CMKLR1*-Gens zu einem Wegfall der protektiven Effekte, wie die Supprimierung der Proliferation von PASMC in der Sugen/Hypoxie-induzierten PH in Mäusen. Sugen 5416 ist ein VEGF-Rezeptor-Antagonist, der in Kombination mit Hypoxie eine PH in Mäusen hervorruft und sich daher für Untersuchungen der PH ideal eignet (Vitali *et al.*, 2014). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Resolvin E1 sowohl im Hypoxie, als auch Sugen- und Monocrotalin-induzierten PH-Modellen ohne den Rezeptor ChemR23 keine signifikante Wirkungen hervorrufen konnte (Liu *et al.*, 2021). Darüber hinaus konnte in der Hypoxie und Sugen-induzierten PH im Mausmodell sowie in Ratten mit Monocrotalin-induzierter PH gezeigt werden, dass bei Inhibierung des BLT1-Signalweges durch Bestatin, welche eine Metalloprotease, die für die Synthese von Leukotrien B4 verantwortlich ist, hemmt, eine Verminderung der PH und Verbesserung der rechtskardialen Funktion hervorgerufen wurden (Tian *et al.*, 2014). Des Weiteren zeigte sich, dass eine Aktivierung vom BLT1-Rezeptor, die Fibroblasten der Adventitia stimulierte und somit den pulmonalen Gefäßumbau förderte (Qian *et al.*, 2016). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in Patienten mit einer PH, wie auch in zuvor genannten Tiermodellen der Serumspiegel von natürlich vorkommendem Resolvin E1 reduziert war (Liu *et al.*, 2021).



—| inhibiert → aktiviert

Abbildung 2: Schematische Darstellung von Signalkaskaden in der glatten Muskelzelle

ChemR23 induziert bei Anbindung des Liganden Resolvin E1 (RvE1) einen Anstieg von radikalen Sauerstoffspezies (ROS), vermittelt über NADPH- und Xanthin-Oxidasen. Der ROS-Anstieg aktiviert die NF-κB-Kaskade und sorgt für einen Anstieg von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Signalen, welche die Proliferation, Inflammation und Migration verstärken. Gleichzeitig ist eine Inhibierung von verschiedenen proinflammatorischen Signalwegen beschrieben. Unter hypoxischen Bedingungen wird durch eine Reduzierung von ChemR23 die Inhibierung von proinflammatorischen Signalwegen vermindert. Stimulantien wie TNF α , IL-6 oder PDGF aktivieren ebenfalls den NF κ B Signalweg. ERK: *extracellular-signal regulated kinase*; IKK α : *inhibitory- κ B kinase*; HIF: *hypoxia-induced factor*; TNF α : *tumor necrosis factor α* ; IL – 6: *Interleukin-6*; PDGF: *plateled-derived growth factor*; NADPH: *Nicotinamidadenindinukleotidphosphat*.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Omega-3 Fettsäure Resolvin E1 vermittelt über deren Rezeptoren ChemR23 anti-inflammatorische bzw. teilweise auch pro-inflammatorische Effekte, sowie anti-proliferative Effekte auf Lungengefäße, wodurch eine Hypoxie-induzierte PH inhibiert werden könnte. In dieser Arbeit wird daher die Hypothese überprüft, dass Resolvin E1 die Proliferation von PASMC, die durch verschiedene Stimuli, u.a. Hypoxie ausgelöst wird, über eine Aktivierung von ChemR23 vermindern kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher folgende Aspekte untersucht:

1. Die Hypoxie-abhängige Proteinexpression von ChemR23 in murine und humanen PASMC
2. Die Hypoxie-abhängige Transkription von *Cmklr1* bzw. *CMKLR1* in murinen und humanen PASMC
3. Die Untersuchung des Einflusses von Resolvin E1 auf die Proliferation von humanen PASMC unter Stimulation mit PDGF, IL-6, TNF α und Hypoxie-Exposition
4. Die Untersuchung des Einflusses von Resolvin E1 auf die Migration von humanen PASMC unter Stimulation mit Hypoxie
5. Die Untersuchung der Expression von ChemR23 und *CMKLR1* in Patienten mit IPAH

2. Materialien

2.1 Geräte

Heizblock	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Hotplate/Stirrer (371)	VWR, Bruchsal, Deutschland
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO - Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q® Vortexer MS1 Minishaker Zellinkubator HERAcell 150	Millipore Merck, Darmstadt, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker Zellinkubator HERAcell 150	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Mx3000P QPCR System, 230 Volt (RoHS, no computer)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Analysenwaage (TE214S)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge & Vortexer Combi-Spin FVL- 2400N	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Schüttler Kombi KL-2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Western Blot Equipment)	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell (Western Blot Equipment)	Bio-Rad, München, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad, München, Deutschland
PX1™ PCR Plate Sealer	Bio-Rad, München, Deutschland
DCTM Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Optically Clear Heat Seal	Bio-Rad, München, Deutschland
Zentrifuge Mikro 120	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Rotina 420R (Kühlzentrifuge)	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Universal 320 R (Zentrifuge)	Hettich AG, Bäch, Schweiz

Agfa CP1000 (Filmentwicklungsmaschine)	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
Heizbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop (Leica DM IL)	Leica, Wetzlar, Deutschland
VACUBOY+VACUSAFE (Absaugsystem mit Vakuumpumpe)	Integra Biosciences, Konstanz, Deutschland
Präparier-Utensilien	Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank (NU480)	Nuaire Inc., Plymouth, MA, USA
Tecan Infinite M200 TPersonal Thermocycler	Tecan Group Ltd., Männerdorf, Schweiz
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

2.2 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)	Promega, Mannheim, Deutschland
Blotting-Papier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
PVDF-Membran Immobilon TM -P	Millipore Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Low-Profile 0.2 ml 8-Tube Strips without Caps	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Optical Flat 8-Cap Strips	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multiplate TM PCR Plates, 96-well clear Precision plus Protein TM Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid) Parafilm M®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium Dodecyl Sufate solution (SDS) 10 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol Sodium Salt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sargold®Pro (Verpackungsfolie)	Sargold, Rorschacherberg, Schweiz
Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
Amersham HyperfilmTMECL Cell Lysis Buffer (10x)	GE Healthcare Limited, München, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), MA, USA

2.3 Zellkultur

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Medium 199 (M199)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), MA, USA
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	Lonza, Basel, Schweiz
DPBS (phosphate buffered saline)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA (1x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
TC-Schale 20; 60	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24-Well	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 6-Well	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Agarose, low gelling temperature	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisen (II, III) -oxid, Pulver < 5 µm, 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagenose von Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cellstar®Pipetten 5 ml; 10 ml; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Falcon® Röhrchen 15 ml; 50 ml	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Normocin™	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Ketamin 10 %	Belapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 % Braun®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Rompun® (Xylazin 2%)	Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland
Temgesic® (Buprenorphin)	Essex Pharma, München, Deutschland
Hepes Pufferan® > 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

0,9 %ige NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Durapore® Medizinisches Klebeband	3M, St.Paul, MN, USA
Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Feather® Disposal Scalpel	PFMmedical AG, Köln, Deutschland
Pur-Zellin® (Zellstofftupfer) 4 x 5 cm	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher	Tork, Mannheim, Deutschland
12 % SDS Acrylamid Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.5 Kits

BrdU-Proliferations Assay (Colorimetric)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
--	--

2.6 Antikörper

Primärantikörper

Anti-ChemR23	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	10325
Anti-β -aktin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A1978

Sekundärantikörper

Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	7074
Anti-Mouse IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	7076

2.7 Primer für qRT-PCR

Spezifität	Gen	Primersequenz
Human	<i>CMKLR1</i>	Forward 5'-GTCTTCCTCCCAATCCAT-3' Reverse 5'-TAGAAAGCCAGGACCCAG-3'
Mouse	<i>Cmklr1</i>	Forward 5'-CTCGGTCTCCTAGGCAAC-3' Reverse 5'-TAGAAAGCCAGGACCCAG-3'
Human	<i>B2M</i>	Forward 5'-ACACTGAATTCACCCCCACTGA-3' Reverse 5'-TGCTTACATGTCTCGATCCCACT-3'
Mouse	B2m	Forward 5'-AAGCCAAGACCGTCTACTGG-3' Reverse 5'-TTCTTTCTGCGTGCATAAATTG-3'

2.8 Puffer und Lösungen

3 %ige BSA Lösung	DPBS BSA	100 mL 0,5 g
Zelllyse-Puffer, 1X	dH ₂ O 10X Zelllyse-Puffer PMSF	900 µL 100 µL 0,1 %
Blocking-Lösung	Magermilchpulver TBST-Puffer, 1X	6 g 100 mL
Laufpuffer (Laemli), 10X	Tris-BASE Glycin SDS dH ₂ O	60,56 g 288 g 30 g 2000 mL
Laufpuffer, 1X	10X Laufpuffer dH ₂ O	100 mL 900 mL
TBS-Puffer, 10X, pH 7,5	Tris-BASE, 0,2M NaCl; 1,5M dH ₂ O	24,23 g 87,66 g 1000 mL
TBST, 1X, pH 7,5	TBS-Puffer, 10X dH ₂ O Tween 20	100 mL 900 mL 1 mL
Transfer-Puffer	0,05M Tris 0,04M Glycin SDS, 0,37 % Methanol dH ₂ O	1,6 g 5,8 g 3,7 mL 400 mL 1596,3 mL
Tris-Puffer (0,5M)	Tris-BASE dH ₂ O	12,11 g 200 mL
Tris-Puffer (1,5M)	Tris-Base dH ₂ O	36,35 g 200 mL

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Handelsübliche humane PASMCM wurden nach Herstellerangaben (Lonza, USA, CC-2581) in einem mit Wachstumsfaktoren versetzten *Smooth-muscle-cell-growth*-Medium (Lonza, USA, CC-31556) (37°C, 21% O₂, 5,3% CO₂, Rest N₂) kultiviert: Nach dem Auftauen wurden die Zellen auf vier Kultivierschalen (Sarstedt, Deutschland, 82.1194.500) ausgesät und für 24 h mit anschließendem Mediumwechsel kultiviert. Folgend wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und dann nach der Aufteilung (*Splitting*) auf die für die Versuche benötigten Platten ausgebracht: Durch Zugabe von 500 µl Trypsin pro Kultivierschale und vorsichtigem Ablösen der Zellen mittels Zellheber wurden die Zellen vom Boden gelöst. Um eine Zellschädigung durch das Trypsin zu verhindern, wird zum Abstoppen der Enzymaktivität Growth-Medium mit 10 % FBS (Fetales Kälberserum) im Verhältnis 1:1 zum Zellen-Trypsin-Gemisch hinzugegeben und anschließend herunterzentrifugiert. Die Gesamtzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und im Anschluss die benötigte Anzahl an Zellen auf die jeweiligen Platten für die entsprechenden Versuche ausgesät. Die Zellen wurden sowohl bei Resolvin E1 als auch PDGF für 24 Stunden behandelt und im Anschluss mit dem *Growth*-Medium je nach Versuchsaufbau weiterkultiviert. Für die Messungen mit Resolvin E1 wurde eine *Stocksolution* mit 50 nM Resolvin E1 hergestellt und in Abhängigkeit der zu untersuchenden Konzentration in das Medium hinzugefügt. Für die Kontrolle wurde die gleiche Menge Ethanol (99,8 %) wie zur Herstellung, der am höchsten verwendeten Konzentration von Resolvin E1 (300 nM), zum Medium hinzugegeben.

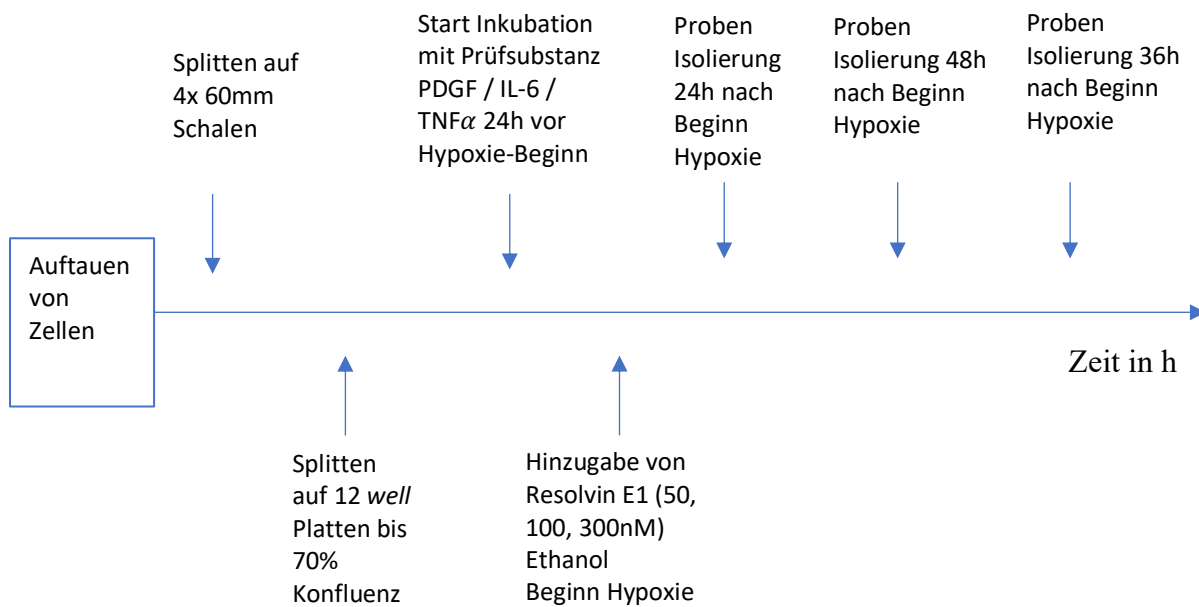


Abbildung 3 Ablaufplan der Zellkultur

3.2 Western Blot

Die Auswirkung der Hypoxie auf den Gehalt der Zielproteine in PSMC (Lonza, USA, CC-2581) wurde in dieser Arbeit per Western Blot bestimmt. Zunächst wurden dafür die Zellen auf 6-Well-Platten (Sarstedt, Deutschland, 83.3920) ausgesät und je nach zu untersuchender Bedingung kultiviert. Anschließend wurden für die Proteinisolierung pro Well 300 µl Zell-Lysis-Puffer (Cell-Signaling, USA, 9803) hinzugefügt und mittels eines Zellhebers die Zellen von der Plattenoberfläche nach 2-minütiger Wartezeit abgelöst. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats wurde die Testmethode nach Bradford nach Herstellerangaben angewendet (Bio-Rad, USA, 5000201). Zur Vorbereitung der Probe auf die Elektrophorese wurden die im Proteingehalt aneinander angeglichenen Proben (25 µg) mit 10x Laemmli-Puffer inklusive β-Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95 Grad Celsius denaturiert und anschließend auf 12 % Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)-Acrylamidgeld-Gel (Bio-Rad, Deutschland) aufgetragen. Mittels Elektrophorese mit 115 Volt für 90 Minuten wurden die Proteine nach Größe und Ladung aufgetrennt und im Anschluss aus dem Gel mittels Semy-Dry-Blotting auf eine Membran aufgetragen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen der Proteine wurde die Membran für eine Stunde in einem 6 %- Milch-Puffer [Milch-Pulver + einfach TBST (Tris-Bufferd Saline mit

TWEEN20-Lösung)] geschwenkt. Zur Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran in einer 5 %-BSA-Lösung mit einer primären Antikörperkonzentration (siehe Materialien) von 1: 2000 über Nacht bei vier Grad Celsius inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1-fachem TBST folgt mittels einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur die Bindung des sekundären Antikörpers in einer Milch-Lösung mit einer Antikörperkonzentration von 1: 10.000.

Im Anschluss folgte nach abermaligem Waschen der Membran die Sichtbarmachung der Banden durch Amersham Hyerfilm ECL (GE, USA, VAR-13331) mit anschließender Quantifizierung im ChemiDoc-Imager (BioRad, Deutschland, 1708265).

3.3 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der Probe wurden die Zellen von einer 6-Well-Platte mit 300 µl Lysis-Puffer lysiert. Im Anschluss wurde die mRNA nach den Vorgaben des Herstellers des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Deutschland) isoliert und der RNA-Gehalt der Probe spektralphotometrisch mittels NanoDrop bestimmt. Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das iScript cDNA-Synthesis-Kit (BioRad, Detuschland) nach Herstellerangaben der Firma Bio-Rad im Thermocycler eingesetzt: Nach einer fünfminütigen Initialphase erfolgte bei 42 °C die Synthese des primären cDNA-Strangs mit Hilfe der Transkriptase. Durch eine RNase wird die RNA-cDNA-Verbindung voneinander gelöst. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation und eine Vervielfältigung der cDNA. Die generierte cDNA wurde bei -20 bzw. -80 °C gelagert.

Das Reaktionsprotokoll der reversen Transkription sah wie folgt aus:

Tabelle 2 Reaktionsprotokoll der cDNA-Synthese

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	25 °C	5 Min
2	42 °C	30 Min
3	85 °C	5 Min
4	4 °C	∞

3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Das Funktionsprinzip der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion q(RT)-PCR besteht darin, Aussagen über DNA-Produktansammlung in Echtzeit zu machen und gleichzeitig Rückschlüsse auf die ursprüngliche Produktmenge gewinnen zu können.

Prinzipiell besteht die qRT-PCR aus sich wiederholenden PCR-Zyklen. Dabei kann durch den Einsatz von spezifischen Primern Kopien von ausgewählten DNA-Sequenzen angefertigt und vervielfältigt werden. Die Quantifizierung der neu synthetisierten DNA-Menge wird hierbei durch den Einbau von Fluoreszenzsonden, wie SYBR Green, gemessen. Diese wird während der Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA eingebaut. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist hierbei proportional zur neu gebildeten Produktmenge.

Der PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C. Liegt die DNA aufgespalten vor, können die Primer sich an die spezifischen Bindungsstellen der DNA-Einzelstränge anlagern (*Primer Annealing*). Diese Anbindung findet bei 59 °C statt. Im Anschluss erfolgt die Vervielfältigung (Polymerisierung) der ausgewählten Sequenzen mittels Polymerasen, die sich an die Primer anlagern. Für die qRT-PCR wird eine hitzestabile Polymerase eingesetzt wie die Taq-DNA-Polymerase aus dem gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus*. Die Polymerisierung erfolgt bei

72 °C. Danach ist ein Zyklus abgeschlossen und die noch im denaturierten Zustand befindliche DNA kann in einen neuen Zyklus weiter repliziert werden.

Die qRT-PCR wird nach Herstellerangaben mit „SYBR Green qPCR SuperMix UDG“ (BioRad, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 3 Haupt-PCR-Ansatz

Platinum SYBR Green qPCR Supermix	5 µl
RNase freies Wasser	3,5 µl
Forward Primer	0,25 µl
Reverse Primer	0,25 µl
cDNA	1 µl

Als Negativkontrolle wird pro amplifiziertes Gen eine non-template-Kontrolle (keine Zugabe von cDNA) angesetzt und amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt im ABI 7900HT Sequence Detection System. Das benötigte Temperaturprofil ist wie folgt:

Tabelle 4 Temperaturprofil der quantitativen Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Schritt	Zyklusphase	Zyklen	Prozess	Zeit	Temperatur
1.	Initiale Denaturierung /Enzymaktivierung	1	Denaturierung	600 s	95 °C
2.	Amplifikation	40	Denaturierung	10 s	95 °C
			Hybridisierung	20 s	59 °C
			Polymerisation	10 s	72 °C
3.	Schmelzkurve	1	Denaturierung	60 s	95 °C
			Hybridisierung	30 s	55 °C

Abschließend wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um mittels Schmelztemperatur die Fragmentgrößen abschätzen zu können. Als Referenzgen wird β_2 -Mikroglobulin (B2M) verwendet. Das B2M ist ein Protein, das in fast allen Zellen ausgebildet und auch unter Hypoxie konstant exprimiert wird. Daher eignet es sich auch besonders als *Housekeeping*-Gen als Referenz (Foldager *et al.*, 2009).

3.5 Proliferations-Assay

Das in dieser Arbeit verwendete Proliferations-*Assay* basiert auf der Inkorporation von 5'Brom-2'Desoxyuridin (BrdU) in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der proliferierenden Zellen. Dabei handelt es sich um eine auf Antikörper-basierte Methode ohne radioaktive Strahlung: Bei Bindung der Antikörper an das neu in die DNA eingebaute BrdU setzen die antikörper-gebundene Enzyme das hinzugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) um. Die entstandene Blaufärbung kann im Anschluss mittels Messung der Lichtabsorption bestimmt und somit die Proliferation quantifiziert werden. Die Zellen werden, wie im Kapitel 3.1 beschrieben vorbereitet und auf eine 24- bzw. 48-*Well*-Platte in *Smooth-muscle-cells*-Basal-Medium ohne Wachstumsfaktoren (Lonza, USA, CC-3181) übertragen. Bei einer Konfluenz von 20 % wurden die Zellen über 72 Stunden unter den jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert. Im Anschluss wird mit der Proliferationsmessung nach Herstellerprotokoll begonnen. Dazu werden die Zellen zunächst fixiert, dann 90 Minuten mit der Antikörperlösung Anti-BrdU inkubiert und nach drei Waschschritten wird das TMB für den Farbumschlag aufgetragen. Fünf Minuten nach Fixierung wird dann die Messung der Lichtabsorption durchgeführt. Das genaue Protokoll ist in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5 Herstellerprotokoll zur Proliferationsmessung

Schritt	Inkubationszeit	Reagenz
1.	30 min.	FixDenat
2.	90 min.	Anti-BrdU (1:100)
3.	3 x 10 s	Waschpuffer
4.	Messung nach 5 min.	Substratlösung

3.6 Migrations-Assay

Das Ziel des Assays ist es die Migrationsfähigkeit der Zellen zu quantifizieren. Das Migrations-Assay wird in 24-Well-Platten durchgeführt, welche mit *Inserts* (s. Abb. 3) versehen sind. Dadurch wird die Kulturschale in zwei Kammern unterteilt, eine oberhalb der Trennmembran und somit innerhalb des *Inserts*, die andere unterhalb der Trennmembran. In die untere Kammer wird das *Smooth-muscle-cells-Growth-Medium* mit Wachstumsfaktoren vorgelegt, wohingegen in die obere Kammer Basalmedium mit Zellen pipettiert wird. Dem Gradienten der Wachstumsfaktoren folgend wachsen bzw. migrieren die Zellen aus den *Inserts* heraus auf die Trennmembran. Durch Zugabe von beispielsweise IL-6 oder TNF- α in das Basalmedium können verschiedene Stimuli auf die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht werden. Die Zellen werden zuerst, wie im Kapitel 3.1 beschrieben isoliert und dann in einer Konzentration von 1000 Zellen/*Insert* ausgesät und für sechs Stunden mit Resolvin E1 (50, 100, 300 nM) inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen auf den *Inserts* mit Ethanol (99 %) fixiert, mit Methylenblau angefärbt und auf einen Objektträger übertragen. Die Auswertung der emigrierten Zellen erfolgt unter dem Lichtmikroskop. Dabei werden alle Zellkerne erfasst, die auf die Trennmembran migriert sind.

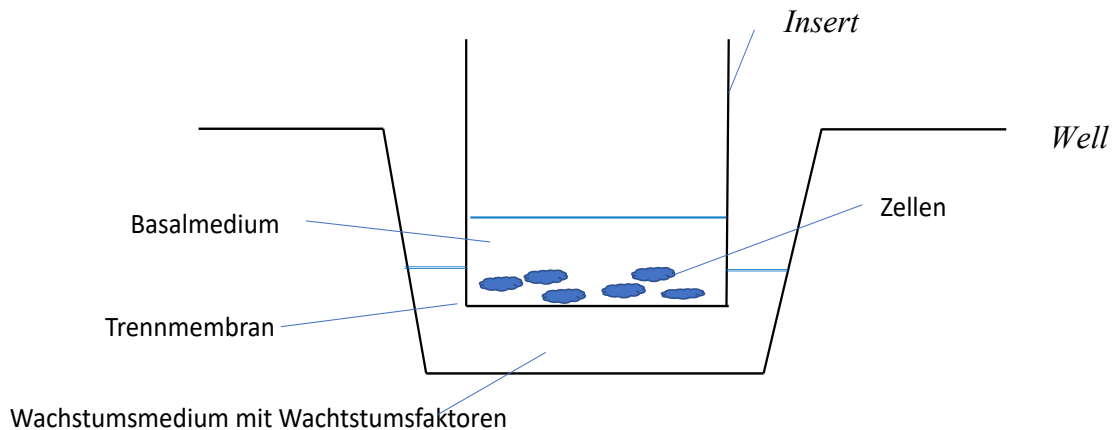


Abbildung 4 Aufbau des Migrations-Assays mit *Inserts*

In eine 24-*Well* Platte wird ein Insert mit einer Trennmembran vorgelegt. In das *Well* wird daraufhin ein Wachstumsmedium mit Wachstumsfaktoren eingefüllt. In das Insert wird im Anschluss die Zelllösung mit Basalmedium ohne Wachstumsfaktoren hinzugegeben. Damit wird ein Stimulus zur Migration von Zellen durch die Trennmembran des Inserts erzeugt. Nach der gewünschten Zeit können die migrierten Zellen in der Trennmembran fixiert und ausgewertet werden. In diesem Versuchsaufbau wurde die Migrationsfähigkeit von Resolvin E1 unter normoxischer (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) und hypoxischer Exposition (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) untersucht.

4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA,USA) bei Vergleichen von zwei Stichproben wurde der t-Test nach Student verwendet. Beim Vergleich mehrerer Stichproben einer Gruppe wurde eine *one-way* ANOVA durchgeführt. Die *two-way* ANOVA wurde bei dem Vorhandensein von mindestens zwei unabhängigen Variablen (z.B. Konzentration von Resolvin E1 und Hypoxie-Bedingung) und einer abhängigen Variabel (z.B Proliferation) verwendet. Hierbei wurde das *post-hoc* Testverfahren nach Tuckey verwendet. Die Haupteffekte der *two-way* ANOVA wurden in der Abbildungsbeschreibung beschrieben. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM).

5. Ergebnisse

5.1 Proteinexpression von ChemR23 nach normoxischer und hypoxischer Exposition

Die Proteinexpression des ChemR23 wurde in Abhängigkeit der Dauer der hypoxischen Exposition untersucht. Dazu wurden mPASMIC für eine unterschiedlich lange Zeitdauer (1, 3, 5 d) gegenüber Hypoxie exponiert (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) und die Proteinexpression von ChemR23 mittels Western Blot bestimmt. Es zeigte sich, dass die Proteinexpression mit zunehmender hypoxischen Expositionsdauer signifikant abnahm. Ähnlich wie bei mPASMIC (Abb. 6) konnte die signifikante Abnahme der Proteinexpression von ChemR23 unter Hypoxie auch in hPASMIC (Abb. 7) nachgewiesen werden.

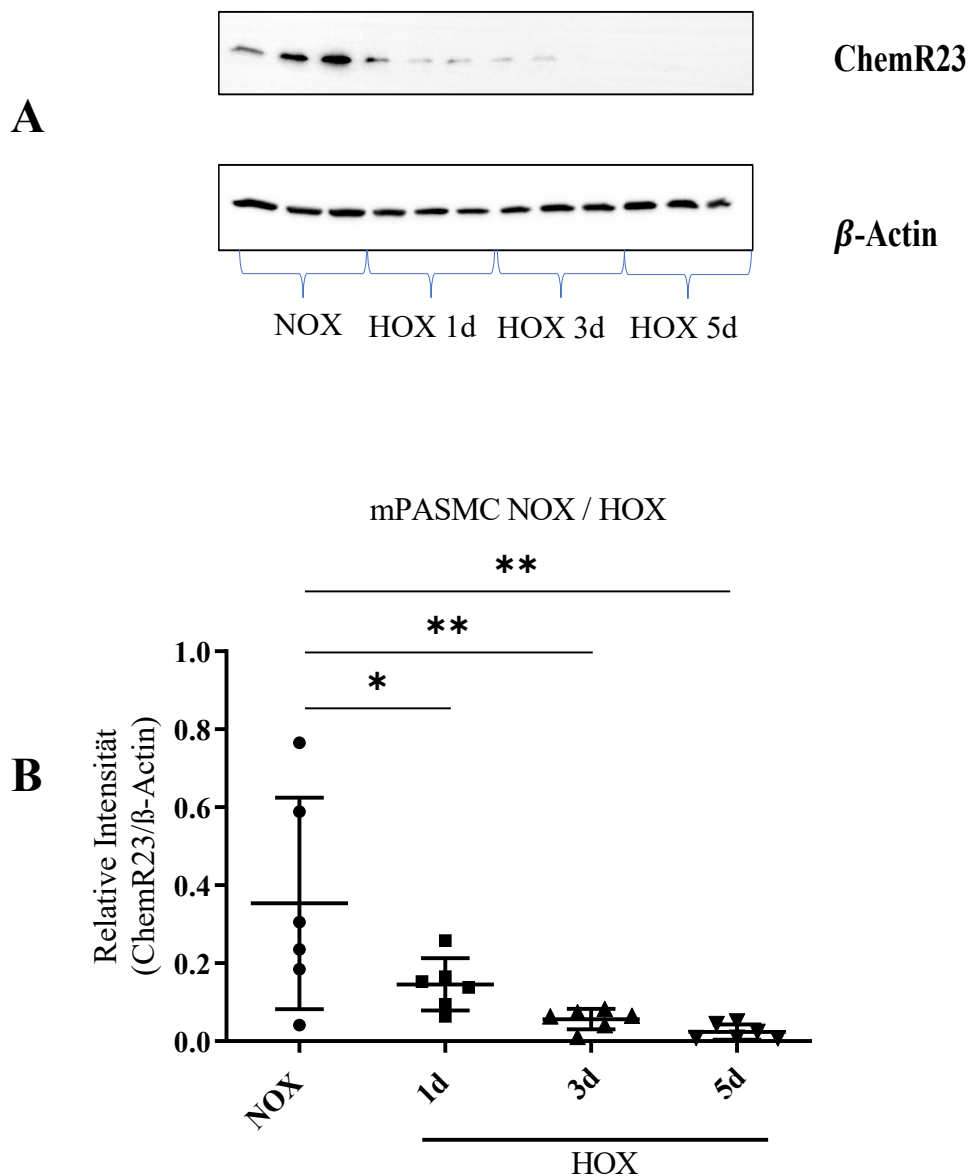


Abbildung 5 Proteinexpression von ChemR23 nach normoxischer oder hypoxischer Exposition von mPASC

A: Repräsentativer Western Blot

B: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse der ChemR23 Proteinmenge in mPASC nach normoxischer (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) oder hypoxischer (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) Exposition für 1, 3 oder 5 d. Der Effekt der Hypoxie wurde mittels *one-way* ANOVA analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * (p<0,05) gekennzeichnet, ** (p<0,01). n=6 Messungen aus jeweils unabhängigen Zellanzüchtungen. HOX: Hypoxie; NOX: Normoxie.

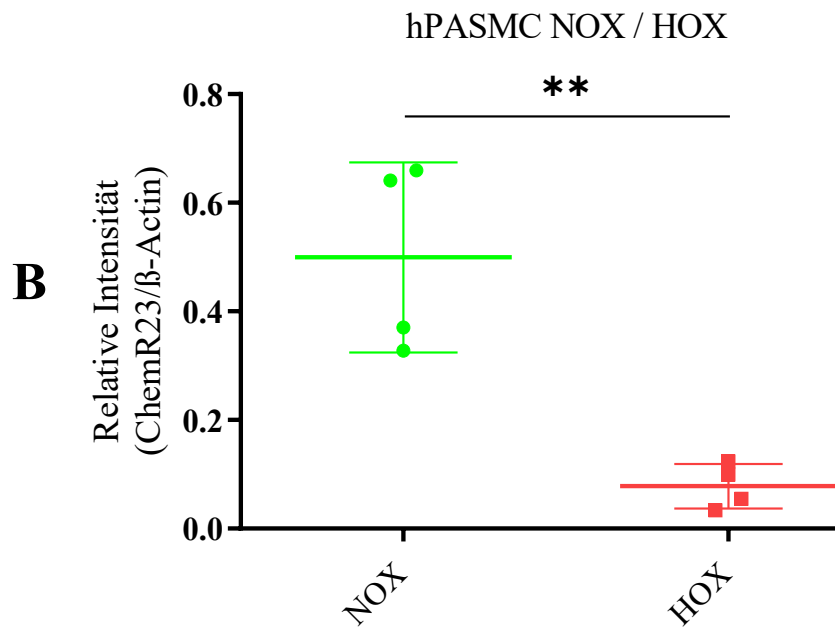
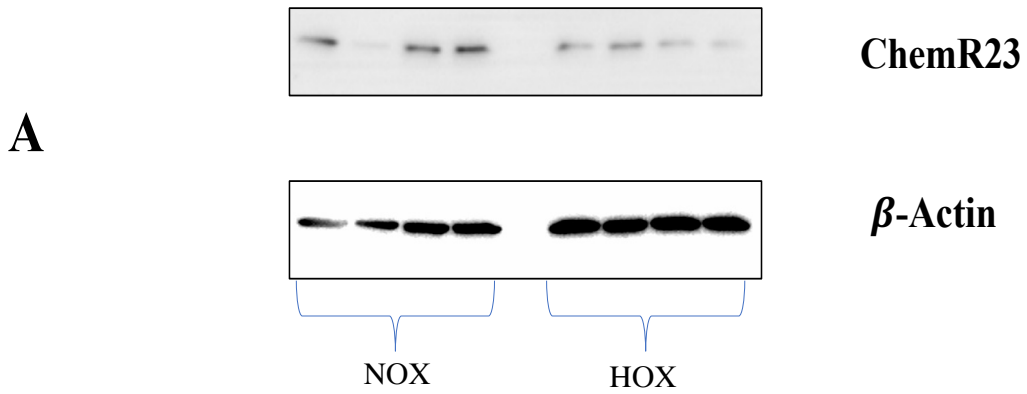


Abbildung 6 Proteinexpression von ChemR23 nach normoxischer und hypoxischer Exposition von hPASC.

A: Reprasentativer Western Blot

B: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse der ChemR23 Proteinmenge in hPASC nach normoxischer (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) oder hypoxischer (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) Exposition fur 72 h. Signifikante Unterschiede (p<0,05) im t-Test sind mit * gekennzeichnet, ** (p<0,01). n=4 aus einer Zellanzuchtung. NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass passend zur Abnahme der Proteinexpression unter zunehmender Dauer der Hypoxie-Exposition auch eine signifikante Abnahme der Transkription des *Cmklr1*-Gens in mPASC (Abb. 8) bzw. *CMKLR1*-Gens in hPASC (Abb. 9) vorlag.

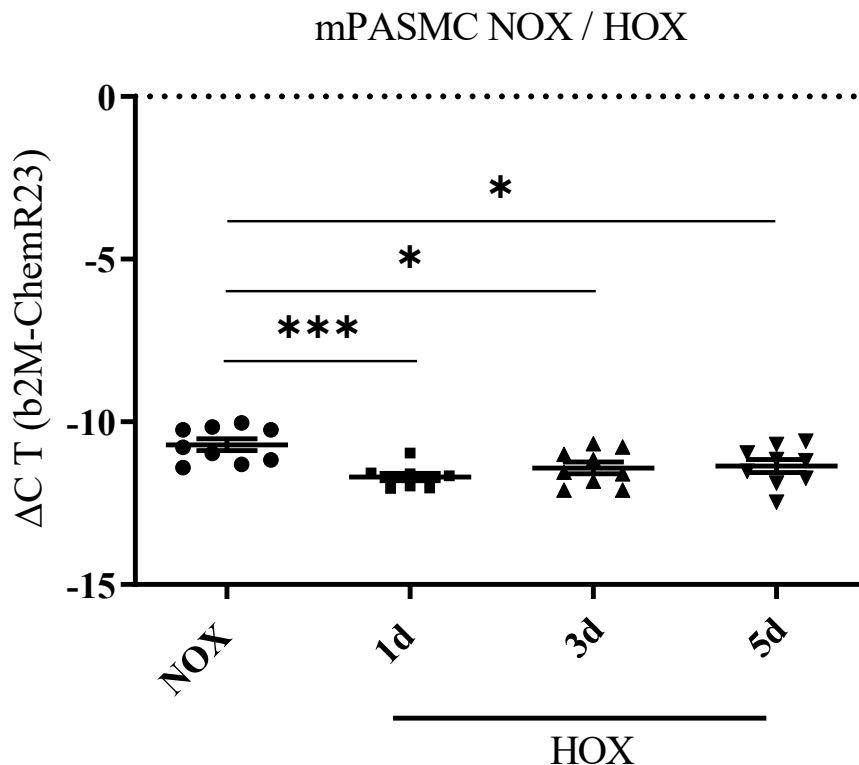


Abbildung 7 Hypoxieabhängige mRNA-Expression von *Cmklr1* in mPASC

Quantitative *real-time* PCR von *Cmklr1* aus mPASC nach normoxischer (21% O₂, 4% CO₂, Rest N₂) oder hypoxischer (1,0% O₂, 4,0% CO₂, Rest N₂) Exposition für 1, 3, oder 5 Tage. Der Effekt der Hypoxie wurde mittels *one-way* ANOVA analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * (p<0,05) gekennzeichnet, *** (p<0,001). n=9 Messungen aus jeweils unterschiedlichen Zellanzüchtungen. HOX: Hypoxie; NOX: Normoxie.

hPASC MC NOX / HOX

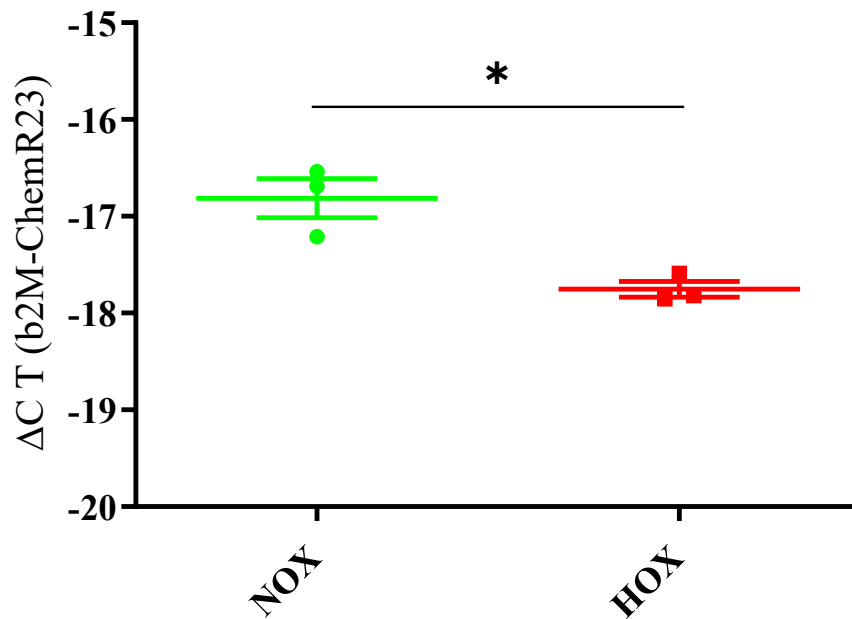


Abbildung 8 Hypoxie-abhängige mRNA-Expression von *CMKLR1* in hPASC MC

Quantitative *real-time* PCR von *CMKLR1* in hPASC MC nach 72h unter normoxischer (21% O₂ 4% O₂, Rest N₂) oder hypoxischer (1,0% O₂, 4,0% CO₂, Rest N₂) Exposition. Der Effekt der Hypoxie wurde mittels t-Test analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * (p<0,05) gekennzeichnet. n=3 Messungen aus einer Zellanzüchtung. HOX: Hypoxie; NOX: Normoxie.

5.2 Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von hPASMC nach normoxischer und hypoxischer Exposition

Zur Analyse des Einflusses von Resolvin E1 auf die Proliferation wurden die hPASMC mit 0, 50, 100 und 300 nM in Ethanol gelöstem Resolvin E1 behandelt und unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen für 72 h kultiviert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Zugabe von Ethanol oder Resolvin E1 angesetzt. Nach Normoxie-Exposition konnte kein signifikanter Unterschied der Proliferation der hPASMC durch die Zugabe von Resolvin E1 nachgewiesen werden. Nach Hypoxie wurde der erwartete signifikante Anstieg der Proliferation ausgelöst, jedoch konnte keine signifikante Auswirkung durch die Behandlung mit Resolvin E1 in den verschiedenen Konzentrationen gemessen werden.

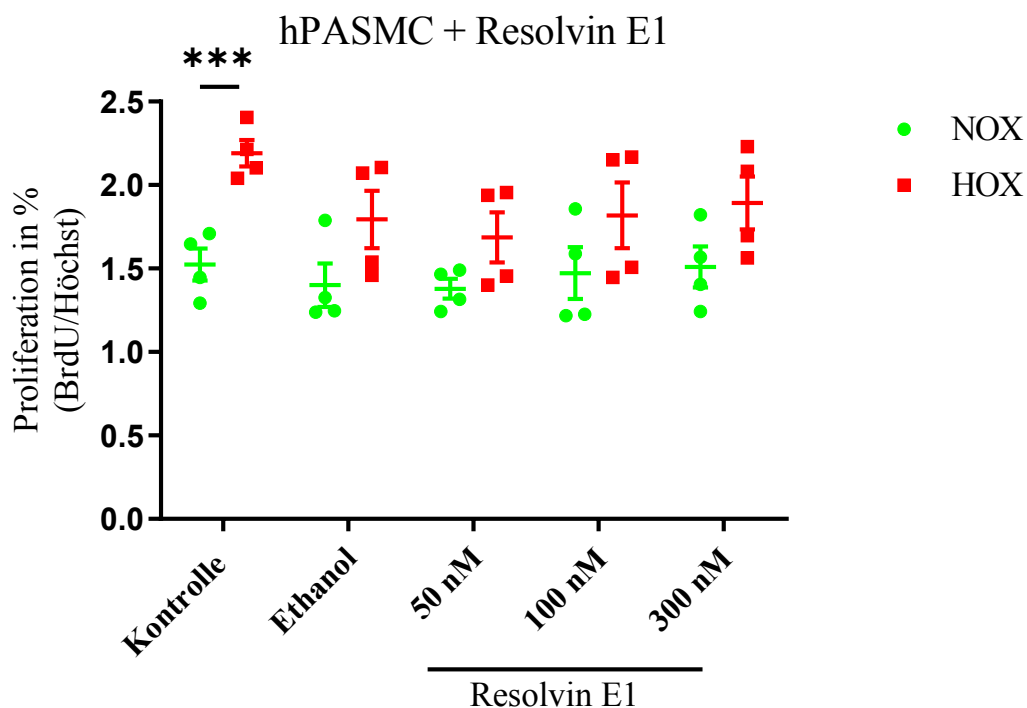


Abbildung 9 Proliferation von hPASMC nach normoxischer (21,0% O₂, 5,3% CO₂, Rest N₂) und hypoxischer (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) Exposition, und unter Einfluss von Resolvin E1 (50, 100, 300 nM). Signifikante Unterschiede (p<0,05) wurden mit einem * markiert. Der Effekt der Hypoxie zu Normoxie in der unbehandelten Kontrollgruppe (ohne Ethanol) wurde mittels t-Test analysiert. Der Effekt von Resolvin E1 wurde mittels *two-way-ANOVA* analysiert. Haupteffekt: Resolvin E1 p=ns, n=4 aus einer Zellanzüchtung. NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie.

5.3 Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von hPASC nach Inkubation mit TNF α und IL-6 in Abhängigkeit von normoxischer und hypoxischer Exposition

Nach fehlender Ansprache von Resolvin E1 auf die normoxische bzw. hypoxische Exposition, wurde zur Verstärkung des proliferativen Reizes zwei weitere Stimuli (TNF α und IL-6) hinzugenommen. Bei beiden Stimuli konnte bereits in früheren Arbeiten ein pro-proliferativer Effekt nachgewiesen werden (Hiram *et al.*, 2015). Zur Analyse des Einflusses von Resolvin E1 auf die Proliferation mit den zusätzlichen Stimuli wurden die hPASC in Anwesenheit von TNF α , IL-6 und mit 0, 50, 100 und 300 nM in Ethanol gelöstem Resolvin E1 behandelt und unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen für 72 h kultiviert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Zugabe von TNF α , IL-6, Ethanol oder Resolvin E1 angesetzt. Nach Normoxie-Exposition konnte kein signifikanter Unterschied der Proliferation der hPASC durch die Zugabe von Resolvin E1 nachgewiesen werden. Nach der Hypoxie wurde der erwartete signifikante Anstieg der Proliferation in der unbehandelten Kontrollgruppe ausgelöst. Ein signifikanter Unterschied durch die Behandlung mit Resolvin E1 nach der Hypoxie konnte nicht gezeigt werden (Abb. 10).

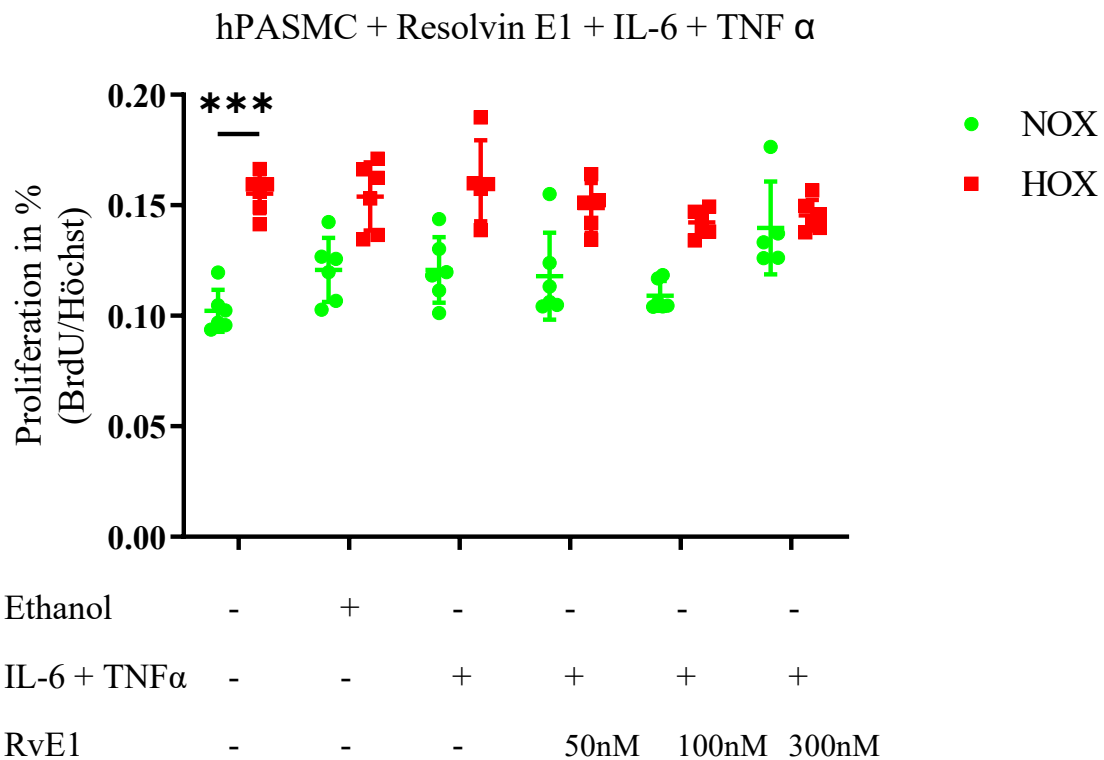


Abbildung 10 Proliferation von hPASMC in Anwesenheit von IL-6, TNF α , RvE1 in Abhängigkeit von Normoxie und Hypoxie

Die Proliferation von hPASMC nach normoxischer (21,0% O₂, 4,0% CO₂, Rest N₂) und hypoxischer (1,0% O₂, 4,0% CO₂, Rest N₂) Exposition und unter Einfluss von Resolvin E1 (50, 100 und 300 nM) sowie IL-6 und TNF α . Signifikante Unterschiede werden mit einem * p<0,05, *** p<0,0001 gekennzeichnet. Der Effekt von Hypoxie auf die unbehandelten Kontrollgruppe (ohne Ethanol) wurde mittels t-Test analysiert. Der Effekt von IL-6+TNF α auf NOX und HOX wurde mittels *two-way* ANOVA analysiert. Haupteffekt: IL-6+TNF α , p=ns. Der Effekt von Resolvin E1 auf NOX und HOX wurde ebenfalls mittels *two-way* ANOVA analysiert. Haupteffekt: Resolvin E1, p=ns. n=6 Messungen aus einer Zellanzüchtung. HOX: Hypoxie; NOX: Normoxie.

5.4 Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von hPASC nach Inkubation mit PDGF

Ähnlich zu der Stimulation mit Hypoxie war auch bei Zugabe von PDGF im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe der erwartete signifikante Anstieg der Proliferation messbar. Jedoch zeigte sich auch hier keine signifikante Änderung durch die Behandlung von hPASC mit Resolvin E1 in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 11).

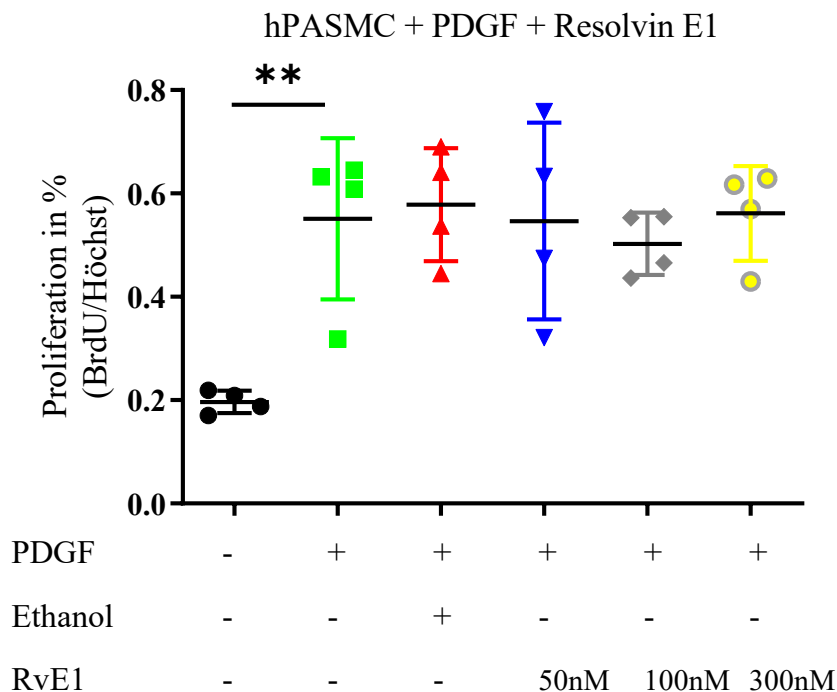


Abbildung 11 Proliferation von hPASC unter PDGF, Ethanol und Resolvin E1

Es wird die Proliferation von hPASC unter PDGF unter dem Einfluss von Resolvin E1 (50, 100 und 300nM) untersucht. Statistische Auswertung des Proliferations-Assays: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem * gekennzeichnet, ** ($p < 0,01$). Der Unterschied von PDGF zur unbehandelten Kontrollgruppe (ohne Ethanol) wurde mittels t-Test analysiert. Der Effekt von Resolvin E1 wurde mittels *one-way* ANOVA analysiert. $n=4$ Messungen aus einer Zellanzüchtung.

5.5 Einfluss von Resolvin E1 auf die Migration von hPASC MC nach normoxischer und hypoxischer Exposition

Im Versuch zeigte sich in der Kontrollgruppe die erwartete Zunahme der Migration in hPASC MC während hypoxischer Bedingungen. Entgegen der ursprünglichen Annahme einer Reduzierung der Migration von hPASC MC durch Resolvin E1, zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt (Abb. 12).

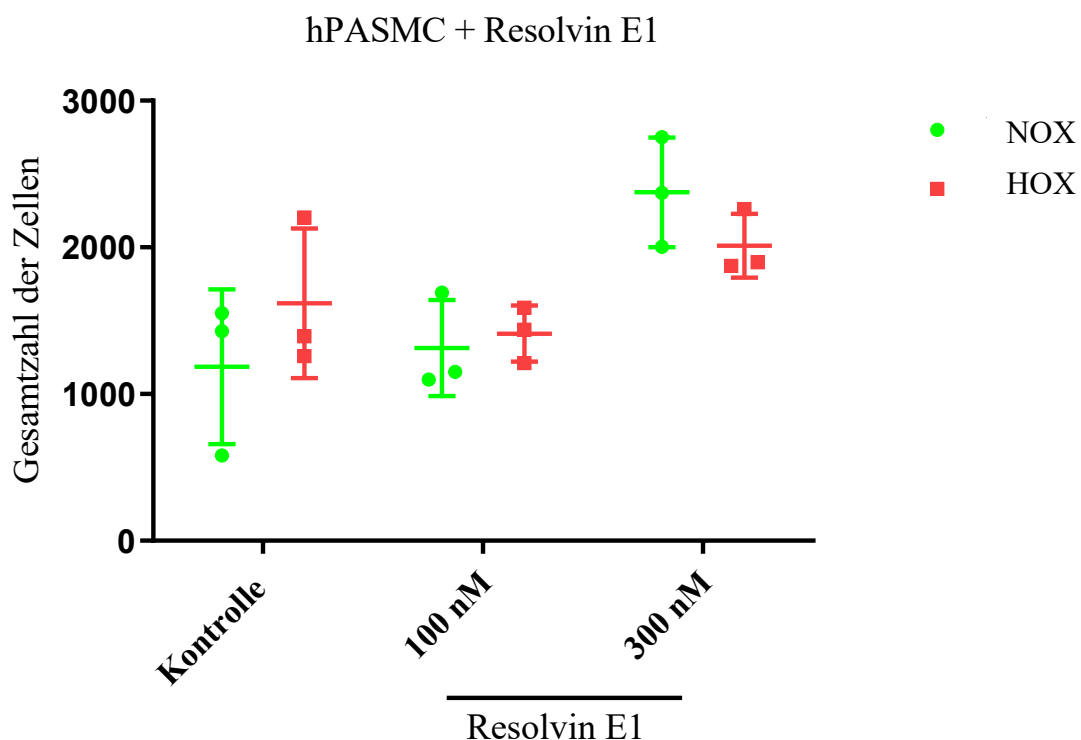


Abbildung 12 Migration von hPASC MC unter Resolvin E1 nach normoxischer und hypoxischer Exposition

Einfluss von Resolvin E1 auf die Migration von hPASC MC. Analyse der Migration von hPASC MC nach 72 h nach normoxischer (21,0% O₂, 5,3% CO₂, Rest N₂) und hypoxischer (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) Exposition mit Resolvin E1 (100 nM und 300 nM) und Ethanol als Kontrolle. Der Effekt der Hypoxie zur unbehandelten Kontrollgruppe wurde mit dem t-Test analysiert. Der Effekt von Resolvin E1 wurde mittels *one-way* ANOVA analysiert. n=3 Messungen aus einer Zellanzüchtung. NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie.

5.6 Expression von ChemR23 und *CMKLR1* in Patienten mit IPAH

Die Ergebnisse der Proteinexpression von ChemR23 nach einer akuten hypoxischen Exposition führten zur weiteren Überlegung, ob auch bei IPAH eine Verringerung der Expression von ChemR23 festzustellen war. Dafür wurden Lungenproben von gesunden Menschen mit Lungenproben von Patienten, die an einer idiopathischen PH gelitten hatten, verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression von ChemR23 in chronisch hypoxischem Lungengewebe ebenfalls signifikant reduziert war (Abb. 13). Außerdem zeigte sich in der Western Blot-Untersuchung eine Abbildung von einer weiteren Bande von ChemR23, zusätzlich zur erwarteten Bande. In der mRNA-Untersuchung von *CMKLR1* bei IPAH-Patienten präsentierte sich jedoch interessanterweise eine signifikante Zunahme der Transkription (Abb. 14).

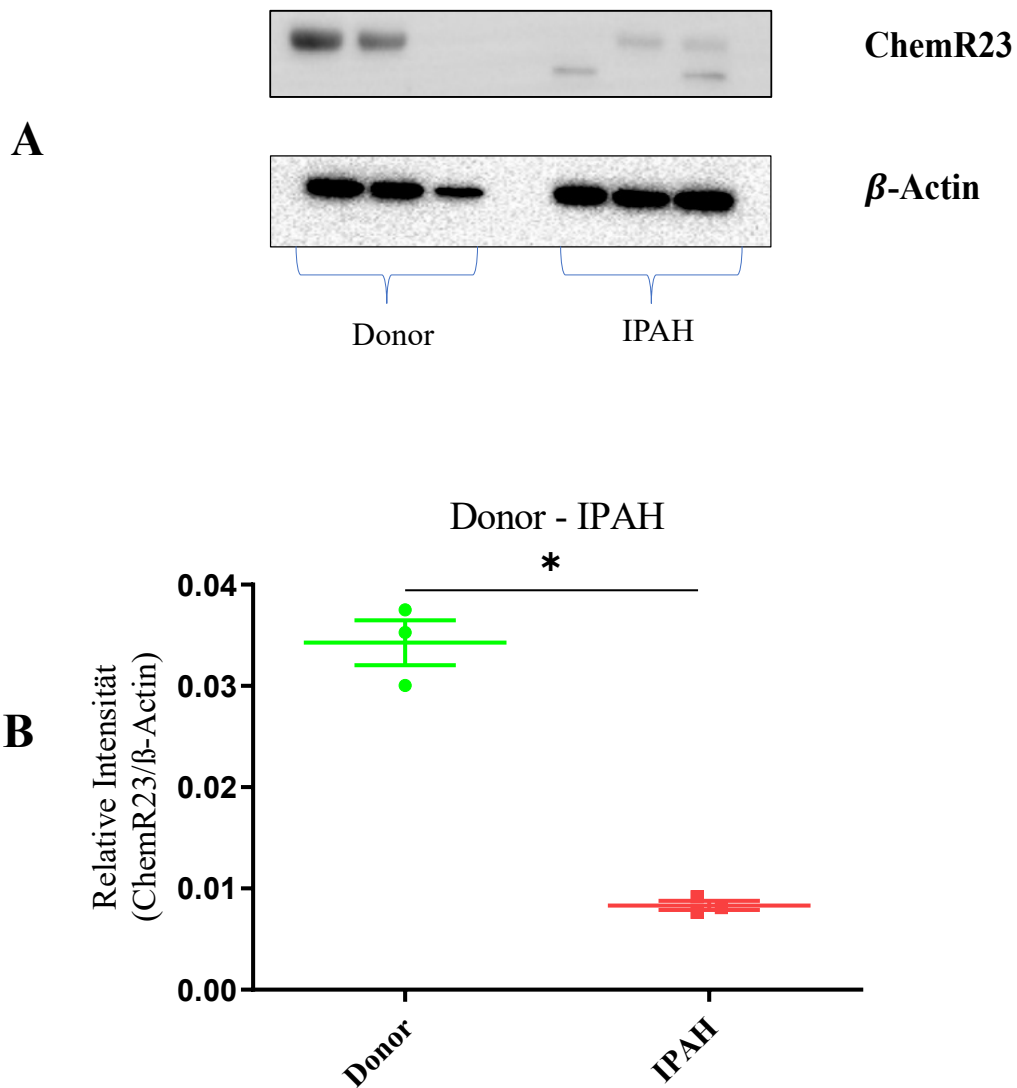


Abbildung 13 Proteinexpression von ChemR23 in Spenderlungen und Lungen mit IPAH
A: Repräsentativer Western Blot
B: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse der ChemR23 Proteinexpression in hPASMC aus gesunden Spenderlungen (Donor) und Lungen mit IPAH. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im t-Test wurden mit einem * gekennzeichnet. $n=3$ Messungen aus unterschiedlichen Patienten. IPAH: idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie.

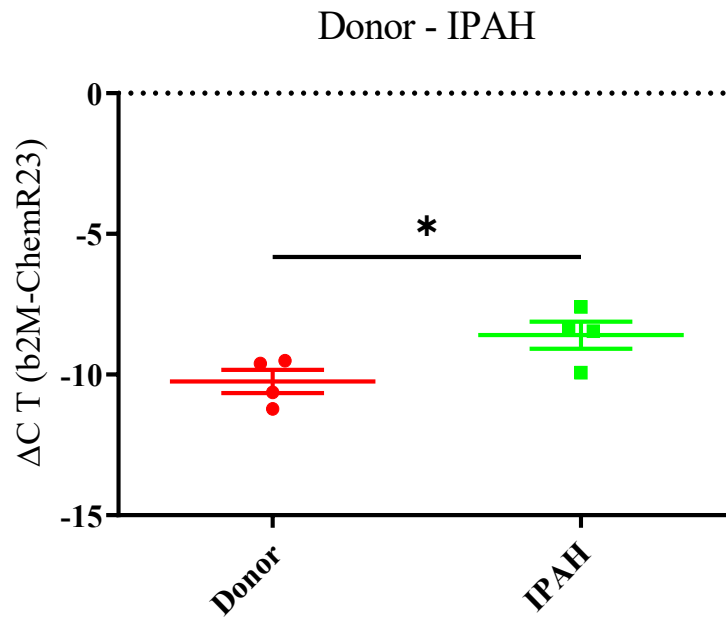


Abbildung 14 mRNA-Expression von *CMKLR1* in gesunden Spenderlungen und Lungen mit IPAH

Quantitative *real-time* PCR der *CMKLR1*-Transkription in gesunden Spenderlungen (Donor) und Lungen mit IPAH. Der Effekt der IPAH wurde mittels t-Test analysiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur gesunden Spenderlunge (Donor) wurden mit einem * gekennzeichnet. $n=4$ Messungen aus unterschiedlichen Patienten. IPAH: idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie.

6. Diskussion der Ergebnisse

Die hier vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von PASMC zu untersuchen, sowie die Regulation eines seiner Hauptrezeptoren, ChemR23 in der PH. Die Wirkmechanismen von Resolvin E1 sind bis heute noch nicht abschließend geklärt. Neben anti-inflammatorischen Effekten zeigte sich auch eine anti-proliferative Wirkung (Serhan et al., 2008). Neueste Veröffentlichungen ergaben außerdem, dass die Behandlung von Tieren im Monocrotalin-induzierten PH im Rattenmodell, sowie Sugen/Hypoxie-induzierten PH im Mausmodell, zu einer Verminderung der Proliferation in PASMC führte (Liu *et al.*, 2021). Dagegen konnte in dieser Arbeit kein direkter Einfluss der Inkubation mit Resolvin E1 durch die Proliferation von PASMC gezeigt werden. Möglicherweise war der mangelnde Effekt von Resolvin E1 auf eine Herunterregulation des ChemR23-Rezeptors verursacht. In weiteren Untersuchungen sollte daher die Wirkweise von Resolvin E1 auf andere Zelltypen, die bei der Entstehung der PH beteiligt sind, untersucht werden.

6.1 Diskussion der Methoden

In dieser Arbeit wurden Funktionsuntersuchungen an isolierten PASMC als Modell für die Entwicklung einer PH verwendet. Obwohl die Proliferation und Migration von PASMC eine wichtige Rolle der Entstehung der PH spielen, ist die Entwicklung einer PH ein multifaktorielles und komplexes Geschehen, an dem verschiedene Zelltypen innerhalb und außerhalb der Lunge beteiligt sind. Durch die ausschließliche Nutzung von *in-vitro*-Experimenten kann dieses nicht vollständig abgebildet werden. Der Einfluss des Organismus auf die zu untersuchenden Zielgrößen ist in *in-vitro* Versuchen, wenn überhaupt, nur eingeschränkt möglich, und daher den *in-vivo*-Versuchen unterlegen. Jedoch sind *in-vitro*-Versuche gerade für die Untersuchung von isolierten Einflüssen auf einzelne Zellgruppen besonders aussagekräftig. Auch zum vertieften Verständnis von molekularen Abläufen sind *in-vitro*-Versuche essenziell. Wichtig wäre hier zu nennen, dass in dieser Arbeit durch *in-vivo*-Versuche an isolierten PASMC gezeigt werden konnte, dass die Expression von ChemR23 während der Hypoxie-Exposition abnimmt, und somit ChemR23 vermindert für die Wirkungsvermittlung von Resolvin E1 zur

Verfügung stehen. Die Möglichkeit von zellulären Wechselwirkungen im Organkontext kann, wie oben bereits dargelegt, durch diese Versuche dagegen nicht geklärt werden.

Die Messungen der Proliferation sowie Migration sind in der Arbeitsgruppe seit langem etablierte Methoden und wurden bereits in mehreren Publikationen verwendet (Seimetz *et al.*, 2020). Limitiert wird die Aussagekraft der Assays dadurch, dass nur eine ganz spezifische Konstellation an Einflüssen überprüft werden konnte, in diesem Fall die Stimulation mit den gut etablierten proliferativen Stimuli PDGF (Li *et al.*, 2015) und Hypoxie (Hubbi and Semenza, 2015). Zusätzliche Einflussfaktoren, die in einem intakten Organismus interagieren, konnte nur eingeschränkt berücksichtigt werden.

Dazu wurde zusätzlich die Stimulation mit $TNF\alpha$ (Xue *et al.*, 2021) oder IL-6 (Steiner *et al.*, 2009) verwendet, die proliferationsfördernde Effekte in humanen PASMC zeigten. Allerdings konnte in dieser Proliferationsmessung unter Stimulation mit $TNF\alpha$ und IL-6 kein signifikanter Anstieg der Proliferation nachgewiesen werden. Die genaue Ursache für den fehlenden Anstieg der Proliferation lässt sich nicht abschließend erklären. Auch eine Behandlung mit einer nicht adäquaten Konzentration von $TNF\alpha$ oder IL-6 könnten einen unzureichenden Wirkspiegel zur Folge gehabt haben, sodass der proliferative Effekt nicht ausgelöst werden konnte.

6.2 Einfluss von Resolvin E1 auf die Hypoxie - induzierte Proliferation und Migration

Die bereits mehrfach publizierte antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung von Resolvin E1 (Serhan & Schwab, 2013) bildete die Grundlage für die Hypothese einer Wirkung der Omega-3-Fettsäure auf die Hypoxie-induzierte Proliferation. Die Rezeptordichte von ChemR23 ist in den Zellen des Immunsystem, beispielsweise dendritischen Zellen oder NK-Zellen der Lunge sowie endothelialen und glatten Gefäßmuskelzellen gut ausgeprägt, sodass eine Wirkung im intakten Gewebe auf pulmonale glatte Muskelzellen plausibel ist (Kennedy and Davenport, 2018).

Jedoch konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt der Inkubation mit Resolvin E1 auf die Hypoxie-induzierten Proliferation von PASMC festgestellt werden. Dazu wurde gezeigt, dass Chemerin, ebenfalls ein Ligand von ChemR23, an vaskulären glatten Muskelzellen einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt hat (Mariani and Roncucci, 2014). In einer Arbeit von Liu *et al.* wurde dagegen publiziert, dass im

Mausmodell mit Sugen/Hypoxie-induzierter PH sowie im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH die Gabe von Resolvin E1 zu einer Abnahme der Proliferation von PASMC, die mittels *Proliferating-Cell-Nuclear* -Antigen (PCNA)-Färbung in den Lungenarterien von histologischen Schnitten gemessen wurde, in der PH-Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe führte. Diese Diskrepanz lassen sich möglicherweise über Zell-Zell-Interaktionen im intakten Organ, die *in vitro* nur eingeschränkt nachgestellt werden können, erklären.

Des Weiteren könnte die fehlende Resolvin E1 Wirkung durch die weiter unten in Kapitel 6.4 diskutierten Abnahme der ChemR23 Expression verursacht sein.

6.3 Einfluss von Resolvin E1 auf die Stimulation mit PDGF, Interleukin-6 und TNF α

Die Wirkung von PDGF auf die Proliferation konnte in der Vergangenheit bereits mehrfach gezeigt werden (Li *et al.*, 2015). So aktivieren die PDGF-Rezeptoren Wachstumsfaktoren, welche auch während eines inflammatorischen Geschehens aktiv sind. Durch die Behandlung mit Resolvin E1 wurde eine Reduzierung der Proliferation erwartet. In dieser Arbeit konnte zwar die proliferationsfördernde Wirkung von PDGF auf PASMC dargestellt werden, die Reduzierung der Proliferation nach Behandlung mit dreitägiger Behandlung mit Resolvin E1 konnte hingegen nicht gezeigt werden. Auch die Wirkung von IL-6 zusammen mit TNF α auf die Proliferation und Migration von PASMC konnte in vorigen Arbeiten nachgewiesen werden (Hiram *et al.*, 2015). Dabei aktivieren die beiden Stimuli vor allem proinflammatorische Signalkaskaden, sodass durch die Behandlung mit Resolvin E1 dieser Mechanismus reduziert werden sollte, und dabei eine Reduzierung der Proliferation bzw. Migration erreicht werden konnte. Jedoch konnte auch dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Die Proliferation nahm unter der Behandlung mit Resolvin E1 nach PDGF-Stimulation sowohl in Anwesenheit von IL-6 mit TNF α als auch in der unbehandelten Gruppe zu. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben besitzt Resolvin E1 zwar antiinflammatorische Wirkungen, jedoch konnte auch gezeigt werden, dass zum Teil unter Stimulation mit Chemerin durch die Aktivierung von ChemR23 proinflammatorische Signalkaskaden aktiviert werden (Pirault and Bäck, 2018). Eine genaue Ursache hierfür ist nicht bekannt, daher kann davon ausgegangen

werden, dass noch unbekannte Zellinteraktionen, eine Verstärkung der Proliferation und Migration fördern und daher den Mechanismen der Interaktion mit Chemerin ähneln. Dies belegen auch weitere Arbeiten, die eine gegensätzliche Wirkung von Resolvin E1 mit proliferations- und migrationsfördernden Tendenzen in murinen glatten Gefäßmuskelzellen nach hypoxischer Exposition zeigten (Kunimoto *et al.*, 2015). Gerade in dieser Hinsicht sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, um die genauen Mechanismen bei der ChemR23 Aktivierung zu untersuchen.

6.4 Regulation der ChemR23-Expression unter Hypoxie

Um die mögliche Rolle von Resolvin E1 unter Hypoxie näher zu untersuchen, wurde die Rezeptorexpression von ChemR23 in PASMC bestimmt. Kennedy *et al.* beschrieb eine weite Verteilung von ChemR23 besonders auf Immunzellen, aber auch vaskulären glatten Muskelzellen. In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Hypoxieexposition von humanen und murinen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Lunge für unterschiedliche Zeitdauer eine signifikante Abnahme der Expression des Rezeptors ChemR23 und mRNA-Ebene zur Folge hatte. Dazu passend konnte auch Liu *et al.* zeigen, dass isolierte PASMC von Mäusen und Menschen ebenfalls eine verminderte Expression von ChemR23 auf mRNA-Ebene nach Hypoxieexposition im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen aufwiesen. Weiter wurde dort per Immunfärbung von ChemR23 eine Reduzierung dieses Rezeptors speziell in Lungengefäßen von PAH-Patienten und in Tiermodellen (Ratten mit Monocrotalin-induzierter PH und Sugen/Hypoxie-induzierte PH-Mäuse) im Vergleich zu Kontrollen gezeigt. (Liu *et al.*, 2021). Die reduzierte Expression des Rezeptors und eine damit zu erwartende reduzierte Wirkungsvermittlung von Resolvin E1 über ChemR23 ist eine mögliche Erklärung, weshalb Resolvin E1 keine Reduzierung der Proliferation von PASMC im hypoxischen Milieu verursachte. Zusätzlich ist zu erwägen, dass die erwartete anti-proliferative Wirkung über andere Zelltypen reguliert werden, zum Beispiel Immunzellen, sodass bei der alleinigen Betrachtung auf PASMC keine Interaktion mit anderen Zelltypen zustande kommt. Interessant wäre im nächsten Schritt die Überexpression zu untersuchen, da hier vor allem die Reaktion von ChemR23 auf die Gabe von Resolvin E1 untersucht werden kann. Dies ist Grundlage weiterer Forschungsarbeit.

6.5 Regulation von ChemR23 in IPAH-Patienten

Passend zu den Zellversuchen zeigte die Untersuchung des Lungengewebes von Patienten mit IPAH, dass die Erkrankung zu einer Erniedrigung des Proteingehaltes von ChemR23 führte, interessanterweise jedoch parallel zu einer Erhöhung der Expression auf mRNA-Ebene. In der Western Blot-Analyse zeigte sich in der IPAH-Kohorte eine zusätzliche Bande im Vergleich zur Kontrolle. Die zusätzliche Bande zeigte eine geringere Größe des Proteins. Somit könnte es sich um ein modifiziertes Protein bei IPAH-PH handeln. Außerdem kann bei sehr niedriger n-Zahl der untersuchten Patienten keine eindeutige Aussage über die Reproduzierbarkeit und Häufigkeit dieser Beobachtung gemacht werden. Eine erniedrigte Proteinexpression trotz erhöhter Transkription der Gene wird möglicherweise durch vermehrte Abbaumechanismen verursacht oder Mechanismen, die eine Prozessierung der bereits transkribierten mRNA nicht erlauben. Diese Mechanismen sind Bestandteil weiterer Forschungsvorhaben.

6.6 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von PASMC unter verschiedenen proliferationsfördernden Stimuli (Li *et al.*, 2015; Pugliese *et al.*, 2015a). Es konnte kein Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation und Migration von humanen als auch murinen glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden, obwohl in vivo ein anti-proliferativer Effekt von Resolvin E1 auf die Sugen/Hypoxie-induzierten PH-Mäuse und Monocrotalin-induzierte-PH-Ratten nachweisbar war (Liu *et al.*, 2021). Möglicherweise ist daher der Effekt anderer Zelltypen auf die Wirkung von Resolvin E1 mitverantwortlich, sodass der erwartete Effekt nicht gezeigt werden konnte. Zusätzlich zeigte sich nach der Hypoxie-Exposition in vitro eine Reduzierung der ChemR23-Expression in den murinen sowie humanen glatten Gefäßmuskelzellen. Interessanterweise ergab sich auch ein Unterschied im Verhältnis von mRNA zur Expression von ChemR23 in IPAH-Patienten, sodass davon auszugehen ist, dass Mechanismen vorhanden sind, die einen Abbau oder eine verminderte Expression von ChemR23 regulieren. Daher sollten in Zukunft weitere Experimente mit anderen Zelltypen durchgeführt werden, die eventuell ein anderes Regulierungsmuster aufzeigen. Außerdem stellt die Überexpression von ChemR23 eine

interessante Fortsetzung der Arbeit da. Vor allem die Überexpression von ChemR23 während einer hypoxischen Exposition präsentiert sich sehr vielversprechend. Zusätzlich sind auch weitere Effekte von Resolvin E1 wichtige Gebiete für weitere Forschungsarbeiten. Gerade die Erkenntnis von gegensätzlichen Wirkmechanismen von Resolvin E1 zeigt, dass viele Signalkaskaden noch nicht abschließend bekannt sind und daher zukünftige Forschungsleistung erforderlich sind.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B2M	β2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<i>complementary</i> DNA – komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTEPH	chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
d	day-Tag
d.h.	das heißt
DANN	Desoxyribonukleinsäure
Erk ½	extracellular signal-regulated Kinase 1 und 2
Et al.	et alteri- und andere
Evtl.	eventuell
H	hour – Stunde
HCl	Salzsäure
HIF	hypoxia-inducible factor- Hypoxie induzierter Faktor
IL-6	Interleukin 6
K	kilo (10 ³)
μ	Mikro (10 ⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
m	Milli (10 ³)
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule

mPAP	mean pulmonary arterial pressure- mittlerer pulmonalarterieller Druck
mRNA	messenger RNA
NOX	Normoxie
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PAH	pulmonalarteriellen Hypertonie
PASMC	Pulmonary arterial smooth muscle cells- pulmonarterielle glatte Muskelzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline- Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDGF	platelet-derived growth factor- Blutplättchen Wachstumsfaktor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH	pulmonale Hypertonie
RNA	Ribonukleinsäure
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
siRNA	small-interfering RNA- kleine interferierende RNA
SMC	smooth muscle cells
Tab	Tabelle
TNF α	tumor necrosis factor alpha- Tumornekrose Faktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WU	Wood Unit

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Syntheseweg von Resolvin E1 modifiziert von Ishihara et al., 2019	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Signalkaskaden in der glatten Muskelzelle	21
Abbildung 3: Ablaufplan der Zellkultur.....	30
Abbildung 4: Aufbau des Migrations-Assays mit Inserts	36
Abbildung 5: Proteinexpression von ChemR23 nach normoxischer oder hypoxischer Exposition von mPASC	38
Abbildung 6: Proteinexpression von ChemR23 nach normoxischer oder hypoxischer Exposition von hPASC	39
Abbildung 7: Hypoxie-abhängige mRNA-Expression von <i>CMKLR1</i> in hPASC	40
Abbildung 8: Hypoxie-abhängige mRNA-Expression von <i>Cmklr1</i> in mPASC.....	41
Abbildung 9: Einfluss von Resolvin E1 auf die Proliferation von hPASC nach normoxischer und hypoxischer Exposition.	42
Abbildung 10: Proliferation von hPASC in Anwesenheit von IL-6, TNF α , RvE1 in Abhängigkeit von Normoxie und Hypoxie	44
Abbildung 11: Proliferation von hPASC unter PDGF, Ethanol und Resolvin E1	45
Abbildung 12: Migration von hPASC unter Resolvin E1 nach normoxischer und hypoxischer Exposition	46
Abbildung 13: Proteinexpression von ChemR23 in Spenderlungen und Lungen mit IPAH.....	48
Abbildung 14: mRNA-Expression von <i>CMKLR1</i> in gesunden Spenderlungen und Lungen mit IPAH	49

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der PH nach Nizza (Humbert et al., 2022).....	8
Tabelle 2: Reaktionsprotokoll der cDNA-Synthese.....	32
Tabelle 3: Haupt-PCR-Ansatz.....	33
Tabelle 4: Temperaturprofil der quantitativen Echtzeit PCR (qRT-PCR).....	33
Tabelle 5: Herstellerprotokoll zur Proliferationsmessung.....	34

10. Literaturverzeichnis

Andrae, J., Gallini, R. and Betsholtz, C. (2008) 'Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine', *Genes and Development*, 22(10), pp. 1276–1312. doi: 10.1101/gad.1653708.

Arita, M. *et al.* (2005) 'Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1', *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), pp. 713–722. doi: 10.1084/jem.20042031.

Arita, M. *et al.* (2007) 'Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B₄ Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation', *The Journal of Immunology*, 178(6), pp. 3912–3917. doi: 10.4049/jimmunol.178.6.3912.

Balasubramaniam, V. *et al.* (2003) 'Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(5 28-5), pp. 826–833. doi: 10.1152/ajplung.00199.2002.

Birgitta, S. and Lars, E. (1994) 'Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities', *Genes*, pp. 1875–1887. doi:10.1101/gad.8.16.1875

Bogaard, H. J. *et al.* (2009) 'The right ventricle under pressure', *Chest*. The American College of Chest Physicians, 135(3), pp. 794–804. doi: 10.1378/chest.08-0492.

Buckley, C. D., Gilroy, D. W. and Serhan, C. N. (2014) 'Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation', *Immunity*, 40(3), pp. 315–327. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.009.

Cash, J. L., Norling, L. V. and Perretti, M. (2014) 'Resolution of inflammation: Targeting GPCRs that interact with lipids and peptides', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 19(8), pp. 1186–1192. doi: 10.1016/j.drudis.2014.06.023.

Foldager, C. B. *et al.* (2009) ‘Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes’, *BMC Molecular Biology*, 10, p. 94. doi: 10.1186/1471-2199-10-94.

Foris, V., Kovacs, G. and Olschewski, H. (2017) ‘Pulmonale Hypertonie’, *Pneumologie*, 14(2), pp. 117–128. doi: 10.1007/s10405-017-0097-y.

Galiè, N. *et al.* (2016) ‘2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension’, *European Heart Journal*, 37(1), pp. 67–119. doi: 10.1093/eurheartj/ehv317.

Haworth, O., Cernadas, M. and Levy, B. D. (2011) ‘NK Cells Are Effectors for Resolvin E1 in the Timely Resolution of Allergic Airway Inflammation’, *The Journal of Immunology*, 186(11), pp. 6129–6135. doi: 10.4049/jimmunol.1004007.

Heller, E. A. *et al.* (2005) ‘Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment’, *Circulation*, 112(4), pp. 578–586. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.545616.

Herová, M. *et al.* (2015) ‘ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages’, *The Journal of Immunology*, 194(5), pp. 2330–2337. doi: 10.4049/jimmunol.1402166.

Hiram, R. *et al.* (2015) ‘Resolvin E1 normalizes contractility, Ca²⁺ sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- α - and IL-6-pretreated human pulmonary arteries’, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(8), pp. L776–L788. doi: 10.1152/ajplung.00177.2015.

Hiroyuki Seki, K. F. (2010) ‘The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury’, *Journal of immunology*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.4049/jimmunol.0901809.

Hubbi, M. E. and Semenza, G. L. (2015) 'Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 309(12), pp. C775–C782. doi: 10.1152/ajpcell.00279.2015.

Humbert, Marc et al. "2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension." *European heart journal* vol. 43,38 (2022): 3618-3731. doi:10.1093/eurheartj/ehac237

Hurst, L. A. et al. (2017) *TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling*, *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms14079.

Ishihara, T., Yoshida, M. and Arita, M. (2019) 'Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis', *International Immunology*, 31(9), pp. 559–567. doi: 10.1093/intimm/dxz001.

Jia, Z. et al. (2023) 'Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension', *Journal of Personalized Medicine*, 13(2). doi: 10.3390/jpm13020366.

Kardas, G. et al. (2020) 'Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Asthma as an Immunoregulatory Factor Mediating Airway Remodeling and Possible Pharmacological Target', *Frontiers in Pharmacology*, 11(February), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphar.2020.00047.

Kennedy, A. J. and Davenport, A. P. (2018) 'International union of basic and clinical pharmacology CIII: Chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) nomenclature, pharmacology, and function', *Pharmacological Reviews*, 70(1), pp. 174–196. doi: 10.1124/pr.116.013177.

Kim, N. D. et al. (2006) 'A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis', *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), pp. 829–835. doi: 10.1084/jem.20052349.

Kunimoto, H. *et al.* (2015) ‘Chemerin promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle and increases mouse blood pressure’, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(5), pp. H1017–H1028. doi: 10.1152/ajpheart.00820.2014.

Li, L. *et al.* (2015) ‘Smooth Muscle Cells : Molecular Basis for Differential Effects of’, 112(1), pp. 289–298. doi: 10.1002/jcb.22924.PDGF-Induced.

Liu, G. *et al.* (2021) ‘Resolvin E1 Attenuates Pulmonary Hypertension by Suppressing Wnt7a/ β -Catenin Signaling’, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 78(6), pp. 1914–1926. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17809.

Luangsay, S. *et al.* (2009) ‘Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model’, *The Journal of Immunology*, 183(10), pp. 6489–6499. doi: 10.4049/jimmunol.0901037.

M Kathryn Steiner, Olga L Syrkina, Narasaish Kolliputi, Eugene J Mark, Charles A Hales, and A. B. W. (2009) ‘IL-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension’, *Circulation Research*. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182014.IL-6.

Mandegar, M. *et al.* (2004) ‘Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: Role in the development of pulmonary hypertension’, *Microvascular Research*, 68(2), pp. 75–103. doi: 10.1016/j.mvr.2004.06.001.

Mandras, S. A., Mehta, H. S. and Vaidya, A. (2020) ‘Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians’, *Mayo Clinic Proceedings*. Mayo Foundation for Medical Education and Research, 95(9), pp. 1978–1988. doi: 10.1016/j.mayocp.2020.04.039.

Mariani, F. and Roncucci, L. (2014) ‘Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution’, *Inflammation Research*, 64(2), pp. 85–95. doi: 10.1007/s00011-014-0792-7.

Maston, L. D. *et al.* (2018) 'Interleukin-6 trans-signaling contributes to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension', *Pulmonary Circulation*, 8(3). doi: 10.1177/2045894018780734.

Moi, I. M. *et al.* (2018) 'Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria and strategies to enhance their production', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), pp. 5811–5826. doi: 10.1007/s00253-018-9063-9.

Nishimoto, N. (2010) 'Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 87(4), pp. 483–487. doi: 10.1038/clpt.2009.313.

Pak, O. *et al.* (2007) 'The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature', *European Respiratory Journal*, 30(2), pp. 364–372. doi: 10.1183/09031936.00128706.

Pasparakis, B. M. *et al.* (1996) 'Immune and Inflammatory Responses in TNF α -deficient Mice: A Critical Requirement for TNF α in the Formation of Primary B Cell Follicles, Follicular Dendritic Cell Networks and Germinal Centers, and in the Maturation of the Humoral Immune Response', 184(October).

Petersson, A. *et al.* (2005) 'Pro- and anti-inflammatory substances modulate expression of the leukotriene B₄ receptor, BLT1, in human monocytes', *Journal of Leukocyte Biology*, 77(6), pp. 1018–1025. doi: 10.1189/jlb.1204740.

Pirault, J. and Bäck, M. (2018) 'Lipoxin and resolvin receptors transducing the resolution of inflammation in cardiovascular disease', *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV), pp. 1–12. doi: 10.3389/fphar.2018.01273.

Pugliese, S. C. *et al.* (2015a) 'The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: From cellular mechanisms to clinical phenotypes', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(3), pp. L229–L252. doi: 10.1152/ajplung.00238.2014.

Pugliese, S. C. *et al.* (2015b) 'The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: From cellular mechanisms to clinical phenotypes', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(3), pp. L229–L252. doi: 10.1152/ajplung.00238.2014.

Pullamsetti, S. S. *et al.* (2011) 'Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension', *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), pp. 7–14. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03285.x.

Qian, J., Tian, W. and Nicolls, M. (2016) 'LTB4 activates pulmonary artery adventitial fibroblasts in pulmonary hypertension', *Physiology & behavior*, 176(1), pp. 100–106. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06370.LTB.

Rabinovitch, M. (2008) 'Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *The Journal of Clinical Investigation*, 118(7). doi: 10.1172/JCI33452.The.

Saeki, K. and Yokomizo, T. (2017) 'Seminars in Immunology Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors', 33(July), pp. 30–36. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.010.

Sasaki, F. and Yokomizo, T. (2019) 'The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases', *International Immunology*, 31(9), pp. 607–615. doi: 10.1093/intimm/dxz044.

Sawada, Y. *et al.* (2015) 'Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses', *Journal of Experimental Medicine*, 212(11), pp. 1921–1930. doi: 10.1084/jem.20150381.

Schermuly, R. T. *et al.* (2005) 'Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition', *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), pp. 2811–2821. doi: 10.1172/JCI24838.

Schermuly, R. T. *et al.* (2011) 'Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension', *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group, 8(8), pp. 443–455. doi: 10.1038/nrcardio.2011.87.

Seimetz, M. *et al.* (2020) 'NADPH oxidase subunit NOXO1 is a target for emphysema treatment in COPD', *Nature Metabolism*, 2(6), pp. 532–546. doi: 10.1038/s42255-020-0215-8.

Serhan, C., Chiang N., V. D. T. (2008) 'Resolution Lipid Mediators', *Nat Rev Immuno*, 8(5), pp. 349–361. doi: 10.1038/nri2294.Resolving.

Serhan, Charles N. Schwab, J. (2013) 'Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs', *Nature*. doi: 10.1038/nature05877.Resolvin.

Simonneau, G. *et al.* (2019) 'Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension', *European Respiratory Journal*, 53(1). doi: 10.1183/13993003.01913-2018.

Solinc, J. *et al.* (2022) 'Platelet-Derived Growth Factor Receptor Type α Activation Drives Pulmonary Vascular Remodeling Via Progenitor Cell Proliferation and Induces Pulmonary Hypertension', *Journal of the American Heart Association*, 11(7). doi: 10.1161/JAHA.121.023021.

Stenmark, K. R., Fagan, K. A. and Frid, M. G. (2006) 'Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling', *Circulation Research*, 99(7), pp. 675–691. doi: 10.1161/01.res.0000243584.45145.3f.

Takayasu, A. *et al.* (2013) 'CCL18 activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis', *Journal of Rheumatology*, 40(6), pp. 1026–1028. doi: 10.3899/jrheum.121412.

Tanaka, T *et al.* "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 6,10 a016295. 4 Sep. 2014, doi:10.1101/cshperspect.a016295

Tian, W. *et al.* (2014) 'Blocking Macrophage Leukotriene B4 Prevents Endothelial Injury and Reverses Pulmonary Hypertension', 5(200). doi: 10.1126/scitranslmed.3006674.Blocking.

Tuder, Rubin M *et al.* "Pathology of pulmonary hypertension." *Clinics in chest medicine* vol. 28,1 (2007): 23-42, vii. doi:10.1016/j.ccm.2006.11.010

Vitali, S. H. *et al.* (2014) 'The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: Long-term follow-up', *Pulmonary Circulation*, 4(4), pp. 619–629. doi: 10.1086/678508.

Wang, A. P. *et al.* (2021) 'Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Senescence Promotes the Proliferation of PSMCs by Paracrine IL-6 in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension', *Frontiers in Physiology*, 12(April), pp. 1–12. doi: 10.3389/fphys.2021.656139.

Wang, L. *et al.* (2012) 'BLT1-dependent alveolar recruitment of CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells is important for resolution of acute lung injury', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(10), pp. 989–998. doi: 10.1164/rccm.201202-0261OC.

Weissmann, N. *et al.* (2006) 'Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(4), pp. 505–513. doi: 10.1165/rcmb.2005-0337OC.

Welsh, D. J. and Peacock, A. J. (2013) 'Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation', *High Altitude Medicine and Biology*, 14(2), pp. 111–116. doi: 10.1089/ham.2013.1016.

Wilkens, H., Guth, S. and Lankeit, M. (2017) 'Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie', *Klinikerzt*, 46(8), pp. 396–403. doi: 10.1055/s-0043-116608.

Wittamer, V. *et al.* (2003) 'Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids', *Journal of Experimental Medicine*, 198(7), pp. 977–985. doi: 10.1084/jem.20030382.

Xue, X. *et al.* (2021) 'Protective effect of baicalin against pulmonary arterial hypertension vascular remodeling through regulation of TNF- α signaling pathway', *Pharmacology Research and Perspectives*, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1002/prp2.703.

Young, J. M., Williams, D. R. and Thompson, A. A. R. (2019) 'Thin Air, Thick Vessels: Historical and Current Perspectives on Hypoxic Pulmonary Hypertension', *Frontiers in Medicine*, 6(May), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmed.2019.00093.

Yu, Y. *et al.* (2003) 'PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(2 53-2), pp. 316–330. doi: 10.1152/ajpcell.00125.2002.

11. Zusammenfassung

Für die Entwicklung der PH sind verschiedene Ätiologien bekannt. Die chronisch-hypoxische Exposition ist eine bekannte Ursache und führt zu einem pulmonal-vaskulären *Remodeling*. Dabei kommt es zur vermehrten Proliferation und Migration von PASMC.

Resolvine sind Omega-3-Fettsäuren, die eine anti-entzündliche Wirkung im Organismus besitzen. Eine Unterform, die eine besonders ausgeprägte anti-entzündliche Wirkung besitzt, ist das Resolvin E1. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Resolvin E1 auf die Proliferation von PASMC unter verschiedenen Stimuli untersucht.

Sowohl murine als auch humane PASMC wurden für unterschiedliche Dauer (1, 3, 5 d) unter hypoxischer (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) bzw. normoxischer (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) Bedingungen mit Resolvin E1 behandelt. Darunter zeigte sich keine signifikanten Veränderungen, sowohl in der Migration, als auch in der Proliferation. Auch bei der Erweiterung mit anderen proliferationsfördernden Stimuli wie PDGF, IL-6 oder TNF α zeigte sich keine signifikante Veränderung nach der Inkubation mit Resolvin E1. In der molekularbiologischen Untersuchung konnte jedoch gezeigt werden, dass unter zunehmender Dauer der Hypoxie-Exposition sowohl in murinen als auch humanen PASMC eine Abnahme der Expression des Resolvin E1 Rezeptors ChemR23 darstellbar war. Auch die mRNA-Synthese zeigte sich dabei erniedrigt. Bei IPAH-Patienten präsentierte sich ebenfalls eine Verringerung der Proteinexpression von ChemR23, jedoch ergab sich interessanterweise gleichzeitig eine Erhöhung der mRNA-Synthese des *CMKLR1*-Gens. Bei hPASMC nach hypoxischer Exposition und gesunden Patienten konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unter Hypoxie eine signifikante Abnahme von ChemR23 sowohl in murinen als auch humanen PASMC vorlag und eine Behandlung mit Resolvin E1 keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und Migration der PASMC zeigte.

12. Summary

Various aetiologies are known for the development of PH. Chronic hypoxic exposure is a known cause and leads to pulmonary vascular remodeling. This results in increased proliferation and migration of PASMC.

Resolvins are omega-3 fatty acids that have an anti-inflammatory effect in the organism. A subform that has a particularly pronounced anti-inflammatory effect is Resolvin E1. In this work, the effect of Resolvin E1 on proliferation of PASMC was investigated under different stimuli.

Both murine and human PASMC were treated with Resolvin E1 for different durations (1, 3, 5 d) under hypoxic (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) or normoxic (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) conditions. Under these conditions, there were no significant changes, both in migration and proliferation. Also, when expanded with other proliferation-promoting stimuli such as PDGF, IL-6 or TNF α , there was no significant change after incubation with Resolvin E1. In the molecular biological investigation, however, it could be shown that under increasing duration of hypoxia exposure, a decrease in the Resolvin E1 receptor ChemR23 could be displayed in both murine and human PASMC. The mRNA synthesis was also found to be decreased. In IPAH patients, there was also a decrease in the protein expression of ChemR23, but interestingly, at the same time there was an increase in the mRNA synthesis of the *CMKLR1* gene. This could not be demonstrated in hPASMC after hypoxic exposure and healthy patients.

In conclusion, it was shown that under hypoxia there was a significant decrease in ChemR23 in both murine and human cells and treatment with Resolvin E1 showed no significant effect on PASMC proliferation and migration.

13. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Durchführung und dem Abschließen meiner Dissertation geholfen und mich unterstützt haben:

- Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Natascha Sommer für die Themavergabe bedanken. Weiterhin für die Hilfestellungen im anschließenden Verfassen der Dissertation, den vielen hilfreichen Korrekturvorschlägen und für die weitere Betreuung als wissenschaftliche Mentorin im klinischen Alltag.
- Ich danke Prof. Dr. Norbert Weißmann, dass ich in seiner Arbeitsgruppe und mit seiner apparativen und finanziellen Unterstützung diese Arbeit durchführen durfte.
- Mein Dank gilt auch Aleksandr Petrovic und Dr. Oleg Pak für die praktische Unterstützung der Arbeit, vor allem für die Ruhe und Geduld die Methoden im Labor zu unterrichten und bei allen Fragen tatkräftig zur Seite zu stehen.
- Ich bedanke mich bei Karin Quanz für die Hilfestellung in organisatorischen Fragen rund um das Labor und die technische Unterstützung.
- Weiterer Dank gilt Ingrid Breitenborn-Müller, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Andrea Mohr und Katharina Köpsch für die zahlreichen und geduldigen Erklärungen und technischen Hilfestellung in der Molekularbiologie und der Zellkultur.
- Insgesamt möchte ich dem gesamten CPI-Team für die offene und freundschaftliche Atmosphäre danken, welche angesichts der nervenaufreibenden Versuche für die notwendige Motivation sorgte, um am folgenden Tag wieder im Labor zu erscheinen.
- „Der WG“ mit allen Mitgliedern, die in den Jahren hinzugekommen sind.
- Der Justus-Liebig-Universität möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Prägraduierten-Kollegs bedanken.

Ganz am Ende möchte ich mich noch bei besonderen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit niemals erfolgreich hätte abgeschlossen werden können. Zunächst meiner Familie, die mich zu jederzeit unterstützen und bei Problemen immer tatkräftig beiseite standen. Auch meinen Freunden gilt mein besonderer Dank für die aufbauenden Worte und den nötigen Druck, damit diese Arbeit rechtzeitig fertiggestellt werden konnte. Einen

weiteren besonderen Dank möchte ich an Julia und David richten. Julia besonders für ihre Geduld und akribische Durchsicht dieser Arbeit und David für seine stets motivierende Art und die langjährige Freundschaft.