

Einfluss von Feinstaub/Rauchgas auf die Funktion von Endothelzellen

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

vorgelegt von Göttlicher, Sarah Kristin
aus Korbach

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik I
Abteilung für experimentelle Kardiologie
Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl
Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 07.02.2025

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Endothel	1
1.1.1 Physiologische Funktionen	1
1.2 Endotheliale Dysfunktion als Prädisposition für Erkrankungen	2
1.2.1 Gefäßtonus und Gerinnung im Rahmen der endothelialen Dysfunktion.....	3
1.2.2 Inflammation, Makrophagen im Rahmen der endothelialen Dysfunktion	4
1.2.3 Migration, Permeabilität und Proliferation im Rahmen der endothelialen Dysfunktion.....	5
1.2.4 Apoptose im Rahmen der endothelialen Dysfunktion	6
1.3 Risikofaktoren für endotheliale Dysfunktion	8
1.4 Zigarettenrauch	9
1.5 Holzrauch	11
1.6 Cyclooxygenasen, Eicosanoide und deren Signalwege	13
1.7 Klinische Relevanz der endothelialen Dysfunktion am Beispiel der pulmonalen Hypertonie	15
1.7.1 Definition und Klinik	15
1.7.2. Epidemiologie & Einteilung	16
1.7.3 Pathophysiologie und Pathogenese.....	18
1.7.4 Rauch als Risikofaktor für pulmonale Hypertonie	18
1.7.5.1 Therapie	19
1.7.5.2 Prostacyclinanaloga als Therapiemaßnahme	20
1.8 Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2 Reagenzien	24

2.1.3 Kits und enthaltene gebrauchsfertige Reagenzien	24
2.1.4 Antikörper und Primer(-sequenzen)	25
2.1.5 Zellkultur.....	27
2.1.6 Sonstige Materialien	28
2.1.7 Geräte.....	29
2.1.8 Software	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Herstellung von Holzrauchgasextrakt.....	30
2.2.2 Herstellung von Zigarettenrauchgasextrakt	31
2.2.3 Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen	32
2.2.4 Kultivierung und Differenzierung zu Makrophagen.....	32
2.2.5 Kultivierung (immortalisierter) humaner primärer mikrovaskulärer Endothelzellen.....	33
2.2.6 Zellzählung	34
2.2.7 Passagieren und Ausplattieren der Zellen.....	34
2.2.8 Ernte von Endothelzellen und Makrophagen sowie Stimulation mit Holzrauchextrakt/Zigarettenrauchextrakt	35
2.2.9 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung.....	35
2.2.10 cDNA-Synthese	36
2.2.11 Real-Time Quantitative PCR (qRT-PCR)	37
2.2.12 Apoptose-Assay	39
2.2.13 Permeabilitätsassay	40
2.2.14 Durchflusszytometrie (FACS)	40
2.2.15 Statistische Analyse	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Charakterisierung des Modellsystems.....	42
3.1.1 Wachstumskontrolle der immortalisierten Zelllinie CI HPMEC ARLT	42
3.1.2 Phänotypische Eigenschaften der Zelllinie CI HPMEC ARLT.....	44

3.1.3 Funktionelle Charakteristika der CI HPMEC ARLT.....	49
3.2 Einfluss von CSE	51
3.2.1 Inflammation in Makrophagen	51
3.2.2 Einfluss von CSE auf die Permeabilität/Endothelfunktion.....	52
3.2.3 Einfluss von CSE auf die Apoptose-/Nekroserate	54
3.3 Molekulare Prozesse in der endothelialen Dysfunktion.....	57
3.3.1 Einfluss von CSE auf Eicosanoide	57
3.3.2 Einfluss von WSE auf Eicosanoide und Makrophagen	60
3.4 Iloprost.....	65
3.4.1 Einfluss von Iloprost auf die Permeabilität.....	65
3.4.2 Einfluss von Iloprost auf Apoptose.....	66
4 Diskussion	69
4.1 Immortalisierte Zelllinie als Endothelzellmodell.....	70
4.2 Einfluss von Rauchgasextrakt auf physiologische Endothelfunktionen.....	72
4.3 Inflammation im Rahmen der Rauchgasexposition	73
4.4 Einfluss von Rauchgasextrakt auf molekulare Prozesse in der endothelialen Dysfunktion	75
4.5 Prostacyclinanaloga zur Protektion vor endothelialer Dysfunktion	78
5 Fazit und Ausblick	80
6 Zusammenfassung.....	82
7 Summary	83
8 Abkürzungsverzeichnis.....	84
9 Abbildungsverzeichnis	88
10 Tabellenverzeichnis.....	89
11 Literaturverzeichnis.....	90
12 Ehrenwörtliche Erklärung	109
13 Danksagung.....	110

1 Einleitung

1.1 Endothel

Das Endothel wird definiert als ein einschichtiges Plattenepithel aus Endothelzellen, welches die luminaire Wand von Lymph- und Blutgefäßen auskleidet (96). Im menschlichen Körper bildet es insgesamt eine Fläche von mehr als 4000 m² aus und fungiert als Barriere zwischen Blut und Gewebe (73). Aufgrund der zum Lumen hin gewandten Lokalisation der Endothelzellen gelangen sowohl pathogene Keime, Schadstoffe als auch diverse andere Substanzen über die Blutzirkulation zuerst in direkten Kontakt mit dem Endothel. Die Physiologie und Pathophysiologie von Endothelzellen ist daher von entscheidender Bedeutung, um einerseits die Infektabwehr, andererseits aber auch die Entstehung und Progression von Erkrankungen des menschlichen Körpers zu verstehen (124).

1.1.1 Physiologische Funktionen

Eine der bedeutendsten Aufgaben des Endothels ist die Bildung einer regulierbaren Barriere zwischen dem Gefäßsystem und den Geweben. Um einen regelrechten Stoffaustausch zwischen dem vaskulären System und den Geweben zu gewährleisten, sind die Endothelzellen je nach Funktionsbereich unterschiedlich dicht angeordnet und miteinander verbunden. Die Verbindung der Endothelzellen geschieht über Adhärenskontakte oder Tight-Junctions, welche als Zell-Zell-Kontakte zusammengefasst werden. Man differenziert je nach Stoffaustauschmöglichkeit zwischen kontinuierlichem, diskontinuierlichem und fenestriertem Endothel (127). Während beim diskontinuierlichen Endothel zwischen den Endothelzellen Lücken vorhanden sind, die einen Austausch auch ohne Transportproteine erlauben, können über das kontinuierliche Endothel nur selektive Stoffe via differenzierter Transportkanäle in das Gewebe gelangen. Das fenestrierte Endothel ist durch den Stoffaustausch für hydrophile Substanzen charakterisiert.

Des Weiteren besitzt das Endothel synthetische Eigenschaften, welche sowohl den Blutdruck als auch das Gerinnungssystem beeinflussen. Endothelzellen produzieren einerseits Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin. Beide Stoffe führen zu einer Dilatation der glatten Muskulatur in den Gefäßen, was über eine Lumenerhöhung mit einer Reduktion des Blutdrucks einhergeht (177). Andererseits kann im Endothel auch

eine Synthese von Endothelin erfolgen, welches über vasokonstriktorische Eigenschaften verfügt und eine Blutdrucksteigerung hervorrufen kann (103). Als Regulator des Gefäßtonus kann das Endothel somit die Organdurchblutung je nach Herzzeitvolumen optimieren.

In Bezug auf das Gerinnungssystem nehmen Thrombozyten eine maßgebende Bedeutung ein. Über die endotheliale Synthese von Heparin und Prostaglandinen wird eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation verhindert (131). Darüber hinaus sind Endothelzellen in der Lage, Gewebsplasminogenaktivator (tPA), eine für die Fibrinolyse wichtige Substanz, zu bilden. tPA bewirkt mittels hydrolytischer Spaltung eine Umwandlung von Plasmin zu Plasminogen und ist damit in die Thrombenauflösung involviert (26).

Eine weitere Funktion übernehmen Endothelzellen in der Angiogenese, welche für physiologische Umbauprozesse und Wundheilung essenziell ist. Unter Beteiligung von Wachstumsfaktoren wie z.B. dem Vascular-Endothelial-Growth-Faktor (VEGF) können an bereits bestehenden Gefäßen neue Gefäße über eine Migration und Proliferation von Endothelzellen gebildet werden (2).

Ebenso sind Endothelzellen an Entzündungsprozessen beteiligt (85). Als innerste Schicht im Gefäß- und Lymphsystem treten sie ständig in Kontakt mit körpereigenen und mikrobiellen Substanzen, die eine Aktivierung der Endothelzellen hervorrufen können. Eine Aktivierung von Endothelzellen hat zur Folge, dass Leukozyten an das Endothel binden können und mittels Diapedese durch das Endothel in das darunter befindliche Gewebe einwandern und dort Pathogene eliminieren können (11).

Zusammenfassend kann das Endothel als ein Organ mit vielfältigen Funktionen beschrieben werden. Über die Produktion und Freisetzung sowohl para-, als auch auto- und endokriner Stoffe ist es bedeutend für das Erreichen einer Homöostase im Gefäßsystem (95).

1.2 Endotheliale Dysfunktion als Prädisposition für Erkrankungen

Infolge einer Schädigung des Endothels können Endothelzellen einen Funktionsverlust erleiden, was als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird. Beim Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion liegt demnach unter anderem eine Störung im Bereich des Gefäßtonus vor. Vielmehr handelt es sich um eine Einschränkung der

endothelabhängigen Vasodilatation und der Gefäßpermeabilität im Sinne einer erhöhten Durchlässigkeit für Substanzen und Zellen (15). Zusätzlich dazu ist die Regulation der Adhäsion, Aktivierung und Migration von Leukozyten, Thrombozyten und glatten Muskelzellen beeinträchtigt (80). Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse gehen davon aus, dass eine Endothelverletzung/Dysfunktion das Auftreten kardiovaskulärer und respiratorischer Erkrankungen beeinflusst (42,129,134).

1.2.1 Gefäßtonus und Gerinnung im Rahmen der endothelialen Dysfunktion

Insbesondere Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin nehmen eine Schlüsselrolle in Bezug auf Funktionsstörungen des Endothels ein (4). Beide Substanzen werden in Endothelzellen synthetisiert und wirken an glatten Muskelzellen des Gefäßsystems. NO wird von der NO-Synthase gebildet und ruft eine Stimulation der löslichen Guanylatzyklase hervor. Dieses Enzym bewirkt die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (133). cGMP wirkt als second messenger, indem es über eine Kalium-Kanal-Aktivierung und Calcium-Kanal-Inhibition die Calcium-Konzentration intrazellulär herabsetzt. Dies führt zu einer Verringerung des Gefäßtonus und einer vasodilatatorischen Wirkung (108). Einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzt Prostacyclin, welches mithilfe der Prostacyclin-Synthase ebenfalls in Endothelzellen gebildet wird. Es bindet an G-Protein-gekoppelte Prostacyclin-Rezeptoren, welche auf glatten Muskelzellen lokalisiert sind, und bewirkt so eine Erhöhung des intrazellulären Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (164). Eine erhöhte cAMP-Konzentration im Zellinneren senkt ebenfalls die Calciumkonzentration und besitzt demnach eine relaxierende Wirkung auf Gefäße (97).

Neben dem Einfluss auf den Gefäßtonus fungiert Prostacyclin als Antagonist von Thromboxan-A₂, welches die Thrombozytenaggregation fördert. Es bindet an Thrombozyten an G-Protein-gekoppelte Prostacyclin-Rezeptoren und hemmt über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels die Thrombozytenaggregation (53). Stickstoffmonoxid besitzt ebenfalls thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaften. Über eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration verhindert es die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (106).

Beim Vorliegen einer Funktionsstörung des Endothels ist die Synthese von NO und Prostacyclin vermindert. Die Synthese von Endothelin-1, einem Vasokonstriktor, ist jedoch nicht beeinträchtigt (15,89,109,159,166). Dies hat ein Missverhältnis von

Vasokonstriktion und Vasodilatation zur Folge, respektive einer Erhöhung des Gefäßtonus mit Engstellung der Gefäße. Eine vermehrte Vasokonstriktion führt im nachfolgenden Organ zu einer verringerten Durchblutung. Um dennoch eine ausreichende Durchblutung zu gewährleisten, resultiert reflektiv eine Blutdrucksteigerung mit Erhöhung des Widerstandes im Gefäßsystem (160). Durch die verminderte Expression von NO und Prostacyclin ist bei einer endothelialen Dysfunktion ebenso kein adäquater Gegenspieler zu Thromboxan-A₂ mehr vorhanden. Es überwiegt die Thrombozytenaggregation, was mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergeht (98). Dies birgt die Gefahr, dass durch die Thrombenbildung Gefäße verengt und im äußersten Fall ein Gefäßverschluss resultiert.

1.2.2 Inflammation, Makrophagen im Rahmen der endothelialen Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion manifestiert sich nicht nur in einer Veränderung des Gefäßtonus und Gerinnungsstatus, sondern geht auch mit inflammatorischen Prozessen einher (155). Vielmehr exprimiert das Endothel bei Aktivierung vermehrt inflammatorische Zytokine, Selektine und Adhäsionsmoleküle, welche eine Leukozytenadhäsion mit nachfolgender Diapedese bedingen (148). Diese läuft in einem vierstufigen Prozess ab: Chemotaxis, Rolling, Adhäsion und Migration (116). Durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α erfolgt eine Leukozytenannäherung an die Gefäßwand, was als Chemotaxis bezeichnet wird. Im nächsten Schritt kommt es zu einer Interaktion der angelockten Leukozyten mit den Endothelzellen der Gefäßwand. Endothelzellen exprimieren bestimmte Integrine (E-, P-, L-Selektine), welche von auf den Leukozyten befindlichen Liganden gebunden werden können. Die Leukozyten können sich durch die Selektinbindung rollend auf der Gefäßwand fortbewegen, weshalb dieser Schritt als Rolling bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf werden Leukozyten und Leukozytenintegrine durch Chemokine und andere auf der Oberfläche von Endothelzellen befindliche proinflammatorische Agenzien aktiviert. Es erfolgt eine Adhäsion der Leukozytenintegrine und CAM-Moleküle. Man unterscheidet interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) von vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM). Neben Leukozyten binden auch Integrinrezeptoren von Monozyten und T-Lymphozyten an VCAM und ICAM. Die Bindung führt dazu, dass Zellen nun fest an der Oberfläche von Endothelzellen haften (111).

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse sind neben Endothelzellen Makrophagen von großer Bedeutung (47). Sie zählen zu den Zellen des Immunsystems und kommen in jedem Gewebe vor. Sie besitzen vielfältige Aufgaben im Organismus, unter anderem sind sie für die Phagozytose zuständig und spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Regulation von Entzündungsreaktionen. In der Literatur existieren zwei Phänotypen von Makrophagen, die für inflammatorische Prozesse wichtig sind (174). Makrophagen reagieren auf Stimuli sehr empfindlich und können sich unter dem Einfluss von Zytokinen, bakteriellen Lipopolysacchariden und extrazellulären Matrixproteinen entweder zu M1-Makrophagen oder M2-Makrophagen polarisieren (47). M2-Makrophagen exprimieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β und sind überwiegend an der Bildung extrazellulärer Matrix beteiligt, weshalb sie insbesondere für die Regeneration von Geweben und Wundheilung essenziell sind (130). M1-Makrophagen schütten hingegen proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) sowie zahlreiche Chemokine aus (5). Die Produktion dieser Zytokine führt unter anderem zur Leukozytenadhäsion an Endothelzellen, treibt aber auch diverse andere Inflammationsvorgänge voran.

1.2.3 Migration, Permeabilität und Proliferation im Rahmen der endothelialen Dysfunktion

Die vermehrte Zellmigration im Rahmen der endothelialen Dysfunktion kommt dadurch zustande, dass durch die in Kapitel 1.2.2 erläuterte Integrinbindung die Leukozyten zur Proteasesekretion angeregt werden (38,173). Im Zuge dessen resultiert ein Verlust der Zell-Zell-Kontakte im Endothel, wodurch Lücken im Endothel entstehen. Man bezeichnet dies als beeinträchtigte Barrierefunktion (25). Durch die entstandenen Lücken im Endothel ist die Passage von Stoffen und Zellen, welche unter physiologischen Bedingungen verwehrt geblieben wäre, nun möglich (35). Infolgedessen können Plasmabestandteile wie beispielsweise low density Lipoproteine (LDL), aber auch andere pathogene Stoffe in die Gefäßwände und das subendotheliale Gewebe gelangen. In der Gefäßwand befindliche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können mit LDL reagieren und zu einer Oxidation der LDL führen (178). Über oxidierte LDL wird das Endothel erneut aktiviert und die Synthese von Zytokinen und Chemokinen induziert (9). Dies führt dazu, dass glatte Muskelzellen, welche sich normalerweise in der Tunica media von Gefäßwänden befinden, zur Proliferation angeregt werden (91). Einerseits entsteht so eine Mediahyperplasie, andererseits wandern glatte Muskelzellen nun auch in die Tunica

intima ein, was eine Dickenzunahme auch der Tunica intima zur Folge hat (57). Die Intima-Media-Hyperplasie ruft eine Verengung des Gefäßdurchmessers hervor. Durch die erhöhte Permeabilität können auch diverse andere Zellen die Endothelschicht durchdringen. Dies hat zur Folge, dass neben glatten Muskelzellen auch Entzündungszellen zwischen die Intima und Media einwandern können und sich die Zusammensetzung der Zellen in der Gefäßwand verändert. Die Gefäßläsion vergrößert sich und eine weitere Lumenobliteration entsteht als Resultat. Neben einer verstärkten Lumenobliteration kann eine vermehrte Migration von Entzündungszellen eine Ruptur von bereits bestehenden Läsionen zur Folge haben. Durch die zusätzliche Expression von Zytokinen und Proteasen führt eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen Zellen dazu, dass die Plaque noch instabiler wird und die Bindegewebsstruktur so geschwächt wird, dass eine Plaqueruptur resultieren kann (58).

Die genannten Umbauprozesse werden unter dem Begriff „Vaskuläres Remodeling“ zusammengefasst. Vaskuläres Remodeling ist bei der Entstehung und Progression zahlreicher Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzerkrankung, aber auch der pulmonalen Hypertonie beteiligt (61,154).

Die endotheliale Dysfunktion, welche eine veränderte Permeabilität und Proliferation impliziert, ist demnach einerseits als Initiator für vasale Umbauprozesse maßgeblich für die Krankheitsentstehung verantwortlich. Andererseits ist sie neben der Initiation ebenso an der Krankheitsprogression beteiligt.

1.2.4 Apoptose im Rahmen der endothelialen Dysfunktion

Ein weiteres Charakteristikum der endothelialen Dysfunktion ist eine veränderte Apoptoserate. Die endotheliale Dysfunktion ist wie bereits an anderer Stelle erwähnt mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit assoziiert (59). NO zählt zu den Antioxidantien und wird zum Schutz vor der schädigenden Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies benötigt. ROS werden einerseits bei physiologischen Zellvorgängen wie Prozessen der Zellatmung gebildet. Andererseits wird ihre Bildung auch durch exogene Substanzen (Rauch, UV-Licht und diverse andere Umweltschadstoffe) gefördert (60). Beim Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion ist das antioxidative Potential, insbesondere durch die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit, nicht ausreichend, sodass der Organismus oxidativem Stress ausgesetzt wird (46). Oxidativer Stress beeinflusst biologische

Zellvorgänge, so auch apoptotische Prozesse, welche durch oxidativen Stress induziert werden können (60).

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Es handelt sich somit um einen kontrollierten Prozess, an dessen Ende das Absterben der Zelle steht. Die Apoptose geht mit charakteristischen Veränderungen einher. Zunächst erfolgt ein Volumenverlust des Zytoplasmas und des Zellkerns und es bilden sich blasenförmige Ausbuchtungen an der Plasmamembran. Der Zellkern zerfällt durch eine Kondensation und Degradierung der DNA. Im weiteren Verlauf werden die Mitochondrien abgebaut und Cytochrom c wird freigesetzt. Dies führt nachfolgend zu einer Fragmentierung der Zelle in membranumhüllte Säckchen, sog. Apoptosekörperchen (137). Anschließend präsentieren die Apoptosekörperchen Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche. Makrophagen besitzen bestimmte Rezeptoren, die Phosphatidylserin binden können und die Phagozytose der Zellfragmente einleiten (141).

Die Apoptose kann durch verschiedene Stimuli eingeleitet werden, die einen komplexen Signalweg in der Zelle auslösen. Man unterscheidet einen extrinsischen von einem intrinsischen Signalweg.

Der extrinsische Weg wird überwiegend durch äußere Einflüsse wie beispielsweise Toxine, UV-Strahlen oder Viren eingeleitet (34). Die Aktivierung der Signalkaskade wird über Liganden vermittelt, die an sog. Todesrezeptoren auf der Zellmembranoberfläche binden. Unter den Todesrezeptoren werden Subtypen der TNF-Rezeptor-Familie zusammengefasst. Durch die Ligandenbindung wird über die Rekrutierung von Adaptermolekülen wie FADD und Pro-Caspase 8 der DISC (Death inducing signaling complex) gebildet. Dies führt zur Aktivierung der Caspase 8, welche nun als Initiatorcaspase agiert und die Effektorcaspasen 3,6 und 7 aktiviert. Sie zählen zu den Proteasen und rufen eine Zellfragmentierung hervor (54,76).

Stimuli für den intrinsischen Signalweg sind hingegen endogene Faktoren wie Erbgutschäden, osmotischer Stress oder der Entzug von Wachstumsfaktoren (114). Diese aktivieren den Transkriptionsfaktor p53, welcher zu einer vermehrten Produktion des proapoptotischen Bad-Proteins führt. Das Bad-Protein induziert die Aktivierung des Bax-Proteins, welches eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran bewirkt. Folglich tritt Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytosol aus und bildet dort mit Pro-Caspase 9 und Apaf-1 einen Komplex, das sog. Apoptosom. Die Komplexbildung führt

zur Aktivierung von Caspase 9, welche wiederum in der Lage ist, die Effektorcaspasen zu aktivieren (54).

Bei beiden Signalwegen handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, wodurch sichergestellt wird, dass der Zelltod nicht fälschlich oder zufällig ausgelöst wird. Er ist vielmehr genetisch determiniert, was bedeutet, dass beispielsweise während der Embryonalentwicklung bestimmte Strukturen im Organismus zunächst angelegt werden und später durch apoptotische Prozesse zugrunde gehen (167). Zudem ist der programmierte Zelltod nicht nur im Entwicklungsstadium von essenzieller Bedeutung, sondern ist auch für den Funktionserhalt des vollständig entwickelten Organismus unerlässlich. Mithilfe der Apoptose werden entartete oder schädliche Zellen aus dem Gewebe entfernt. Zudem verhindert die Apoptose die unkontrollierte Proliferation von Geweben und reguliert somit die Größe der einzelnen Gewebe (74). Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass die Apoptose essenziell für die Aufrechterhaltung einer Homöostase ist. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Veränderung in apoptotischen Prozessen die Entwicklung zahlreicher Krankheiten begünstigen kann (172). Die endotheliale Dysfunktion scheint demnach über die Induktion von oxidativem Stress und Apoptose die Gewebshomöostase aus dem Gleichgewicht zu bringen.

1.3 Risikofaktoren für endotheliale Dysfunktion

Eine endotheliale Dysfunktion wird durch eine Aktivierung von Endothelzellen hervorgerufen. Dies geschieht überwiegend an Stellen im Gefäßsystem, die erhöhten Scherkräften und Turbulenzen ausgesetzt sind. Über die veränderte Blutflussdynamik sind diese Stellen prädisponiert, eine Formveränderung zu erfahren, was mit einer Aktivierung von Endothelzellen einhergeht (128). Ebenso existieren andere physiologische Reize, die eine endotheliale Dysfunktion begünstigen, wie beispielsweise ein erhöhtes Alter oder ein hormonelles Ungleichgewicht während der Menopause (110,156). Neben den physiologischen Triggern gelten bestimmte Krankheiten als Risikofaktoren für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Hierzu zählt das Vorliegen einer Hypercholesterinämie, eines Diabetes mellitus oder eines arteriellen Hypertonus (41,123,144). Zusätzlich dazu sind einige Pathogene sowie Noxen ebenfalls in der Lage, eine endotheliale Dysfunktion via Aktivierung von Endothelzellen hervorzurufen (79). Hierunter werden bakterielle Toxine und Viren sowie diverse

Umweltfaktoren zusammengefasst. Umweltfaktoren wie Zigarettenrauch, Holzrauch und Feinstaub haben daher in den letzten Jahren in der wissenschaftlichen Forschung an Bedeutung gewonnen.

1.4 Zigarettenrauch

Zigarettenrauch gilt als einer der wichtigsten exogenen Faktoren, der das Entstehen von Erkrankungen begünstigt und zur Exazerbation von bereits bestehenden Krankheiten führen kann. Zigarettenrauch tangiert nahezu jedes Organ des menschlichen Körpers und verursacht dort reversible, teils aber auch irreversible Veränderungen. Demzufolge erhöht Zigarettenrauch das Risiko für Schlaganfälle, Krebserkrankungen, kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen und beeinträchtigt die Fertilität (32,143).

Studien zufolge führt Langzeitkonsum zu einem früheren Tod. Nahezu jeder zweite Raucher verstirbt frühzeitig aufgrund einer durch Rauch-assoziierten Krankheit im Vergleich zu Nichtrauchern (33). Es wird vermutet, dass aktuell jeder achte Tod auf die Folgen des Zigarettenkonsums zurückzuführen ist. Nicht zu vernachlässigen ist in diesem Zusammenhang, dass auch Passivrauchen gesundheitsschädigende Auswirkungen auf den menschlichen Organismus hat (17). Aufgrund der schädigenden Langzeitwirkung von Zigarettenrauch auch über den Konsum hinaus sind selbst bei Zigarettenentwöhnung die Morbiditäts- und Mortalitätsraten weiterhin von immenser Bedeutung (120).

Die mannigfaltigen Auswirkungen von Zigarettenrauch kommen dadurch zustande, dass Zigarettenrauch aus einer Vielzahl an Komponenten besteht. Die exakte Zusammensetzung ist bis dato nicht vollumfänglich erforscht, es konnten aber bereits ca. 4800 Inhaltsstoffe erfasst werden. Neben Nikotin sind in Zigarettenrauch als wesentliche Bestandteile Wasserdampf, Nitrosamine, Kohlenmonoxid, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Blausäure, Formaldehyd, Cadmium und freie Radikale vertreten (64). Nahezu 100 identifizierte Inhaltsstoffe werden als Karzinogene, Cokarzinogene oder Mutagene eingestuft (64).

Neben der exakten Komposition ist ebenso nicht vollständig geklärt, welcher Pathomechanismus zur Entstehung und Progression von Zigarettenrauch-assoziierten Erkrankungen führt. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, scheint die endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einzunehmen.

Wissenschaftliche Erkenntnisse ergaben, dass Zigarettenrauch einen wesentlichen Trigger für das Entstehen einer Funktionsstörung des Endothels darstellt (21,36,88).

Eine endotheliale Dysfunktion geht, wie an anderer Stelle bereits ausführlich erläutert, mit einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation einher. In diesem Zusammenhang konnte in vivo nachgewiesen werden, dass Zigarettenrauchkonsum sowohl aktiv als auch passiv zu einer reduzierten Vasodilatationsfähigkeit führt (52,88). Anknüpfend daran wurde festgestellt, dass Zigarettenrauch in Endothelzellen die Produktion des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxid inhibiert (66).

Des Weiteren scheint Zigarettenrauch auch einen Einfluss auf die endogene Synthese reaktiver Sauerstoffspezies im menschlichen Organismus zu nehmen und zu oxidativem Stress zu führen. So wurde in vitro und in Tierexperimenten eine vermehrte Aktivität der NADPH-Oxidase nach Zigarettenrauchexposition registriert. Nachfolgend konnten auch erhöhte Superoxidanionenspiegel gemessen werden (1,22,176).

Funktionsstörungen im Endothel manifestieren sich neben einer veränderten Vasodilatation ebenso durch eine erhöhte Rate an inflammatorischen Prozessen und Zellmigrationen. Diesbezüglich beobachteten Lavi et al., dass Raucher im Vergleich zu einer nichtrauchenden Kontrollgruppe erhöhte Spiegel diverser proinflammatorischer Zellen (Neutrophile, Lymphozyten und Monozyten) aufweisen (87). Daran anlehnend beschäftigte sich die Forschungsgruppe Barbieri et al. mit der Rate im Blut zirkulierender inflammatorischer Zytokine bei Rauchern und Nichtrauchern. Sie stellten einen Anstieg der proinflammatorischen Marker IL-1 und TNF- α im Serum von Rauchern fest (6). In Tierexperimenten konnte ebenso nachgewiesen werden, dass die Exposition mit Zigarettenrauch zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie bspw. IL-1 β , IL-6 und TNF- α führt (72,121). Ebenso scheint Zigarettenrauch die Migration von Zellen in den subendothelialen Raum zu unterstützen. Entsprechend wurde in Endothelzellen eine vermehrte Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 und E-Selektin nach Zigarettenrauchbehandlung gemessen (24,142).

Des Weiteren konnten zahlreiche experimentelle Untersuchungen demonstrieren, dass Zigarettenrauch eine physikalische Schädigung am Endothel hervorruft. Im Wesentlichen können zwei Formen des Endothelschadens unterschieden werden. Einerseits führt Zigarettenrauch zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli, welches konsekutiv an Endothelzellen eine Kontraktion bewirkt (10). Andererseits kann Zigarettenrauch

zytotoxisch wirken, indem er den endothelialen Zelltod herbeiführen kann. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass Zigarettenrauch zum einen apoptotische Prozesse induzieren kann (107,135,162). Zum anderen kann die Exposition mit Zigarettenrauch auch die Nekrose von Endothelzellen zur Folge haben (107).

1.5 Holzrauch

Neben Zigarettenrauch gewinnt auch Holzrauch an wissenschaftlichem Interesse. Bei Holzrauch handelt es sich um eine Mischung aus toxischen Gasen (z.B. Kohlenstoffmonoxid, Kohlenstoffdioxid und Stickstoffdioxid) sowie halbfesten und rußhaltigen Partikeln. Bei der Verbrennung von Holz werden hohe Konzentrationen an Feinstaub generiert. Insgesamt konnten bereits über 400 Komponenten identifiziert werden, die in Holzrauch enthalten sind. Bei den einzelnen Stoffen handelt es sich um Fette, Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester, Furane oder Phenole (157). Die chemische Zusammensetzung variiert je nach verbranntem Material, Alter des Materials, Mechanismus/Temperatur der Verbrennung und Feinstaubgröße (140).

Weltweit werden gerade bei kälteren Temperaturen offene Feuerstellen sowie Holzpellet-Öfen zur Erzeugung von Wärme verwendet. Insbesondere in Entwicklungsländern stellt Holz immer noch den wichtigsten Energieträger dar. So werden beispielsweise in ärmeren Regionen auch heutzutage noch offene Holzöfen oder Feuerstellen ohne Abzug nicht nur zum Heizen, sondern auch zum Kochen benutzt (140). Aufgrund der aktuell steigenden Gas- und Ölpreise könnten auch in Industrieländern Verbraucher künftig wieder kostengünstigere Materialien wie Holz zur Energiegewinnung nutzen.

Dass das Verbrennen von Holz gesundheitliche Risiken birgt, konnte bereits in epidemiologischen Studien demonstriert werden. Insbesondere die bei der Holzverbrennung emittierten Feinstäube und flüchtigen organischen Komponenten (z.B. Aldehyde) tragen einen wesentlichen Teil zur Krankheitsentstehung und -progression bei (3,20). In einer Studie von Laumbach et al. wurde festgestellt, dass durch die Exposition mit verbranntem Holz oder anderer Biomasse bereits bestehende respiratorische Erkrankungen wie COPD oder Asthma exazerbieren können. Weiterhin kann Holz-/Biomasserauch die Anzahl respiratorischer Infektionen erhöhen (86). Auch konnte in einer anderen Studie ein gehäuftes Auftreten von Lungenkrebs bei Holz-/Biomasse-exponierten Personen nachgewiesen werden (31). Neben Lungenerkrankungen konnte auch eine Assoziation von kardiovaskulären Erkrankungen und der Emission von

Holzrauch beobachtet werden. Beispielsweise konnte ein Zusammenhang von ischämischen Herzerkrankungen und Schlaganfällen bei Feinstaubemissionen im Zuge von Holzverbrennungen nachgewiesen werden (45). Weiterhin wurde in einer doppelblinden Crossover-Studie beobachtet, dass eine Holzrauchexposition zu einer vermehrten Gefäßsteifigkeit von Arterien und einer reduzierten Herzfrequenzvariabilität führt (163). Schätzungsweise werden 3-4 Millionen Tote pro Jahr mit dem Verbrennen von Holz und anderer Biomasse in Zusammenhang gebracht (86).

Der genaue Mechanismus, wie Holzrauch zur Krankheitsentstehung und -progression beiträgt, ist bis dato nicht genau bekannt. Einige Forschungen ergaben jedoch Hinweise darauf, dass Holzrauch zelluläre Funktionen und inflammatorische Prozesse beeinflusst.

Beispielsweise wurden in einer Studie spezifische Biomarker, die mit endothelialer Inflammation in Verbindung stehen, im Serum von in Entwicklungsländern lebenden Menschen gemessen. Diese ergab, dass die Exposition mit Holzrauch im menschlichen Organismus zur erhöhten Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin führt (19).

Auch auf die Synthese anderer Inflammationsmarker nimmt Holzrauch einen Einfluss. So konnten Falfán-Valencia et al. beobachten, dass die Spiegel von IL-1RA, IL-6 und IL-8 im Serum Biomasse-exponierter Menschen im Vergleich zu Nicht-Exponierten höher ausfallen (39). Korrespondierend dazu wurde auch in Zellkulturexperimenten eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Marker wie VCAM-1, IL-6, IL-8, TNF- α und GM-CSF nachgewiesen (14,44,105).

Neben seiner proinflammatorischen Wirkung entfaltet Holzrauch auch andere zelluläre Wirkungen. Um die Frage nach einer möglichen Zelltoxizität durch Holzrauch zu beantworten, wurde eine Studie an Endothelzellen der Lunge durchgeführt. In dieser wurde dargelegt, dass die Exposition mit Holzrauch einerseits zu einer Generierung reaktiver Sauerstoffspezies führt, andererseits auch die Apoptoserate in Endothelzellen erhöht (92). Anknüpfend daran konnte in einem anderen Zellkulturexperiment an humanen endothelialen mikrovaskulären Endothelzellen erforscht werden, dass Holzrauch DNA-Strangbrüche sowie erhöhte LDH-Spiegel (Marker für Zelllyse) zur Folge hat (44).

Weiterhin wurde der Einfluss von Holzrauch auf die Barrierefunktion untersucht. In einem Tierexperiment an Mäusen konnte beobachtet werden, dass Holzrauch zu einer

veränderten Expression von Tight-Junctions-Proteinen führt, was die zelluläre Barrierefunktion beeinflussen könnte (43). In Analogie hierzu wurde in Epithelzellen unter dem Einfluss von Holzrauch eine verringerte Expression von E-Cadherin gemessen, was in einer reduzierten Barrierefunktion resultiert (175).

1.6 Cyclooxygenasen, Eicosanoide und deren Signalwege

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse, welche für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mitverantwortlich sind, sind neben Zellen und proinflammatorischen Botenstoffen ebenfalls Enzyme von entscheidender Bedeutung. Insbesondere Cyclooxygenasen, welche Arachidonsäure verstoffwechseln und so die Produktion von Eicosanoiden (Prostaglandine und Thromboxane) katalysieren, sind in inflammatorische Vorgänge involviert (149).

Sie kommen im Lumen der Zellkernhülle, im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum vor. Cyclooxygenasen werden in zwei für den menschlichen Organismus relevante Isoformen unterteilt. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 65 % identisch, sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Lokalisation und Regulation (146).

Die Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird konstitutiv in fast allen Gewebetypen exprimiert (119). Hohe Konzentrationsspiegel von COX-1 sind beispielsweise im Magen und in der Niere detektierbar. Im Gastrointestinaltrakt wird via COX-1 PGE₂ und PGI₂ synthetisiert, welche eine protektive Wirkung in Bezug auf das Auftreten von Ulzerationen und Blutungen im GI-Trakt besitzen. Der Schutz vor Blutungen und Ulzerationen wird in erster Linie durch eine Steigerung der Bikarbonat-Produktion und Schleimsekretion sowie einer Reduktion von Magensäure und Pepsin erreicht (28). In der Niere wird über die Bildung von PGE₂ und PGI₂ durch COX-1 die Nierendurchblutung und somit auch die glomeruläre Filtrationsrate gesteigert (67). Ebenso kommt COX-1 in Thrombozyten vor und führt durch die Produktion von Thromboxan A₂, welches eine Vasokonstriktion bewirkt, zu einer Thrombozytenaggregation (153). Eine COX-1-Expression lässt sich auch in Endothelzellen gesunder Blutgefäße nachweisen. COX-1 initiiert am Endothel die Synthese von Prostacyclin und fungiert somit sowohl als Vasodilatator als auch als Thrombozytenaggregationshemmer (78). Insgesamt erfüllt die Cyclooxygenase-1 überwiegend Funktionen, die zum Zellschutz und zur Aufrechterhaltung einer Gewebshomöostase erforderlich sind und ihr Vorkommen ist somit in sämtlichen Körperzellen von essenzieller Bedeutung.

Die Cyclooxygenase-2 wird im Gegensatz zur Cyclooxygenase-1 nur in bestimmten Körperregionen wie beispielsweise den Organen des Gastrointestinaltraktes, dem Thymus, dem Gehirn und der Niere konstitutiv exprimiert (77). COX-2 ist insbesondere an Orten, an denen eine Entzündungsreaktion vorherrscht, vorzufinden. Die Expression von COX-2 ist beispielsweise bei Infektionen und Tumorgeschehen nachweisbar (113). Ein weiterer Unterschied zur Cyclooxygenase-1 besteht darin, dass COX-2 ein induzierbares Enzym darstellt, wobei die Syntheserate von COX-2 durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen erhöht wird. Ebenso bewirken auch Endotoxine, Mitogene und Tumorentagen eine Steigerung der COX-2-Produktion (151). Aufgrund dessen gehen wissenschaftliche Forschungen davon aus, dass COX-2 an der Induktion von pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen maßgeblich mitbeteiligt ist (165).

Beiden Isoformen ist gemeinsam, dass sie im Arachidonsäurestoffwechsel die gleiche enzymatische Reaktion katalysieren (158). Als Arachidonsäure bezeichnet man eine ungesättigte ω -6-Fettsäure, welche als Grundlage für die Eicosanoid-Produktion benötigt wird (102). Arachidonsäure liegt in Lipiden der Zellmembran als Linolsäure vor und kann bei Bedarf durch die Phospholipase A2 abgespalten/freigesetzt werden. Die freigesetzte und biologisch aktive Arachidonsäure kann über drei verschiedene Wege metabolisiert werden. Via Lipoxygenasen kann Arachidonsäure einerseits zu 5-Hydroxyperoxyarachidonsäure (5-HPETE) und Leukotrienen umgewandelt werden (136). Cytochrom-P450-Enzyme katalysieren andererseits über eine Epoxidation oder Hydroxylierung die Produktion von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) und Hydroxyeicosatriensäuren (HETE) (18). Bei dem dritten Weg handelt es sich um den Cyclooxygenase-Weg, der im Folgenden näher beschrieben wird.

Über die Addition von zwei Sauerstoffmolekülen an den Kohlenstoffatomen 9 und 11 sowie einen Ringschluss zwischen C8 und C12 wird im ersten Schritt Arachidonsäure zu Prostaglandin-G₂, einem instabilen Zwischenprodukt, umgewandelt. In Abhängigkeit von Glutathion wird als Nächstes am C15-Atom eine Reduktion von einer Hydroperoxidgruppe in eine Hydroxygruppe katalysiert, sodass Prostaglandin-H₂ (PGH₂) entsteht (152). Die durch die Cyclooxygenase hervorgerufene Reaktion wird als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Prostaglandinbildung angesehen, da PGH₂ als Ausgangssubstanz für die Umwandlung in andere Prostaglandine und Thromboxane dient.

Ein wichtiger Vertreter der Prostaglandine ist das Prostacyclin (PGI₂), welches unter dem Einfluss der Prostacyclinsynthase (PTGIS) aus PGH-2 gebildet wird. Prostacyclin bindet an Prostacyclin-Rezeptoren (IP-Rezeptoren), welche auf der Zellmembran von Endothelzellen und Thrombozyten vorkommen. Die vielfältigen Wirkungen von Prostacyclin wurden bereits im Kapitel 1.2.1 beschrieben. Aufgrund dieser Eigenschaften kann ein Mangel an Prostacyclin laut wissenschaftlichen Erkenntnissen eine Prädisposition für das Auftreten sowohl respiratorischer als auch kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen (42,134). Der Syntheseweg von Prostacyclin, einschließlich des Cyclooxygenaseweges, könnte demnach eine entscheidende Rolle bei dem Verständnis von Erkrankungen, bei denen inflammatorische Prozesse im Vordergrund stehen, spielen.

1.7 Klinische Relevanz der endothelialen Dysfunktion am Beispiel der pulmonalen Hypertonie

1.7.1 Definition und Klinik

Die pulmonale Hypertonie (PH) fasst eine Gruppe progressiver Erkrankungen der Lungengefäße zusammen, welchen als Gemeinsamkeit eine chronische Erhöhung des Druckes in der Pulmonalarterie zugrunde liegt (132). Der pulmonal-arterielle Mitteldruck beträgt bei Betroffenen definitionsgemäß ≥ 25 mmHg in Ruhe (69).

Patienten, die unter pulmonaler Hypertonie leiden, zeigen zunächst eine unspezifische Symptomatik. Im Anfangsstadium der Erkrankung klagen Betroffene aufgrund des reduzierten pulmonalen und/oder zerebralen Blutflusses über Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel und eine eingeschränkte körperliche Belastbarkeit. Diese präsentiert sich bei den Patienten in Form von Husten, Dyspnoe oder Synkopen in Belastungssituationen. Unter Ruhebedingungen treten diese Beschwerden in der Regel nicht auf, weshalb die Diagnose pulmonale Hypertonie häufig als Zufallsbefund auffällt. Bei Progression der Erkrankung treten die o.g. Symptome jedoch auch in Ruhe auf, zusätzlich kann eine Zyanose erkennbar sein (94). Letztendlich ist aufgrund des verminderten Auswurfvolumens des rechten Herzens auch die Entwicklung einer Rechtsherzinsuffizienz möglich. Diese manifestiert sich typischerweise durch eine Hepatomegalie, periphere Ödeme, Aszites und gestaute Halsvenen (84). Die zunehmende Abnahme der Herzauswurfleistung kann ein komplettes Rechtsherzversagen mit Todesfolge bedingen.

1.7.2. Epidemiologie & Einteilung

Die pulmonale Hypertonie tritt in der Weltbevölkerung mit einer Prävalenz von 1 % auf. Betrachtet man nur die Personen > 65 Jahre, liegt die Erkrankungsrate bereits bei 10 % (63). Aufgrund vielfältiger Ursachen werden bei der pulmonalen Hypertonie gemäß Nizza-Klassifikation fünf Gruppen unterschieden (147). Die Gruppeneinteilung orientiert sich an der Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) und der European Respiratory Society (ERS) von 2015 (50). Die Einteilung erfolgt anhand ähnlicher Pathophysiologie und klinischer Leitsymptomatik, sodass gleichartige Therapieprinzipien angewendet werden können. Tabelle 1 stellt die genaue Einteilung dar.

<u>Klassifikation der pulmonalen Hypertonie</u>
<p>1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)</p> <p>1.1 Idiopathische PAH</p> <p>1.2 Hereditäre PAH</p> <p>1.3 Medikamenten- oder Toxin-induzierte PAH</p> <p>1.4 PAH assoziiert mit</p> <p>1.4.1 Bindegewebserkrankungen</p> <p>1.4.2 HIV-Infektion</p> <p>1.4.3 Portale Hypertension</p> <p>1.4.4 Angeborenen Herzfehlern</p> <p>1.4.5 Schistosomiasis</p> <p>1.5 PAH mit gutem Langzeit-Ansprechen auf Calcium-Kanal-Blocker</p> <p>1.6 PAH mit offensichtlichen Hinweisen auf eine pulmonalvenöse/kapilläre (PVOD/PCH) Beteiligung</p> <p>1.7 Persistierende PH des Neugeborenen</p>
<p>2. PH bei Linksherzerkrankungen</p> <p>2.1 PH bei Herzversagen mit erhaltener linksventrikulärer Auswurfraction (LVEF)</p> <p>2.2 PH bei Herzversagen mit reduzierter LVEF</p> <p>2.3 Herzklappenerkrankungen</p> <p>2.4 Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Anomalien, die zu einer postkapillären PH führen</p>
<p>3. PH infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie</p> <p>3.1 Obstruktive Lungenerkrankung</p> <p>3.2 Restriktive Lungenerkrankung</p> <p>3.3 Andere Lungenerkrankung mit gemischt restriktivem/obstruktivem Muster</p> <p>3.4 Hypoxie ohne Lungenerkrankung</p> <p>3.5 Entwicklungsbedingte Lungenerkrankungen</p>
<p>4. PH infolge von Obstruktionen der Pulmonalarterien</p> <p>4.1 Chronisch thromboembolische PH</p> <p>4.2 Andere pulmonal-arterielle Obstruktionen</p>
<p>5. PH mit unklarem und/oder multifaktoriellem Mechanismus</p> <p>5.1 Hämatologische Erkrankungen</p> <p>5.2 Systemische und metabolische Erkrankungen</p> <p>5.3 Andere</p> <p>5.4 Komplexe angeborene Herzfehler</p>

Tabelle 1: Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach (147))

1.7.3 Pathophysiologie und Pathogenese

Bei der pulmonalen Hypertonie liegt definitionsgemäß ein erhöhter pulmonal-arterieller Druck vor, der durch eine Gefäßobliteration und eine verminderte Elastizität der Gefäßwand hervorgerufen wird (70,150). Man geht davon aus, dass die pulmonale Hypertonie auf einer multifaktoriellen Genese beruht (168).

Pathophysiologisch betrachtet liegt der pulmonalen Hypertonie eine Strukturveränderung in den Lungengefäßen zugrunde. Genauer gesagt findet in allen drei Gefäßwandschichten (Intima, Media, Adventitia) eine unkontrollierte Proliferation statt, die zu einem vaskulären Remodeling der Pulmonalgefäße führt. Mit dem Begriff vaskuläres Remodeling werden Umbauvorgänge wie Zellhypertrophie, -hyperplasie und vermehrte Synthese von extrazellulärer Matrix beschrieben (161). Die Umbauprozesse umfassen hauptsächlich eine Intimaverdickung, eine Proliferation der Media sowie einen Umbau der Adventitia (23). Zusätzlich dazu ist das Auftreten sogenannter plexiformer Läsionen bei der pulmonalen Hypertonie von pathophysiologischer Bedeutung (27). Plexiforme Läsionen bestehen aus proliferierenden Endothelzellen, welche von Myofibroblasten, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix umgeben werden und bilden sich bevorzugt an Gefäßverzweigungen (122). Folglich können auch plexiforme Läsionen das Gefäßlumen an einer definierten Stelle einengen und zu einem lokalen Verschluss führen (99).

Bis dato ist nicht genau erforscht, welche Faktoren initial an der Entstehung des erhöhten pulmonal-arteriellen Widerstandes beteiligt sind. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass eine gestörte Gefäßverengung von entscheidender Bedeutung ist, da diese bereits am Anfang der Pathogenese vorzufinden ist. Die pathologische Vasokonstriktion scheint auf einer endothelialen Dysfunktion zu beruhen, die ein Missverhältnis von vasokonstriktorisches und vasodilatativen Stoffen zur Folge hat (83).

1.7.4 Rauch als Risikofaktor für pulmonale Hypertonie

Laut aktuellem Forschungsstand scheint die pulmonale Hypertonie bei bestimmten Vorerkrankungen und Risikokonstellationen gehäuft aufzutreten. Die Einteilung der pulmonalen Hypertonie in verschiedene Subtypen verdeutlicht bereits die Multifaktorialität. Beispielsweise kann die Einnahme bestimmter Medikamente oder das

Vorliegen einer Autoimmunerkrankung oder einer HIV-Infektion das Auftreten einer pulmonalen Hypertonie begünstigen.

Neben genetischen Faktoren scheinen auch Umweltfaktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. Insbesondere die Exposition mit Zigarettenrauch wird als vermeintlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie angesehen. Ergebnisse aus Tierversuchen von Ferret et al. zeigten, dass die kontinuierliche Exposition mit Zigarettenrauch in einem Meerschweinchen-Modell zu einer reduzierten endothel-abhängigen Vasodilatation der Pulmonalarterien führt. In den Lungen der Versuchsobjekte präsentierten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigte eNOS-Level. Des Weiteren deuten die Resultate auf ein vaskuläres Remodeling durch Zigarettenrauch hin. Nachweislich zeigte sich in Rauch-exponierten Objekten eine vermehrte Proliferation von schlecht differenzierten glatten Muskelzellen in kleinen Gefäßen. Eine prolongierte Exposition mit Zigarettenrauch führt laut Studienergebnissen sogar neben einer vermehrten Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße zu einer Verdickung der Gefäßwand einhergehend mit gesteigerter Kontraktilität und Vergrößerung der Alveolarräume (40). In Tierstudien von Wright et al. wurden korrespondierende Forschungsergebnisse erzielt. Sowohl in Ratten als auch in Meerschweinchen traten nachweislich nach Rauchexposition erhöhte mRNA-Spiegel und Proteinlevel des Vasokonstriktors Endothelin-1 sowie VEGF auf (170,171). Zusätzlich wurde eine Druckerhöhung in den Pulmonalarterien der Versuchstiere gemessen (170). Neben Tierexperimenten wurde eine Assoziation von Zigarettenrauch mit der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie in menschlichen Individuen untersucht. In einer Multicenter-Studie von über 400 Patienten konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei ca. 50 % der PH-Patienten um aktive Raucher handelte, wovon 71 % männlich waren. Von den nichtrauchenden weiblichen PH-Patienten wurden wiederum 50 % als Passivraucher eingestuft, was einen Zusammenhang zwischen der Exposition mit Zigarettenrauch und der Pathogenese der PH vermuten lässt (75).

1.7.5.1 Therapie

Nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen ist eine Heilung der pulmonalen Hypertonie derzeit nicht möglich. Die Therapie der pulmonalen Hypertonie gestaltet sich vielfältig, mit dem Ziel, die Symptome der Erkrankung zu lindern, ein Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern (62).

Falls die pulmonale Hypertonie im Zuge einer anderen Grunderkrankung entstanden ist, besteht die Therapie in erster Linie aus der Behandlung der Grunderkrankung (100).

Unabhängig davon, welche Form der pulmonalen Hypertonie vorliegt, sind sog. Allgemeinmaßnahmen im Rahmen der Therapie zu empfehlen. Hierzu zählen beispielsweise ein unter ärztlicher Kontrolle durchzuführendes moderates Ausdauertraining, ein vollständiger Impfstatus und psychologische Unterstützung (56).

In der Regel erfolgt zusätzlich zu den Allgemeinmaßnahmen eine medikamentöse Therapie. Man unterscheidet zwischen supportiven Therapieoptionen und spezifischen Therapeutika. Supportive Therapeutika werden eingesetzt, um das Risiko für Komplikationen im Rahmen der pulmonalen Hypertonie zu verringern. Aufgrund einer erhöhten Neigung zur Thrombenbildung werden je nach individuellem Risikoprofil orale Antikoagulantien verabreicht (8,48). Liegt eine Rechtsherzinsuffizienz mit einem resultierenden Flüssigkeitsrückstau in den Körper vor, werden Diuretika in das Therapieschema eingebunden (49). Zur Steigerung der Ejektionsfraktion des rechten Herzens finden Herzglykoside Anwendung (126). Neben der Risikoreduktion für das Auftreten von Folgezuständen im Rahmen der pulmonalen Hypertonie ist die Gabe von Sauerstoff als Therapieoption ebenso zu empfehlen, um den Allgemeinzustand bzw. das subjektive Befinden des Patienten zu verbessern (55).

Eine weitere wichtige Therapiensäule bildet die spezifische medikamentöse Therapie, welche ihre Wirkung direkt an den pulmonalen Gefäßen entfaltet. In der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie und insbesondere im Rahmen der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion sind größtenteils drei Signalwege von maßgebender Bedeutung. Als spezifische Therapeutika finden einerseits Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, welche die vasokonstriktorische Wirkung von Endothelin-1 durch Blockierung von Rezeptorbindungsstellen abschwächen, Anwendung (51). Andererseits kommen Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren zum Einsatz, welche beide am Stickstoffmonoxid-Signalweg ansetzen und so eine Gefäßdilatation erzielen (68).

1.7.5.2 Prostacyclinanaloga als Therapiemaßnahme

Bei dem dritten Signalweg handelt es sich um den Prostacyclin-Signalweg, welcher in Kapitel 1.6 ausführlich beschrieben wurde. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie eine verringerte Verfügbarkeit von Prostacyclin

vorliegt. Da Prostacyclin der potenteste Vasodilatator im menschlichen Körper ist, kann ein Prostacyclin-Mangel eine mögliche Ursache für eine überverhältnismäßige Vasokonstriktion der Pulmonalgefäße und das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion sein. Zur Therapie der pulmonalen Hypertonie werden daher häufig Prostacyclinanaloga verschrieben. Ein Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Iloprost, welcher inhalativ angewandt wird. Analog zu Prostacyclin bindet er an Prostacyclinrezeptoren und entfaltet intrazellulär die gleiche Wirkung wie endogenes Prostacyclin (117). Seine Halbwertszeit beträgt 20-25 Minuten (82). 6-10 Minuten nach der Inhalation wird der Effekt von inhaliertem Iloprost durch eine Metabolisierung in einen inaktiven Metaboliten mittels β -Oxidation reduziert (138). Dies hat den Vorteil, dass Iloprost überwiegend lokal an den Pulmonalgefäßen wirkt. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass inhalatives Iloprost aufgrund seiner oben genannten Eigenschaften in der Regel 6–9-mal am Tag eingenommen wird (118).

In einer klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch die Inhalation von Iloprost der mittlere pulmonal-arterielle Druck reduziert wird und die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion gesteigert werden kann (90). Anknüpfend daran haben Kohortenstudien festgestellt, dass seit der Einführung der spezifischen Therapeutika die mittlere Überlebensrate der PH-Patienten enorm gesteigert werden konnte (29).

1.8 Fragestellung

Aktuellen Studien zufolge scheint sowohl die Exposition mit Zigarettenrauch als auch mit Holzrauch das Auftreten von Erkrankungen zu begünstigen. Vielen kardiovaskulären und respiratorischen Erkrankungen liegt laut derzeitiger Forschungslage eine gestörte Endothelfunktion zugrunde, sodass die endotheliale Dysfunktion eine Schlüsselrolle einzunehmen scheint (42,129,134). Über welche Mechanismen und explizite Signalwege Rauchgasextrakte das endotheliale System beeinflussen, ist bis dato nicht vollumfänglich erforscht.

Ziel der nachfolgenden Arbeit ist, die Auswirkung von Zigarettenrauch und Holzrauch auf Endothelzellen zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wird vorrangig eine immortalisierte Zelllinie für die Experimente verwendet. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich daher mit der Charakterisierung der Zelllinie, um zu prüfen, ob es sich bei der vorliegenden Zelllinie um ein geeignetes Modell für Endothelzellen handelt. Im zweiten Teil der Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit Rauchgasextrakte die Funktion von Endothelzellen beeinflussen. Diesbezüglich werden Experimente zu Permeabilität, Apoptose und Nekrose durchgeführt. Zusätzlich soll untersucht werden, ob Zigarettenrauch und Holzrauch neben Endothelzellen auch inflammatorische Zellen beeinflussen. Im Zuge dessen sollen Genexpressionsanalysen zu inflammatorischen Markern (IL-6, TNF- α) an Makrophagen durchgeführt werden.

Bei der endothelialen Dysfunktion ist insbesondere das Missverhältnis von Vasokonstriktion und Vasodilatation von maßgebender Bedeutung für die Pathogenese krankhafter Prozesse. Bei der pulmonalen Hypertonie werden therapeutisch Prostacyclinanaloga eingesetzt, um diesem Ungleichgewicht entgegenzuwirken. Im Zuge dessen soll abschließend untersucht werden, ob Rauchgas auf die Genexpression von Eicosanoiden Einfluss nimmt und die Frage diskutiert werden, ob der Eicosanoid-Signalweg ein möglicher Schlüsselprozess in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion sein könnte. Die Versuche sollen ebenfalls mit dem Prostacyclinanalogon Iloprost durchgeführt werden, um zu prüfen, ob Iloprost einer durch Rauch hervorgerufenen endothelialen Dysfunktion entgegensteuern kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma, Land
6 cm Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Österreich
6-Well-Platten	Greiner Bio-One, Österreich
Cell Strainer	Falcon Corning, USA
Cryo-Box	Sarstedt, Deutschland
Durapore Tape	3M, USA
Falcon 14 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Injektionsspritze 5 ml, 10 ml	B. Braun, Deutschland
Kanülen 27G	BD Microlance, Irland
Multiplate™ PCR Plates 96-well clear	Biorad, USA
Nitrilhandschuhe	B. Braun, Deutschland
Pasteurpipetten	Kimble, USA
PCR-Tubes Flachdeckel	Sorenson BioScience, USA
Pipetboy Integra	Integra-Biosciences, Deutschland
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbe Plus, Deutschland
Probenständer	Eppendorf, Deutschland
Spritzenfilter 0,22 µm	Millipore, USA
T 75 Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Österreich
Tube 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Zellschaber	Becton Dickinson, USA

Tabelle 2: Auflistung generelle Labormaterialien

2.1.2 Reagenzien

Material	Firma, Land
Aqua dest.	B. Braun, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Merck, Deutschland
Ethanol > 99,5 %	Sigma-Aldrich, USA
FCS 2,5 % + FCS 10 %	Sigma-Aldrich, USA
Glucose	Merck, Deutschland
HBSS	Sigma-Aldrich, USA
Iloprost (Ventavis)	Bayer, Deutschland
RNase-freies Wasser	Qiagen, Deutschland
T 75 Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Österreich
Thrombin (gelöst in 0,1 % BSA)	Sigma-Aldrich, USA
TNF- α (gelöst in 0,1 % BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau-markiertes Albumin	Roth, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 3: Auflistung Reagenzien

2.1.3 Kits und enthaltene gebrauchsfertige Reagenzien

Kit, Reagenz	Firma, Land
Abcam ab129817 Kinetic Apoptosis Kit (Microscopy)	Abcam, Vereinigtes Königreich
Elution Solution A	Norgen, Kanada
Norgen RNA Isolation Kit	Norgen, Kanada
Maxima cDNA synthesis Kit	Thermofisher Scientific, USA
5X Reaction Mix	Thermofisher Scientific, USA
Maxima Enzyme Mix	Thermofisher Scientific, USA
RL-Puffer	Norgen, Kanada
Wash Solution A	Norgen, Kanada
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermofisher Scientific, USA

Tabelle 4: Auflistung Kits und enthaltene gebrauchsfertige Reagenzien

2.1.4 Antikörper und Primer(-sequenzen)

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Firma	Katalognummer
Anti-Human CD 105 (Endoglin) PE	eBioscience	12-1057-41
Anti-Human CD 34 FITC	eBioscience	11-03949-41
Anti-Human CD 54 (ICAM-1) PE	eBioscience	12-0549-41
Alexa Fluor® 488 Mouse Anti- Human CD31	BD Pharmingen	558068
CD 146-PE, human (clone: 541- 10B2)	Miltenvi Biotec	130-097-939

Tabelle 5: Auflistung Antikörper Durchflusszytometrie

Primer & Primersequenzen für die qRT-PCR:

Target	Primer-Name	Sequenz
VE-Cadherin	hVEcadfwd	TCCTCTGCATCCTCACTATCACA
	hVEcadrev	GTAAGTGACCAACTGCTCGTGAAT
CD 31	hCD31fwd	GGAAACCATGCAATGAAACCAA
	hCD31rev	GTCCTTCTTTCTAGATCTTTGTGA
CD 34	hCD34fwd	GCGCTTTGCTTGCTGAGTTTGC
	hCD34rev	GCCTCATTGCCATGTTGAGACAC
VEGFR2	hVEGFR2fwd	CATCACATCCACTGGTATTGG
	hVEGFR2rev	GCCAAGCTTGTACCATGTGAG
Tie-1	hTie1fwd	CACGACCATGACGGCGAAT
	hTie1rev	CGGCAGCCTGATATGCCTG
Tie-2	hTie2fwd	AGTAGDCATATTCACCATCAACCG
	hTie2rev	TGCCAAGCCTCATAGTGATTAACG
vWF	hvWFfwd	AGTTCATGGAGGAGGTGATTCAGC
	hvWFrev	AGCCATCCAGGAGAAGGATCACG
TAg	TAgfwd	TAGTGGCTGGGCTGTTCTTT
	TAgrev	GGTGGGTAAAGGAGCATGA
ACTB	hACTBfwd	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
	hACTBrev	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
PTGS1	hPTGS1fwd	GAAACCCTACACCTCCTTCC
	hPTGS1rev	CCCAATCTCTATCATACTCTCCC
PTGS2	hPTGS2fwd	CAAGACAGATCATAAGCGAGG
	hPTGS2rev	GGCATACATCATCAGACCAG
PTGIS	hPTGISfwd	CCAGAAATCTACACAGACCCA
	hPTGISrev	TGTAATTCTTCAGCCGTTTCC
GAPDH	Gapdh(MOUSE)-f	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC
	Gapdh(MOUSE)-r	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
TNF-α	Tnfa(MOUSE)-r	AAGCAAAAGAGGAGGCAACA
	Tnfa(MOUSE)-f	CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT
IL-6	Interleukin6(MOUSE)-f	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC
	Interleukin6(MOUSE)-r	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG

Tabelle 6: Auflistung Primer und Primersequenzen qRT-PCR

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Medium und Zusätze

Medium, Zusatz	Firma, Land
Basalmedium DMEM	Gibco, Deutschland
Basalmedium MV	PromoCell, Deutschland
DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium ([+] 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, [-] Pyruvate)	Gibco, Deutschland
Doxycyclin	AppliChem, Deutschland
DPBS w/o Calcium & Magnesium	PAN Biotech, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium MV (mit Supplements)	PromoCell, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, USA
Gelatine 0,5 %	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Deutschland
Recombinant Murine M-CSF	PeptoTech, USA

Tabelle 7: Auflistung Medien und Zusätze für Zellkultur

Supplement-Mix Endothelial Cell Growth Medium MV:

Bestandteil	Konzentration
Fetales Kälberserum	0,05 ml/ml
Endothelial Cell Growth Supplement	0,004 ml/ml
Epidermaler Wachstumsfaktor (rekombinant, human)	10 ng/ml
Heparin	90 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml

Tabelle 8: Zusammensetzung Supplement-Mix Endothelial Cell Growth Medium MV

2.1.5.2 Angesetzte Lösungen für die Zellkultur

Lysepuffer = 1 ml DPBS + 2 ml BD Pharm Lyse Lysing Buffer (BD Biosciences)

Ansatz zum Splitten (Splitlösung) der murinen Makrophagen:

50 ml PBS (1x)
500 µl 1M Glucose = 10 mM
60 µl 2,5M EDTA = 3mM

Tabelle 9: Zusammensetzung des Ansatzes zum Splitten der Makrophagen

2.1.6 Sonstige Materialien

Material	Firma, Land
Aktivkohlefilter	Carl Roth, Deutschland
Biosampler	SKC Inc., USA
Feuerzeug	Baumarkt, Deutschland
Holzpellets (Buchenholz)	Baumarkt, Deutschland
Verbindungsschläuche	Baumarkt, Deutschland
Metallspatel	Baumarkt, Deutschland
Zigarette	3R4F, Kentucky (USA)

Tabelle 10: Auflistung sonstige Materialien

2.1.7 Geräte

Gerät	Firma, Land
-80°C Gefrierschrank (Thermo Scientific TSX 60086A)	ThermoFisher Scientific, USA
-20°C Gefrierschrank	Bosch, Deutschland
Absaugpumpe (VacuSafe comfort)	Integra BioSciences, Deutschland
Autoklav (VX-95)	Systec, Deutschland
Biolog. Zellkulturbank (Hera safe)	ThermoFisher Scientific, USA
Brutschrank/Inkubator (5 % CO ₂ , 37°C) (HERA cell)	ThermoFisher Scientific, USA
Drucker (Epson LX-800)	Epson, Japan
Eismaschine	Manitowoc, USA
FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, USA
Feinwaage	Sartorius, Deutschland
Incucyte Life-Cell Analysis System	Sartorius, Deutschland
Infusion Smoker (AP-4307)	ARINO, Schweiz
Kühlschrank 4°C	Bosch, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DMIL Microsystems, Deutschland
Mikrozentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Deutschland
Mini Plate Spinner	Labnet, USA
Mini-Zentrifuge (uniCFGUE 2)	LLG-Labware, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Deutschland
Real-Time System CFX96	Bio-Rad Laboratories, USA
Spectrophotometer ND 1000 (NanoDrop)	PEQLAB, Deutschland
Stickstoff-Behälter (Cryospeed TP100)	Linde, Deutschland
Stoppuhr (Eurochron)	Eurochron, Deutschland
Thermocycler (Biometra T Gradient Thermoblock)	Biometra, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe Laboport N816	KNF Neuberger, Deutschland
Vortexer	PEQLAB, Deutschland
Wasserbad, Lauda 006T	Julabo Labortechnik, Germany
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich Zentrifugen, Deutschland

Tabelle 11: Auflistung Geräte

2.1.8 Software

Software	Firma, Land
CFX Manager Software Version 3.1 Biorad	Biorad, USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, USA
Incucyte® Software	Sartorius, Deutschland
Mendeley	Mendeley, Großbritannien
Microsoft Office	Microsoft, USA
NanoDrop Software ND-1000 V 3.81	ThermoFisher Scientific, USA

Tabelle 12: Auflistung Software

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Holzrauchgasextrakt

Für die Generierung von Holzrauchgasextrakt wurden 20 ml des Basalmediums der jeweiligen Zelltypen (HPMEC/CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox: MV Medium; murine Makrophagen: DMEM) unter einem Abzug in den Biosampler pipettiert. Danach wurde der Biosampler über ein Schlauchsystem mit einer Vakuumpumpe (mit vorgeschaltetem Aktivkohlefilter) und einem Infusion Smoker verbunden. Mit einer Feinwaage wurden 1000 mg Holzpellets (Buchenholz) abgewogen und in den Infusion Smoker gegeben. Anschließend wurde die Holzmenge für 2 Minuten vollständig verbrannt. Durch die Sogleistung der Pumpe wurde das in dem Biosampler befindliche Medium mit Holzrauch (WSE) angereichert und steril filtriert (0,22 µm Filter). Die so entstandene Lösung wurde als Ausgangslösung mit einer Konzentration von 100 % Holzrauch definiert. Für die Zellkulturversuche erfolgte eine Verdünnung mit dem jeweiligen Zellkulturmedium im Verhältnis 1:100 (1 % WSE) bzw. 1:200 (0,5 % WSE). In Abbildung 1 ist der Versuchsaufbau dargestellt.

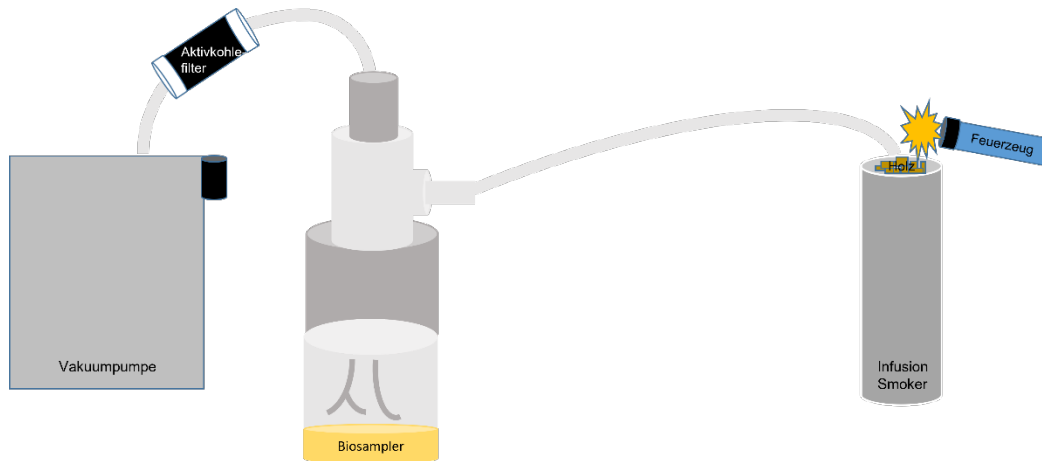


Abbildung 1: Versuchsaufbau WSE-Generierung. 1 g Holz wurde für 2 Minuten unter Saugen einer Vakuumpumpe vollständig verbrannt. Der Holzrauch wurde über ein Schlauchsystem und einen Biosampler direkt in das Medium geleitet, sodass eine Ausgangslösung mit 100 % Holzrauch entstand.

2.2.2 Herstellung von Zigarettenrauchgasextrakt

Zur Herstellung von Zigarettenrauchgasextrakt wurde ein 50 ml Falcon mit 10 ml des Basalmediums der jeweiligen Zelltypen unter einem Abzug befüllt. Das Falcon wurde verschlossen und über einen Schlauch mit einer motorbetriebenen Pumpe verbunden. Des Weiteren wurde eine modifizierte Pasteur-Pipette, welche als Zigarettenhalterung fungierte, über einen Schlauch an das Tube angeschlossen. Auf die Zigarettenhalterung wurde eine Zigarette gesteckt (3R4F, Kentucky, USA) und eine Minute lang unter Sogleistung abgeraucht. Über die Schläuche gelang der Zigarettenrauch direkt in das Tube, sodass das Medium mit Zigarettenrauch versetzt wurde. Nach steriler Filtrierung (0,22 µm Filter) ergab sich eine 100%ige Ausgangslösung. Für die Zellkulturexperimente erfolgte eine Verdünnung der Ausgangslösung mit Zellkulturmedium. Abbildung 2 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

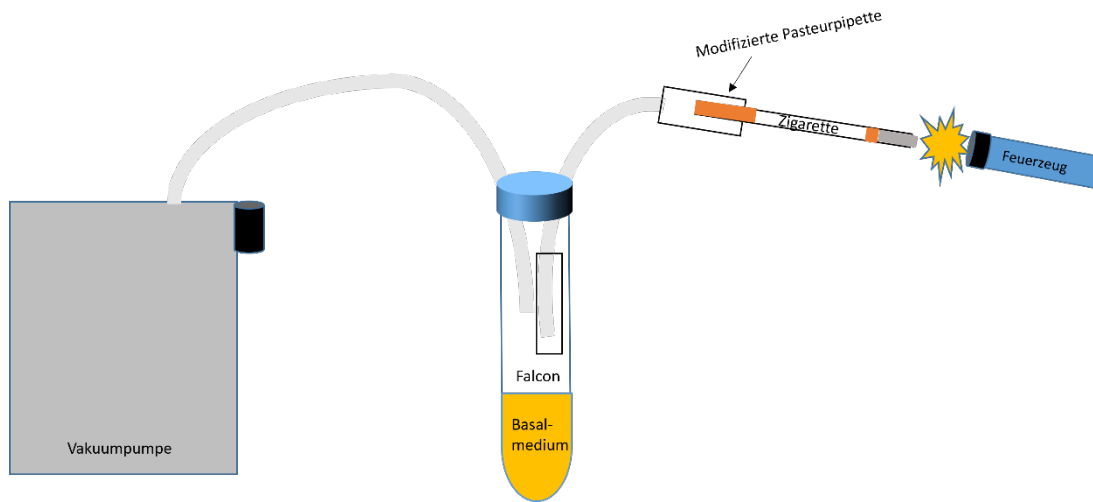


Abbildung 2: Versuchsaufbau CSE-Generierung. Eine 3R4F-Zigarette wurde unter Saugen einer Vakuumpumpe eine Minute lang vollständig abgeraucht. Über ein Schlauchsystem gelang der Zigarettenrauch direkt in das Basalmilieu und es entstand eine Ausgangslösung mit 100 % Zigarettenrauch.

2.2.3 Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen

Zur Kultivierung von Makrophagen wurden zunächst Stammzellen aus dem murinen Knochenmark von männlichen C57B1/6 Mäusen im Alter von 8-15 Wochen isoliert. Die Narkose der Mäuse erfolgte mit 4 % isofluranhaltigem Gas. Nach erloschenem Zehenreflex wurde eine zervikale Dislokation herbeigeführt. Die Maus wurde in Rückenlage fixiert und die Haut sowie das Weichteilgewebe an den Hinterbeinen entfernt. Anschließend wurde das Femur am Hüftgelenk und die Tibia am Sprunggelenk abgesetzt und in Höhe des Kniegelenks voneinander getrennt. Distal und proximal wurde ein Knochenschnitt gesetzt und in die freien Knochenenden PBS mittels Spritze und aufgesetzter 27G Kanüle injiziert. Das Knochenmark wurde daraufhin in einer Petrischale gesammelt und die Zellsuspension sorgfältig resuspendiert, mit einem 70 µm Zellsieb filtriert und in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde 1 ml Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Kap. 2.1.5.2) hinzugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Lysereaktion wurde durch Zugabe von 15 ml PBS beendet. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS-Anteil gelöst. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.6).

2.2.4 Kultivierung und Differenzierung zu Makrophagen

Nach Berechnung der Zellzahl wurden pro Zellkulturschale 4 Mio. Zellen und 10 ml DMEM-Medium hinzugegeben. Das DMEM-Medium wurde zuvor mit 1 %

Penicillin/Streptomycin und 2,5 % FCS versetzt. Zwecks Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen wurden die Zellen mit 10 µl M-CSF versetzt. Es folgte eine weitere Zugabe von M-CSF (5 µl) nach 3 Tagen. Ein Mediumwechsel (5 ml) wurde alle 2 Tage durchgeführt.

2.2.5 Kultivierung (immortalisierter) humaner primärer mikrovaskulärer Endothelzellen

Für die Durchführung der Endothelzellexperimente wurden humane primäre mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) von der Firma PromoCell (C-12281) verwendet. Die Zellisolation erfolgte vom Lungengewebe eines gesunden Spenders nach dessen Einverständniserklärung. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von primären Zellen wurden HPMEC von Herrn Dr. Christoph Lipps immortalisiert und die immortalisierte Zelllinie (CI HPMEC ARLT) für die Versuche genutzt. Die Immortalisierung der HPMEC erfolgte analog zu einer bereits etablierten Methode (104). Zur Infektion wurden lentivirale Vektoren verwendet, welche die immortalisierenden Gene SV40 T-Antigen und humane Telomerase (hTert) transportierten. Die Expression der Gene erfolgte Doxycyclin-abhängig, sodass eine Zellproliferation nur bei ausreichender Doxycyclin-Gabe stattfand.

Bis zur endgültigen Verwendung erfolgte eine Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Zur Anzucht und Kultivierung wurde das Endothelial Cell Growth Medium MV der Firma PromoCell verwendet. Zu dem Basalmedium wurde der Supplement-Mix der Firma PromoCell sowie 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Die verwendeten Zellkulturflaschen wurden 30 Minuten vor Nutzung mit 0,5 % Gelatine beschichtet, was ein späteres Anhaften der Zellen garantierte. Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Stickstofflager entnommen und für 90 Sekunden im Wasserbad erwärmt. 9 ml kaltes MV-Medium wurde zu 1 ml Zellsuspension hinzugefügt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 250 g. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 10 ml MV-Medium (+ Doxycyclin) gemischt und die Suspension in eine T75-Flasche überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-angereicherter Luft inkubiert. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. CI HPMEC ARLT wurden zur Kultivierung mit 1 µg/ml Doxycyclin versetzt, welches bei jedem Mediumwechsel hinzugegeben wurde.

2.2.6 Zellzählung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach Aufsetzen des Deckglases wurde das Auftreten Newton'scher Ringe überprüft. Ihr Vorkommen bestätigte, dass die Kammertiefe korrekt eingestellt ist. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und 20 µl der gefärbten Lösung wurden auf die Zählkammer pipettiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter einem Lichtmikroskop unter Auszählung von 4 Eckquadraten, welche jeweils 16 einzelne Quadrate beinhalteten. Die Zellzahl pro ml ergab sich wie folgt:

$$\begin{aligned} \sum \text{Zellzahl in allen 4 Eckquadraten} / 4 &= \text{Mittelwert Zellzahl/Eckquadrat} \\ \text{Mittelwert Zellzahl/Eckquadrat} \times 2 \times 10^4 &= \text{Zellen/ml} \\ \text{Zellen/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} &= \text{Gesamtzellzahl} \end{aligned}$$

Tabelle 13: Formel zur Zellzahlbestimmung

2.2.7 Passagieren und Ausplattieren der Zellen

Zur Passage der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (37°C) gewaschen. Um die adhärennten Endothelzellen vom Boden abzulösen, wurden 5 ml Trypsin-EDTA in die T75-Flasche gegeben und die Zellen für etwa 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellkulturschalen mit den darin befindlichen Makrophagen wurden mit 5 ml Splitlösung (Glukose, EDTA, PBS; genaue Zusammensetzung siehe Kap. 2.1.5.2) versetzt. Während des Inkubationsprozesses wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen bereits vom Boden abgelöst haben. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Zellen mit 10 ml Medium (Endothelzellen: MV-Medium; Makrophagen: DMEM-Medium + 10 % FCS) versetzt wurden. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 750 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml Medium resuspendiert. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.6). Je nach Anzahl der Zellen wurden die Endothelzellen erneut auf T75-Flaschen (HPMEC/CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox: 1 Mio. Zellen pro T75-Flasche) nach vorherigem Coating mit 0,5 % Gelatine bzw. auf Zellkulturschalen (Makrophagen: 4 Mio. Zellen pro Zellkulturschale) ausgesät. Täglich erfolgte eine Kontrolle der Proliferation und Zellmorphologie der Makrophagen und humanen (immortalisierten) primären mikrovaskulären Endothelzellen unter dem Lichtmikroskop, um eventuelle mikrobielle Kontaminationen direkt festzustellen. Bei

genügend hoher Zellzahl erfolgte eine Ausplattierung auf 6-Well-Platten. Die 6-Well-Platten wurden für die Experimente mit Endothelzellen zuvor mit 0,5 % Gelatine beschichtet. Für die Zellkulturversuche der Makrophagen wurden 1 Mio. Zellen und 1 ml DMEM-Medium + 2,5 % FCS pro Well ausplattiert, für Endothelzell-Experimente 250.000 Zellen und 1 ml MV-Medium pro Well. Bei den CI HPMEC ARLT + Dox erfolgte eine Zugabe von 1 µl Doxycyclin. Ein Teil der Zellen wurde 3 Tage zuvor nicht mit Doxycyclin versetzt, welche als CI HPMEC ARLT - Dox definiert wurden.

2.2.8 Ernte von Endothelzellen und Makrophagen sowie Stimulation mit Holzrauchextrakt/Zigarettenrauchextrakt

Nach dem Ausplattieren der Zellen auf 6-Well-Platten erfolgte eine Inkubation über Nacht. Danach wurde geprüft, ob die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Holzrauchgasextrakt (0,5 % und 1 %) sowie Zigarettenrauchextrakt (1 % und 3 %) stimuliert. Einige Zellen erhielten keine Stimulation und fungierten als Kontrolle. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde eine Zellernte durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und zweimal mit 10 ml PBS pro Well gewaschen, um jegliche Mediumreste zu entfernen.

2.2.9 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Für die Isolation der zellulären Ribonukleinsäuren (RNA) wurde das Total RNA Purification Kit der Firma Norgen genutzt.

Zunächst wurde sichergestellt, dass die benötigte Zentrifuge Raumtemperatur (21°C) erreicht hat. Zum Waschpuffer (Wash Solution A) wurden 90 ml 100%iges Ethanol hinzugefügt.

Zu Beginn der RNA-Isolation wurde eine Lösung aus RL-Puffer und β-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 angesetzt (1 ml RL-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol). Von dieser Lösung wurden jeweils 400 µl in ein Well der 6-Well-Platte gegeben. Zur Lyse der Zellen wurde die Lösung 5 Minuten lang im Well verteilt und der Wellinhalt sorgfältig gespült. Eine gDNA-Removal-Column wurde auf ein 2 ml Collection-Tube aufgesetzt und das Lysat überführt. Mittels einminütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurde jegliche genomische DNA an die gDNA-Removal-Column gebunden. Die gDNA-Removal-

Column wurde verworfen und 220 µl 100%iges Ethanol in das Sammelgefäß gegeben und mittels eines Vortexmischers sorgfältig gemischt. Eine RNA-Purification-Column wurde auf ein Collection-Tube aufgesetzt und der Inhalt des Sammelgefäßes überführt. Daraufhin wurden die Proben zwecks Aufreinigung der RNA 1 Minute lang bei 3.500 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurden 400 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (1 Minute, 14.000 g). Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschvorgang mit anschließender Zentrifugation zweimal wiederholt. Somit wurden auch die verbleibenden Zellbestandteile herausgewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang wurde der Durchfluss entfernt und die Proben für 2 Minuten bei 14.000 g trocken zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 1,7 ml Elution Tube gestellt. Die Zugabe von 35 µl Elution Solution mit anschließender Zentrifugation (2 Minuten bei 200 g) führte zur Ablösung der RNA von der Membran der Filtersäule, sodass sich die RNA nun im Durchfluss befand. Um sicherzustellen, dass keine weitere RNA an der Filtersäule haftet, wurde erneut für 1 Minute bei 14.000 g zentrifugiert.

Mittels eines Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers erfolgte die Bestimmung der Konzentration der RNA. Da Ribonukleinsäuren Strahlung mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, kann der Absorptionswert zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden. Das Spektralphotometer berechnet hierzu die Differenz der Absorptionen von RNase-freiem Wasser und die der RNA-haltigen Proben. Es zeigt sich eine Proportionalität zwischen Absorptionshöhe und RNA-Gehalt. Zudem können mittels des Spektralphotometers Informationen über die Qualität der RNA gewonnen werden. Dafür wird zusätzlich der Absorptionsgrad bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und der Quotient aus dem Absorptionswert bei 260 nm und 280 nm berechnet. Der Quotient sollte im Optimalfall nahezu zwei betragen.

2.2.10 cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, damit diese für eine quantitative Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR verwendet werden kann. Bei der qRT-PCR handelt es sich um einen Prozess der DNA-Vervielfältigung in vitro mithilfe von DNA-Polymerasen und Primern.

Zur Herstellung der cDNA wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit Maxima verwendet. Alle Proben enthielten einen RNA-Gehalt von 500 ng in einem Reaktionsgemisch von 20 µl. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 4 µl 5X Reaction

Mix, welcher als Primer fungiert, und 2 µl Maxima Enzyme Mix, welches RNase H beinhaltet, zusammen. Je nach RNA-Gehalt erfolgte eine Auffüllung des Reaktionsmixes mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl und eine Zentrifugation der Proben.

Komponente	Menge (µl)
5X Reaction Mix	4 µl
Maxima Enzyme Mix	2 µl
RNA	500 ng
Nuclease-freies Wasser	14 µl – RNA-Menge in µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsgemisches

Zur Amplifikation der DNA wurden die Proben im Biometra T Gradient Thermoblock 10 Minuten bei 25°C inkubiert, gefolgt von einer 15-minütigen Erhitzung auf 50°C zwecks Aktivierung der Reversen Transkription. Zur Inaktivierung der Transkription wurden die Proben 5 Minuten auf 85°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt. Es folgte eine Verdünnung der cDNA mit 80 µl RNase/DNase-freiem Wasser, sodass für die Real-time PCR ein Gesamtvolumen von 100 µl cDNA zur Verfügung stand.

2.2.11 Real-Time Quantitative PCR (qRT-PCR)

Mittels quantitativer Real-Time PCR ist im Unterschied zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion auch eine Mengenbestimmung der erhaltenen DNA möglich. Dazu wird ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) genutzt, der hochsensitiv an die DNA bindet. Die Fluoreszenzmenge wird während des Denaturierungsprozesses eines PCR-Zyklus in Echtzeit bestimmt und ist proportional zum entstandenen PCR-Produkt. Die Quantifizierung erfolgt nur in der anfänglichen, exponentiellen Phase der PCR, da in diesem Zeitraum optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen.

Vor Durchführung der qRT-PCR wurde RNase- und DNase-freies Wasser im Verhältnis 100:1 zu den verwendeten Primern hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 10mM vorlag. Auf einer 96-Well-PCR-Platte wurden die Proben als Triplikate aufgetragen sowie ein Triplikat der Negativkontrolle, welches keine cDNA enthielt. Als Referenzgene kamen β-Actin (HPMEC, CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox) sowie GAPDH (murine Makrophagen) zum Einsatz. Pro Well wurden 0,5 µl des Forward Primers, 0,5

µl des Reverse Primers, 1 µl RNase-/DNase-freies Wasser und 6 µl SYBR Green Master Mix pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl cDNA.

Komponente	Menge (µl)
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
RNase-/DNase-freies Wasser	1 µl
SYBR Green Master Mix	6 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung des qRT-PCR-Reaktionsgemisches

Im Anschluss wurde die Platte mit einer Folie abgedichtet und bei 1000 g für einige Sekunden zentrifugiert. Für die Fluoreszenz-Messung wurde das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System der Firma Biorad mit der dazugehörigen Software verwendet. Nach jedem PCR-Zyklus erfolgte eine Messung der Fluoreszenzmenge. Wurde ein definierter Schwellenwert überschritten (Zeitpunkt, an dem sich die Fluoreszenzmenge deutlich vom Hintergrund unterscheidet), wurde die Anzahl der Zyklen, die bis zum Erreichen des Schwellenwertes nötig waren, bestimmt. Diesen Wert bezeichnet man als Treshold Cycle (CT-Wert), welcher eine Aussage über die relative Expression eines Gens ermöglicht. Nach Erreichen des CT-Wertes stagnierte die Produktbildung und es stellte sich eine Plateauphase ein. Um den PCR-Lauf zu beenden, wurde das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt, wodurch der DNA-Doppelstrang wieder in 2 Einzelstränge denaturierte.

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 Minuten
Denaturierung	95°C	10 Sekunden
Anlagerung	60°C	25 Minuten
Elongation	72°C	25 Minuten
Finale Verlängerung	65-95°C	15 Sekunden
Abkühlung	25°C	-

Tabelle 16: qRT-PCR-Programm

Aus den Denaturierungszeitpunkten konnte eine Schmelzkurve erstellt werden, welche zur Spezifitätsanalyse der entstandenen PCR-Produkte nötig ist. Die Datenauswertung

erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode in Microsoft Office Excel. Zur Auswertung der Daten und Grafikerstellung wurde GraphPad® Prism 6.0 eingesetzt. Zunächst wurde die Differenz aus den CT-Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet (ΔCT). Das Verhältnis aus dem ΔCT -Wert einer stimulierten Probe und dem ΔCT -Wert einer Kontrolle ergab den $\Delta\Delta CT$ -Wert. Bei einer optimalen PCR erfolgt eine Verdopplung der DNA-Amplifikate in jedem Zyklus. Daher ließ sich der Expressionsunterschied mithilfe der Livak-Methode (93) berechnen:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Housekeeping Gen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Stimulation} - \Delta CT \text{ Kontrollgruppe (unstimuliert)}$$

$$\text{Relative mRNA-Expression (Ratio)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Tabelle 17: Livak-Methode

2.2.12 Apoptose-Assay

Der programmierte Zelltod (Apoptose) geht mit verschiedenen morphologischen Zellveränderungen einher. Eines der frühesten Merkmale apoptotischer Zellen sind Veränderungen der Zellmembran. Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) befindet sich in vitalen Zellen auf der inneren Seite der Zelloberfläche. Bei Apoptoseeinleitung erfolgt eine Translokation von PS auf die Außenseite der Oberfläche (37), was als PS-Flip bezeichnet wird. Zur Apoptose-Detektion wurde das Kinetic Apoptosis Kit der Firma Abcam verwendet, welches unter anderem diesen PS-Flip messen kann. Das Kit basiert auf pSIVA (polarity-Sensitive Indicator of Viability & Apoptosis), einem Annexin XII-Derivat, welches PS an der Außenseite der Membran bindet. Über eine Konjugation mit IANBD (Fluoreszenzfarbstoff) führt die PS-Bindung zur Fluoreszenz. Des Weiteren kann durch eine zusätzliche Gabe von Propidium Iodid (PI) zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen differenziert werden. Die Zellmembran verändert im Verlaufe der Apoptose zunehmend die Permeabilität, sodass sie durchlässig für PI wird. Nekrotische Zellen können ebenfalls von PI gebunden werden und durch eine erhöhte PI-Fluoreszenz gemessen werden. Frühapoptotische Zellen sind nur pSIVA-positiv. Spätapoptotische Zellen zeigen sowohl eine pSIVA- als auch eine PI-Fluoreszenz. Nekrotische Zellen sind hingegen pSIVA-negativ und PI-positiv.

Für den Apoptose- und Nekrosenachweis wurden 5.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Es folgte am darauffolgenden Tag ein Mediumwechsel und die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen Zigarettenrauch (1

%, 3 %, 5 %) sowie Iloprost (10 µg/ml). Einige Zellen fungierten als Negativkontrolle und wurden nicht stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss mit 10 µl/ml pSIVA-IANBD und 10 µl/ml PI versetzt und 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während der Inkubation wurde die Apoptoserate kontinuierlich unter Verwendung eines Fluoreszenz-Mikroskops gemessen.

2.2.13 Permeabilitätsassay

Zur Messung der endothelialen Barrierefunktion wurde ein System aus 2 Kompartimenten, welche durch eine Filter-Membran getrennt sind, analog zu einem bereits etablierten Protokoll genutzt (115). 300.000 HPMEC und 200.000 CI HPMEC ARLT - Dox wurden auf eine Transwell-Membran ausgesät und die Transwells auf die beiden Kompartimente übertragen. Beide Kompartimente bestanden aus einer luminalen und einer abluminalen Einheit, welche HBSS mit 1,3 mM Ca²⁺, 1,2 mM Mg²⁺ und 2 % (v/v) Kälberserum beinhalteten. Das luminale Kompartiment wurde mit Trypanblau-markiertem Albumin versetzt. Die Konzentration des markierten Albumins im abluminalen Kompartiment wurde kontinuierlich mittels eines Spektrophotometers beobachtet. Das Spektrophotometer detektiert Konzentrationsänderungen des markierten Albumins in unter 15 Sekunden. Während der Inkubation wurde die Konzentration im luminalen Kompartiment alle 5-10 Minuten gemessen. 30 Minuten nach Beginn der Messung wurden extrazelluläre Stimuli (TNF-α, Thrombin, 1 % CSE, 3 % CSE und Iloprost) hinzugefügt. Nach 70-90 Minuten erfolgte eine Messung der Permeabilität.

2.2.14 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (engl: fluorescent activated cell sorting) eignet sich zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Rezeptoren.

Zur Markierung der Oberflächenantigene wurden 5 x 10⁵ CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie 5 x 10⁵ HPMEC zunächst auf 6-Well-Platten ausplattiert. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit Phycoerythrin (PE)- oder Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- konjugierten monoklonalen Antikörpern versetzt. Das Medium wurde abgesaugt und jedes Well zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine Zugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA pro Well, um die adhärennten Zellen vom Boden abzulösen. Unter dem Mikroskop wurde eine Abkuglung und Ablösung der Zellen beobachtet. Um den Vorgang zu stoppen und einen Lysevorgang zu verhindern, wurden die Zellen in ein

Falconröhrchen überführt, welches zuvor mit FACS-Puffer (PBS und 2 % FCS) versetzt wurde. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 1000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert, sodass das Zellpellet in 300 µl PBS/FCS 2 % resuspendiert und für die Messungen am Durchflusszytometer (FACSCalibur™) genutzt werden konnte. Als Negativkontrolle fungierten Zellen, die nicht mit einem konjugierten Antikörper versetzt wurden.

2.2.15 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 6.0 verwendet. Zunächst wurden die Messergebnisse auf Normalverteilung geprüft. Lagen nur 2 Gruppen vor, erfolgte eine Überprüfung der Signifikanz mittels ungepaartem t-Test (bei gleichzeitigem Vorliegen einer Normalverteilung). Zur Analyse der Signifikanz bei mehr als 2 Gruppen kam bei normalverteilten Daten die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zum Einsatz. Sollten die Unterschiede im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemessen werden, folgte ein anschließender Dunnett's Test. Sollten alle Gruppen untereinander verglichen werden, wurde anschließend ein Tuckey's Test durchgeführt. Wenn die Voraussetzung der Normalverteilung nicht erfüllt war, wurde ein Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Dunn's Test durchgeführt. Die Messergebnisse wurden in der graphischen Darstellung mit einem Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde der Wert als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind in vier Kapitel unterteilt. Im ersten Kapitel wird die etablierte Zelllinie CI HPMEC ARLT charakterisiert und auf Funktionalität überprüft. Im zweiten Teil der Arbeit wird die immortalisierte Zelllinie genutzt, um den Einfluss von Zigarettenrauch und Holzrauch auf Endothelzellen zu untersuchen. Die Auswirkung von Iloprost auf die Funktion von Endothelzellen wird ebenfalls anhand des Zellmodells evaluiert.

3.1 Charakterisierung des Modellsystems

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit primärer Zellen wurden die vorliegenden Experimente an einer immortalisierten Zelllinie durchgeführt und ihre Funktionalität als Modellsystem mithilfe von primären Zellen validiert. Die Immortalisierung erfolgte zuvor mittels eines lentiviralen Gentransfers der Gene hTert und SV40 T-Antigen unter einem Tetrazyklin-Promotor analog zu einer bereits etablierten Methode (104). Um zu überprüfen, ob die Zelllinie als Modellsystem für Endothelzellen fungiert, wird nachfolgend eine Charakterisierung der Zelllinie vorgenommen.

3.1.1 Wachstumskontrolle der immortalisierten Zelllinie CI HPMEC ARLT

Bei der Zelllinie CI HPMEC ARLT handelt es sich um eine wachstumskontrollierte Zelllinie. Dies bedeutet, dass die Aktivität der Immortalisierungsgene und folglich auch die Zellproliferation durch die Zugabe eines Induktors (Doxycyclin) gesteuert werden kann. Um die Wachstumskontrolle zu überprüfen, wurden zunächst 5000 Zellen ausgesät und sowohl in Präsenz als auch in Abstinenz von Doxycyclin kultiviert. Abbildung 3A veranschaulicht die Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit. Der Grafik ist zu entnehmen, dass ohne die Zugabe von Doxycyclin kaum Zellwachstum erfolgte und die Zellen nach ca. drei Tagen ihre Proliferationskapazität einstellten. Die Substitution von Doxycyclin führte hingegen zu einer erheblichen Zunahme der Zellzahl.

Um die Fragestellung zu klären, ob ein Induktor (Doxycyclin) das Zellwachstum über eine Aktivitätsänderung immortalisierender Gene steuert, wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von SV40 T-Antigen gemessen. Die Bestimmung erfolgte in Kultivierungsbedingungen mit Doxycyclin und in Abwesenheit von Doxycyclin. Abbildung 3B ist zu entnehmen, dass CI HPMEC ARLT – Dox nahezu keine SV40 T-Antigen-mRNA exprimierten und sich nicht signifikant von den HPMEC unterschieden

($0,9435 \pm 0,8987$ vs. $0,0003301 \pm 0$; $p = 0,1546$; $n = 6$). Eine Hinzugabe von Doxycyclin ließ im Vergleich zu den HPMEC einen signifikanten Anstieg der mRNA-Transkription von SV40 T-Antigen erkennen ($49,46 \pm 38,77$ vs. $0,0003301 \pm 0$; $p = 0,0003$; $n = 6$). Im Vergleich zu den CI HPMEC ARLT – Dox zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung ($49,46 \pm 38,77$ vs. $0,9435 \pm 0,8987$; $p = 0,1547$; $n = 6$).

Aus den vorliegenden Daten wird ersichtlich, dass es sich bei der immortalisierten Zelllinie CI HPMEC ARLT um eine wachstumskontrollierte Zelllinie handelt, bei der die Zellproliferation über eine Aktivitätsänderung des SV40 T-Antigens durch die Substitution von Doxycyclin gesteuert werden kann.

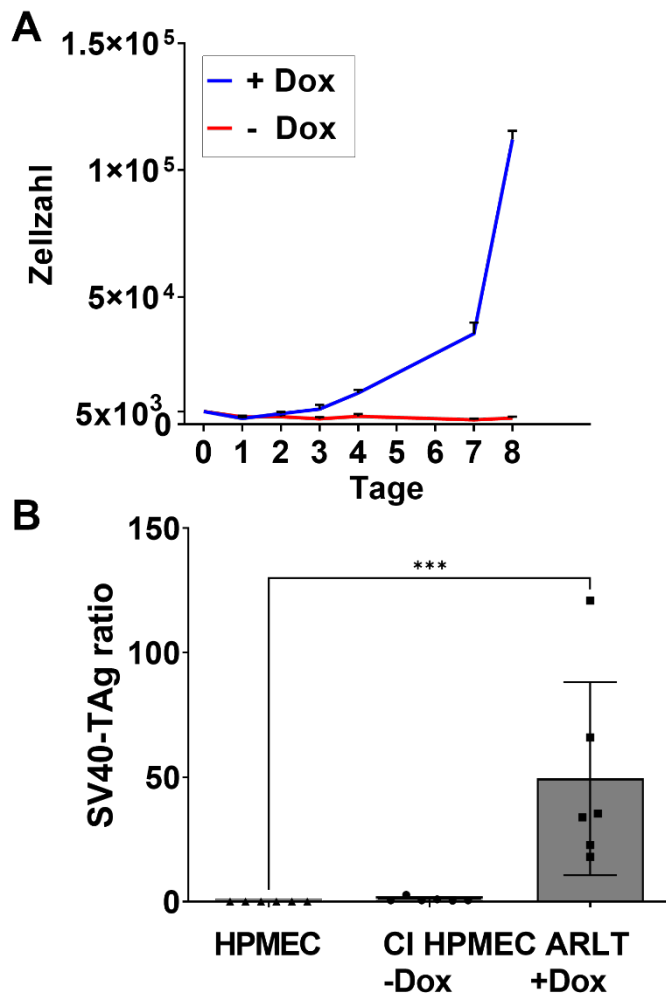


Abbildung 3: Wachstumskontrolle der CI HPMEC ARLT

A) Zellwachstum der CI HPMEC ARLT + Dox und CI HPMEC ARLT – Dox. 5000 Zellen wurden initial in Präsenz und Abstinenz von Doxycyclin ausgesät. Die Zellen wurden täglich geerntet und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt ($n = 3$).

B) Expression von SV40 T-Antigen. Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von SV40 T-Antigen der HPMEC, CI HPMEC ARLT – Dox und CI HPMEC ARLT + Dox gemessen ($n = 6$).

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben und wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey's Test berechnet. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.1.2 Phänotypische Eigenschaften der Zelllinie CI HPMEC ARLT

Die phänotypischen Eigenschaften der CI HPMEC ARLT wurden untersucht und zwecks Validation einer Vergleichbarkeit mit primären Zellen dem Phänotyp der HPMEC gegenübergestellt. Die Analyse des Phänotyps erfolgte unter Proliferationsbedingungen (+ Doxycyclin) und bei Proliferationsarrest (- Doxycyclin).

Zunächst wurde das Aussehen der Endothelzellen unter Verwendung eines Lichtmikroskops betrachtet (Abbildung 4A). Nach Aussaat der Zellen auf Gelatinebeschichteten T75-Flaschen wurden die Zellen für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂

kultiviert. Nach 7 Tagen erreichten alle 3 Zelltypen eine 80-90%ige Konfluenz. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die Zellmorphologie zwischen den immortalisierten Zellen und den primären Zellen kaum unterschied, alle wiesen die für Endothelzellen typische Kopfsteinpflasterstruktur auf. Bezogen auf die Dichtigkeit war diese im Falle der CI HPMEC ARLT unter Proliferationsbedingungen (+ Doxycyclin) verglichen mit den HPMEC und CI HPMEC ARLT – Dox erhöht.

Unter Verwendung der qRT-PCR wurde die Expression verschiedener endothelialer Marker auf mRNA-Ebene gemessen (Abbildung 4B). Alle 3 Zelltypen exprimierten das CD31-Gen. Das CD31-Gen wurde in CI HPMEC ARLT + Dox im Vergleich zu den HPMEC signifikant vermindert exprimiert ($0,2424 \pm 0,0879$ vs. $1,00 \pm 0,3335$; $p = 0,0138$; $n = 5$). Unter Kultivierungsbedingungen ohne Doxycyclin (CI HPMEC ARLT – Dox) konnte verglichen mit der Zelllinie bei Präsenz von Doxycyclin eine signifikante Erhöhung der mRNA-Transkription von CD31 beobachtet werden ($0,9927 \pm 0,3854$ vs. $0,2424 \pm 0,0879$; $p = 0,0288$; $n = 5$). Diese war in ihrer Höhe vergleichbar mit den primären Zellen ($0,9927 \pm 0,3854$ vs. $1,00 \pm 0,3335$; $p > 0,9999$; $n = 5$). Ebenso ließ sich in der immortalisierten Zelllinie in Analogie zu den primären Zellen die Expression des Gens VE-Cadherin nachweisen. In CI HPMEC ARLT + Dox konnte verglichen mit HPMEC eine verringerte Expression von VE-Cadherin detektiert werden ($0,6107 \pm 0,1466$ vs. $1,000 \pm 0,3061$; $p = 0,1026$; $n = 6$), welche allerdings keine Signifikanz aufwies. Die Abstinenz von Doxycyclin in CI HPMEC ARLT – Dox wies hingegen eine signifikant vermehrte mRNA-Transkription des VE-Cadherin-Gens im Vergleich zu der Transkriptionsmenge unter doxycyclinhaltigen Kultivierungsbedingungen auf ($1,423 \pm 0,4065$ vs. $0,6107 \pm 0,1466$; $p = 0,0009$; $n = 6$) und unterschied sich nicht signifikant von der mRNA-Abundanz von VE-Cadherin in den HPMEC ($1,423 \pm 0,4065$ vs. $1,000 \pm 0,3061$; $p = 0,0727$; $n = 6$). Bezogen auf das VEGFR2-Gen konnte ebenso in den drei Zelltypen eine mRNA-Transkription gemessen werden. Im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox zeigte sich eine signifikante Reduktion der mRNA des VEGFR2-Gens verglichen mit den HPMEC ($0,5356 \pm 0,1347$ vs. $0,9972 \pm 0,2983$; $p = 0,0088$; $n = 6$). In Abstinenz von Doxycyclin konnte gegenüber den CI HPMEC ARLT + Dox eine Erhöhung der mRNA-Abundanz von VEGFR2 gemessen werden ($1,11 \pm 0,4517$ vs. $0,5356 \pm 0,1347$; $p = 0,0206$; $n = 6$). Sie entsprach in ihrer Höhe in etwa der der primären Zellen ($1,11 \pm 0,4517$ vs. $0,9972 \pm 0,2983$; $p > 0,9999$; $n = 6$). In Analogie zu den bereits gemessenen Genen war der endotheliale Marker vWF in der immortalisierten Zelllinie gleichermaßen

nachweisbar. CI HPMEC ARLT + Dox zeigten verglichen mit den HPMEC eine signifikante Reduktion des mRNA-Gehaltes ($0,01216 \pm 0,3498$ vs. $1,000 \pm 0,3498$; $p = 0,0005$; $n = 5$). In Abwesenheit von Doxycyclin war im Vergleich zu den CI HPMEC ARLT + Dox eine Steigerung der mRNA-Expression von vWF erkennbar ($0,1424 \pm 0,05525$ vs. $0,01216 \pm 0,3498$; $p = 0,2162$; $n = 5$). In Bezug auf die primären Zellen zeigte sich ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Transkription, welche allerdings weniger stark ausfiel als bei den CI HPMEC ARLT + Dox und keine Signifikanz zeigte ($0,1424 \pm 0,05525$ vs. $1,000 \pm 0,3498$; $p = 0,1188$; $n = 5$). Sowohl die Gene Tie-1 als auch Tie-2 wurden analog zu endothelialen Zellen in der Zelllinie exprimiert. Unter Kultivierungsbedingungen mit Doxycyclin zeigte sich eine Verminderung der mRNA-Abundanz im Vergleich zu den HPMEC ($0,5594 \pm 0,1650$ vs. $1,000 \pm 0,3425$; $p = 0,1751$; $n = 6$), welche jedoch keine Signifikanz aufwies. Beim Vergleich der mRNA-Abundanz von CI HPMEC ARLT – Dox mit der Transkriptionsmenge von CI HPMEC ARLT + Dox ließ sich eine signifikante Steigerung detektieren ($1,381 \pm 0,5860$ vs. $0,5594 \pm 0,1650$; $p = 0,008$; $n = 6$). Analog dazu konnte eine höhere mRNA-Abundanz von CI HPMEC ARLT – Dox gegenüber den primären Zellen verzeichnet werden, welche allerdings nicht signifikant war ($1,381 \pm 0,5860$ vs. $1,000 \pm 0,3425$; $p = 0,2612$; $n = 6$). Die mRNA-Expression von Tie-2 war in allen 3 Zelllinien auf einem ähnlichen Level (CI HPMEC ARLT + Dox: $1,013 \pm 0,2473$; CI HPMEC ARLT – Dox: $1,168 \pm 0,3013$; HPMEC: $1,000 \pm 0,2249$; $n = 5$), es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Endothelzellen exprimieren spezielle Oberflächenproteine, die mittels Durchflusszytometrie untersucht werden sollten. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abbildung 4C veranschaulicht. Analog zur Genexpression von CD31, welche mittels qRT-PCR gemessen wurde, ließ sich auch die Expression des CD31-Proteins in der FACS-Analyse in allen 3 Zelltypen nachweisen. Im Vergleich zu den primären Zellen zeigte sich im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox eine signifikante Reduktion des Proteingehaltes von CD31 (3119 ± 1945 vs. 9350 ± 3621 ; $p = 0,0426$; $n = 3$). Ebenso war die Proteinmenge geringer als bei den CI HPMEC ARLT – Dox (3119 ± 1945 vs. 6910 ± 2542 ; $p = 0,2802$; $n = 3$). Im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox war die Reduktion in Relation zu den primären Zellen weniger stark ausgeprägt und wies keine Signifikanz auf (6910 ± 2542 vs. 9350 ± 3621 ; $p > 0,9999$; $n = 3$). Das Protein CD34 wurde ebenfalls von der immortalisierten Zelllinie hergestellt. Betrachtet man die Proteinexpression von

CD34 im Vergleich zu den HPMEC, fiel eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge in der immortalisierten Zelllinie auf (CI HPMEC ARLT + Dox: 6569 ± 1618 vs. $32,50 \pm 89,19$; $p < 0,0001$; $n = 3$) (CI HPMEC ARLT – Dox: $6980 \pm 507,0$ vs. $32,50 \pm 89,19$; $p < 0,0001$; $n = 3$). Zwischen den CI HPMEC ARLT – Dox und CI HPMEC ARLT + Dox konnten keine signifikanten Unterschiede konstatiert werden ($6980 \pm 507,0$ vs. 6569 ± 1618 ; $p = 0,861$; $n = 3$). Der Oberflächenmarker CD54 war in allen 3 Zelltypen auf einem geringen Level ohne signifikante Unterschiede nachweisbar ((CI HPMEC ARLT + Dox: $1369 \pm 592,5$) (CI HPMEC ARLT – Dox: $827,0 \pm 490,8$) (HPMEC: $428,5 \pm 400,6$) $n = 3$). In Analogie dazu ließ sich auch das CD146-Protein in der Zelllinie detektieren. Messungen von CD146 ergaben eine signifikante Verringerung des Proteingehaltes sowohl in CI HPMEC ARLT + Dox ($3122 \pm 486,4$ vs. 7190 ± 3069 ; $p = 0,0474$; $n = 3$) als auch in CI HPMEC ARLT - Dox (1817 ± 1148 vs. 7190 ± 3069 ; $p = 0,0186$; $n = 3$) in Relation zum Proteingehalt in HPMEC. Die Proteinexpression war in den CI HPMEC ARLT + Dox im Vergleich zu den CI HPMEC ARLT – Dox höher ($3122 \pm 486,4$ vs. 1817 ± 1148 ; $p = 0,6789$; $n = 3$). Der Oberflächenmarker CD105 konnte in allen Zelltypen nachgewiesen werden. In CI HPMEC ARLT + Dox (3048 ± 1072 vs. 23414 ± 2959 ; $p < 0,0001$; $n = 3$) und in CI HPMEC ARLT – Dox (6038 ± 2002 vs. 23414 ± 2959 ; $p < 0,0001$; $n = 3$) konnte im Vergleich zu den HPMEC ein signifikanter Abfall der mRNA-Expression konstatiert werden. Der Abfall war bei den CI HPMEC ARLT – Dox weniger stark ausgeprägt als bei den CI HPMEC ARLT + Dox (6038 ± 2002 vs. 3048 ± 1072 ; $p = 0,229$; $n = 3$).

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die immortalisierte Zelllinie sowohl unter Kultivierungsbedingungen mit Doxycyclin als auch ohne Doxycyclin die für Endothelzellen typische Zellmorphologie aufweist. Wenngleich die Expressionshöhe einzelner Marker je nach Zelltyp differiert, exprimiert die Zelllinie die gleichen Gene und Proteine wie die primären Zellen und weist damit endothelspezifische Eigenschaften auf. Der Phänotyp der immortalisierten Zelllinie ähnelt dementsprechend insgesamt dem der primären Zellen.

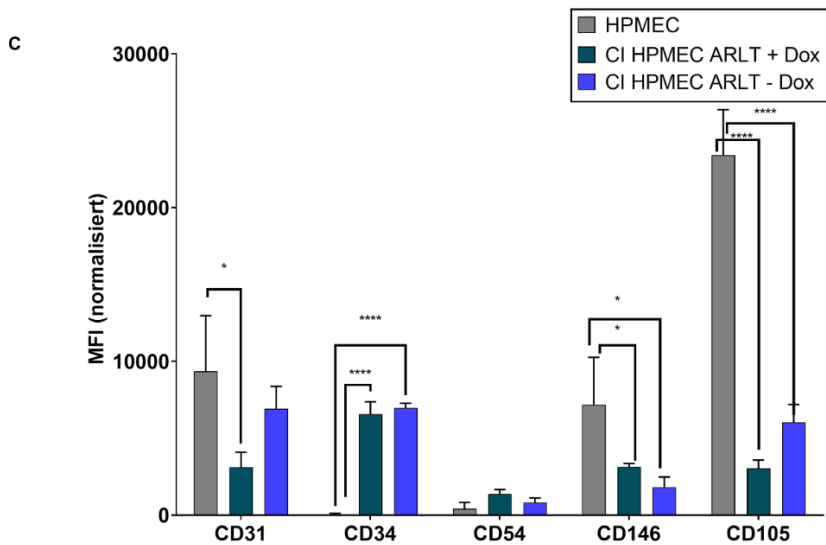
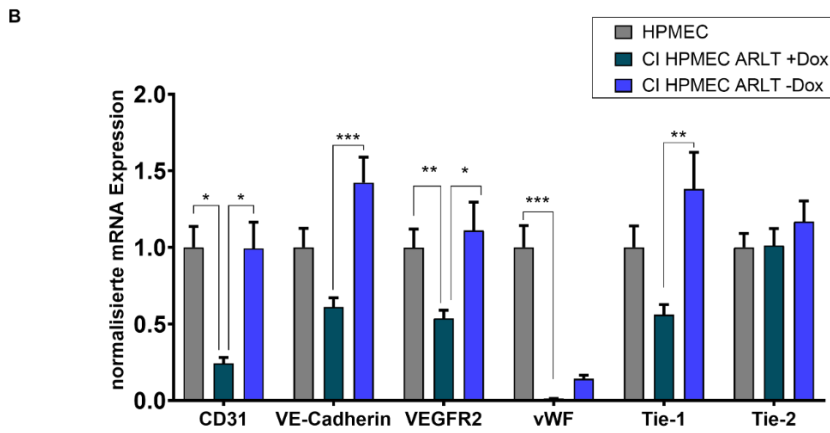
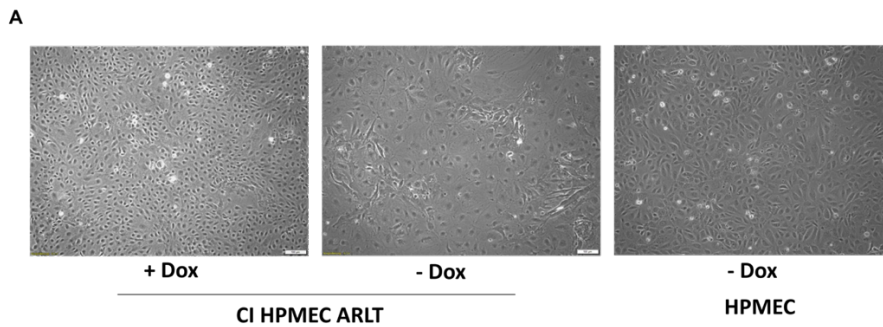


Abbildung 4: Phänotypische Eigenschaften der CI HPMEC ARLT

A) Aufnahmen unter dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung zur Beurteilung der Zellmorphologie und Zelldichtigkeit.

B) Expressionsprofil endothelialer Marker. Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von CD31, VE-Cadherin, VEGFR2, vWF, Tie-1 und Tie-2 in HPMEC, CI HPMEC ARLT – Dox und CI HPMEC ARLT + Dox gemessen (n =5/6).

C) Expressionsprofil endothelialer Oberflächenproteine. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Proteinexpression von CD31, CD34, CD54, CD146 und CD105 bestimmt (n=3). Die Auswertung der Daten erfolgte bei normalverteilten Daten mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey's Test. Lag keine Normalverteilung vor, wurden die Signifikanzen mittels Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's Test berechnet. Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.1.3 Funktionelle Charakteristika der CI HPMEC ARLT

Endothelzellen treten als Zellen mit einer Barrierefunktion ständig mit anderen Zellen und äußeren Einflüssen in Kontakt. Für sie ist daher neben ihrer typischen Zellmorphologie und der Expression verschiedener Oberflächenmarker charakteristisch, dass sie empfänglich für extrazelluläre Stimuli sind. Um zu untersuchen, ob die immortalisierte Zelllinie ebenfalls auf externe Stoffe reagiert, wurde die Methode der Durchflusszytometrie genutzt.

Es wurde zunächst der basale CD54-Gehalt in allen 3 Zelltypen bestimmt. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit TNF- α wurde die Proteinexpression von CD54 erneut gemessen. Abbildung 5A zeigt, dass die Stimulation mit TNF- α analog zu HPMEC (17661 ± 4569 vs. $466,8 \pm 316,1$; $p = 0,0095$; $n = 4$) in CI HPMEC ARLT + Dox (14419 ± 1430 vs. $1439 \pm 468,9$; $p < 0,0001$; $n = 4$) und - Dox (17784 ± 9324 vs. 1700 ± 1344 ; $p = 0,0061$; $n = 4$) zu einer signifikanten Erhöhung des CD54-Gehaltes führte.

Zum Schutz des Organismus vor Pathogenen besitzen Endothelzellen eine Barrierefunktion und bilden eine semipermeable Membran aus, welche allerdings bezogen auf ihre Durchlässigkeit durch äußere Stimuli veränderbar ist. Um zu untersuchen, ob die immortalisierte Zelllinie ebenfalls die typische Barrierefunktion von Endothelzellen erfüllt und die Permeabilität durch andere Substanzen modifiziert werden kann, wurde ein Permeabilitätsassay durchgeführt.

Abbildung 5B zeigt, dass die Permeabilität der Endothelzellen im Falle von HPMEC und CI HPMEC ARLT durch die Hinzugabe von Thrombin verbessert wurde. Bei den CI HPMEC ARLT + Dox ($1,407 \pm 0,4186$ vs. $1,088 \pm 0,2067$; $p = 0,9245$; $n = 3$) sowie HPMEC ($9,467 \pm 1,276$ vs. $6,73 \pm 2,274$; $p = 0,0958$; $n = 3$) war eine Erhöhung der Permeabilität in Relation zum unstimulierten Ausgangswert um ca. 40 % nachweisbar, während sich im Falle der CI HPMEC ARLT - Dox eine signifikante Erhöhung um den Faktor 2,8 detektieren ließ ($6,743 \pm 0,8608$ vs. $2,413 \pm 0,3614$; $p = 0,001$; $n = 3$). Durch die Substitution von TNF- α konnte nochmals eine Permeabilitätssteigerung verzeichnet werden. Im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox konnte eine Erhöhung auf das 2,2-Fache des unstimulierten Kontrollwertes erzielt werden ($2,240 \pm 0,6338$ vs. $1,088 \pm 0,2067$; $p = 0,0944$; $n = 3$). Bei Abstinenz von Doxycyclin führte eine Hinzugabe von Thrombin zu einem signifikanten Anstieg der Permeabilität auf das 3,5-Fache ($8,533 \pm 0,7616$; $p = 0,0001$; $n = 3$). In den HPMEC induzierte die Substitution von Thrombin und TNF- α eine

signifikante Permeabilitätsverbesserung um den Faktor 1,6 ($10,26 \pm 0,663$ vs. $6,73 \pm 2,274$; $p = 0,0229$; $n = 3$).

Bei Betrachtung der Daten wird deutlich, dass CI HPMEC ARLT funktionelle Charakteristika von Endothelzellen wie die Ausbildung einer Barrierefunktion erfüllen. Sie treten somit in Kontakt mit anderen Stoffen und können durch diese in ihrer Funktion beeinflusst werden.

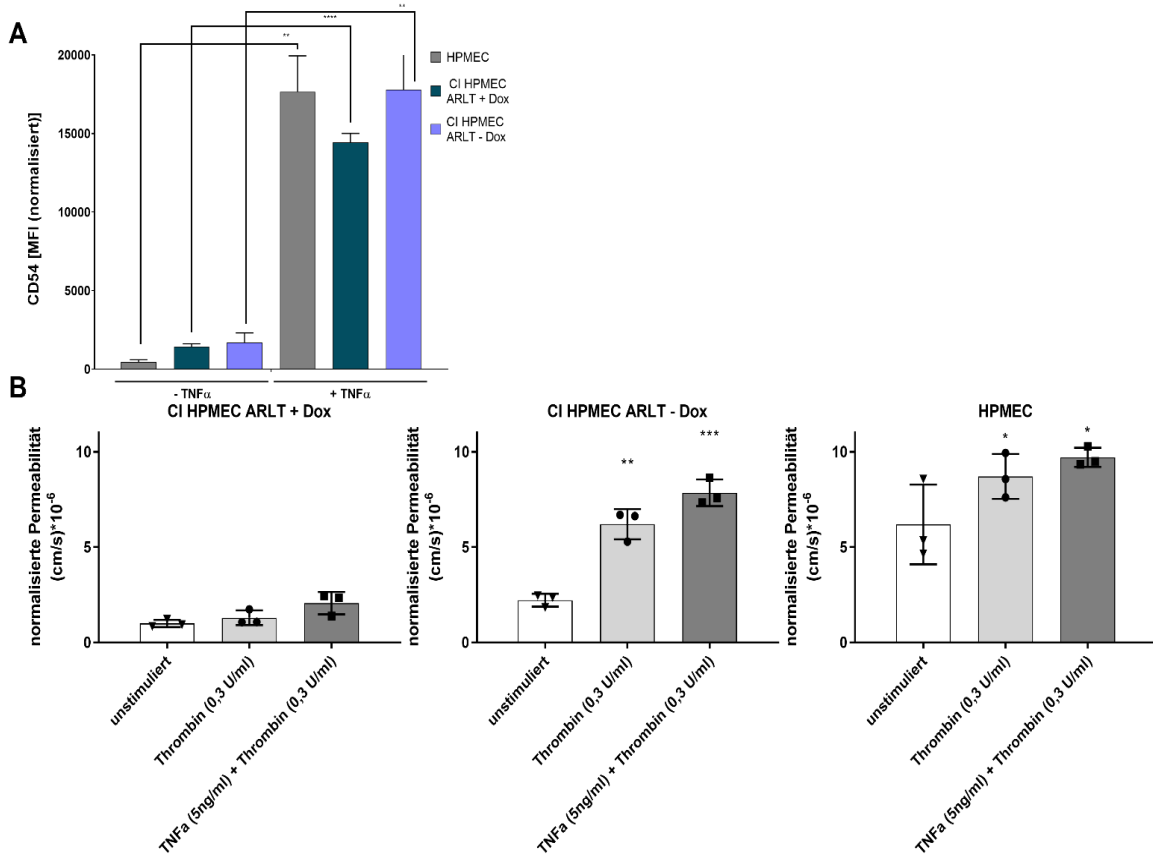


Abbildung 5: Funktionelle Charakteristika der CI HPMEC ARLT und HPMEC

A) Expression des Oberflächenmarkers CD54. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Proteinexpression von CD54 in HPMEC und CI HPMEC ARLT - Dox/+Dox gemessen. Die Messung erfolgte an unstimulierten Zellen sowie nach Hinzugabe von TNF- α (24 Stunden Stimulation). Die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test oder Mann-Whitney-Test berechnet ($n=4$).

B) Analyse der Barrierefunktion von CI HPMEC ARLT und HPMEC/Messung der Permeabilität. Mittels eines Permeabilitätsassays wurde die Permeabilität der CI HPMEC ARLT und HPMEC gemessen. Eine Messung erfolgte in unstimulierten Zellen sowie nach Hinzugabe von Thrombin (0,3 U/ml) und in Kombination mit TNF- α (5 ng/ml). Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend Dunnett's-Test berechnet ($n=3$). Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test verwendet.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.2 Einfluss von CSE

Nachdem gezeigt wurde, dass das Zellmodell funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen aufweist und durch externe Stimuli beeinflusst werden kann, wurde nachfolgend das Zellmodell genutzt, um den Einfluss von Zigarettenrauch auf Endothelzellen zu untersuchen. Zuvor wurde an Makrophagen getestet, ob der Zigarettenrauch als Stimulanz fungiert und inwieweit inflammatorische Marker durch Zigarettenrauch reguliert werden.

3.2.1 Inflammation in Makrophagen

Makrophagen als Teil des zellulären Immunsystems besitzen zahlreiche Funktionen im Rahmen der Pathogen- und Toxinelimination. Ihre wichtigste Aufgabe besteht in der Phagozytose von Mikroorganismen und anderen toxischen Stoffen. Die Phagozytose initiiert in den Makrophagen eine Entzündungsreaktion, die die Sekretion von Zytokinen sowie proinflammatorischer Faktoren zur Folge hat. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass Zigarettenrauch in Zellen eine Inflammationsreaktion bewirkt. Um zu überprüfen, ob der hergestellte Zigarettenrauch ebenfalls als Stimulanz wirkt, wurden Makrophagen für 24 Stunden mit Zigarettenrauch der Konzentrationen 1 % und 3 % behandelt. Es wurde im Detail getestet, ob in Makrophagen eine Entzündungsreaktion mit einhergehender Sekretion der proinflammatorischen Botenstoffe TNF- α und IL-6 nach Rauchstimulation resultiert. Nach erfolgter RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die mRNA-Expression von IL-6 und TNF- α zu bestimmen. Als Kontrolle kamen Zellen ohne Behandlung zum Einsatz, deren Genexpressionsmenge als 1 definiert wurde. Bei der quantitativen Analyse der TNF- α -mRNA konnte nach Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch kein Anstieg der mRNA-Abundanz verzeichnet werden, vielmehr war sogar eine Reduktion um 60 % erkennbar ($0,4177 \pm 0,3409$; $p = 0,3448$; $n = 3$). Die Stimulation mit 3 % CSE ließ die mRNA-Menge jedoch um das 5,5-Fache ansteigen ($5,568 \pm 2,219$; $p = 0,3448$; $n = 3$). Bezogen auf das IL-6-Gen war eine Erhöhung der mRNA-Abundanz nachweisbar, welche sich konzentrationsabhängig unterschied. Während eine Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch nur einen geringfügigen Anstieg der mRNA-Menge um 112 % zur Folge hatte ($2,126 \pm 1,033$; $p = 0,997$; $n = 3$), führte eine Behandlung mit 3 % Zigarettenrauch zu einem signifikanten Anstieg auf das 68-Fache ($68,24 \pm 32,11$; $p = 0,0104$; $n = 3$).

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass der hergestellte Zigarettenrauch als externer Stimulus fungiert, wobei Zigarettenrauch eine Expressionsveränderung der Gene IL-6 und TNF- α in Makrophagen bewirkt. Er ist dementsprechend an der Induktion inflammatorischer Prozesse beteiligt.

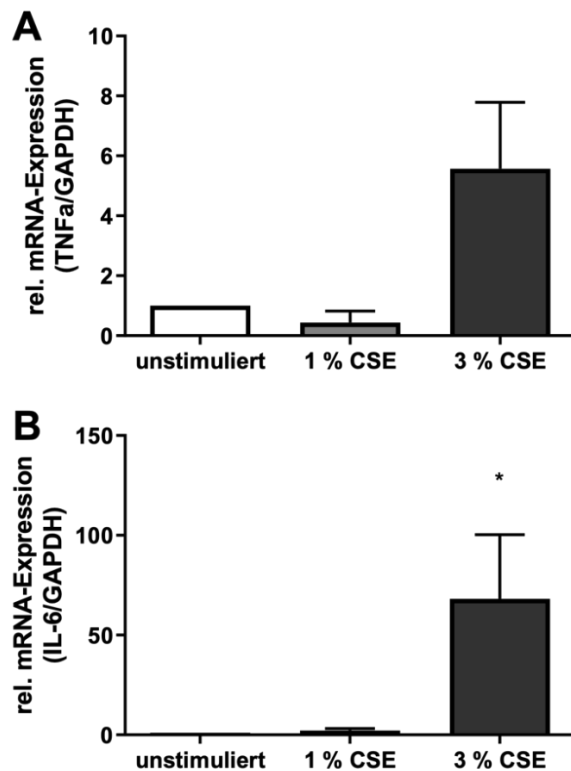


Abbildung 6: Expression von TNF- α und IL-6 in murinen Makrophagen

A) Expression von TNF- α in murinen Makrophagen nach Zigarettenrauchstimulation. Murine Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 1 % CSE sowie 3 % CSE behandelt. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die mRNA-Expression von TNF- α gemessen (n=3).

B) Expression von IL-6 in murinen Makrophagen nach Zigarettenrauchstimulation. Murine Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 1 % CSE sowie 3 % CSE behandelt. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die mRNA-Expression von IL-6 gemessen (n=3).

Die Signifikanz-Berechnung wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test durchgeführt. Bei Nichterfüllen der Normalverteilungsvoraussetzung kam der Kruskal-Wallis Test mit darauffolgendem Dunn's Test zur Anwendung.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.2.2 Einfluss von CSE auf die Permeabilität/Endothelfunktion

Die Barrierefunktion ist ein wichtiges funktionales Charakteristikum endothelialer Zellen. Eine Störung der Barrierefunktion kann zu einer endothelialen Dysfunktion führen, welche das Auftreten von Krankheiten begünstigt. Als Maß für die Barrierefunktion ist die Permeabilität zu nennen, welche die Durchlässigkeit einer

Membran definiert. Eine erhöhte Permeabilität ist demzufolge mit einer Störung der Barrierefunktion gleichzusetzen. Um zu ermitteln, ob Zigarettenrauch als Stimulus die Barrierefunktion von Endothelzellen beeinträchtigen kann, wurde ein Permeabilitätsassay durchgeführt. Hierzu wurden CI HPMEC ARLT – Dox und HPMEC mit 1 % und 3 % Zigarettenrauch stimuliert. Als Kontrolle fungierten unstimulierte Zellen, deren Permeabilität für die Vergleichsmessung als 100 Prozent definiert wurde. 30-50 Minuten nach Behandlung erfolgte die Messung der Permeabilität. Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass eine Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch bei den HPMEC keine signifikante Veränderung der Permeabilität hervorrief ($96,96 \pm 14,65$; $p = 0,955$; $n = 4$). Im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox war nach 1%iger Stimulation eine Erhöhung der Permeabilität um 8,6 % erkennbar ($108,6 \pm 13,34$; $p = 0,3096$; $n = 5$). Eine Stimulation mit 3 % CSE sorgte in beiden Zelltypen für eine erhebliche Erhöhung der Permeabilität. Bei den HPMEC ließ sich durch CSE-Stimulation ein Anstieg auf 121 % induzieren ($121,3 \pm 25,70$; $p = 0,1889$; $n = 4$). Im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox war eine signifikante Erhöhung um 17,5 % ($117,5 \pm 10,32$; $p = 0,0270$; $n = 5$) nachweisbar.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist erkennbar, dass durch Zigarettenrauch als Stimulus eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion verursacht werden kann.

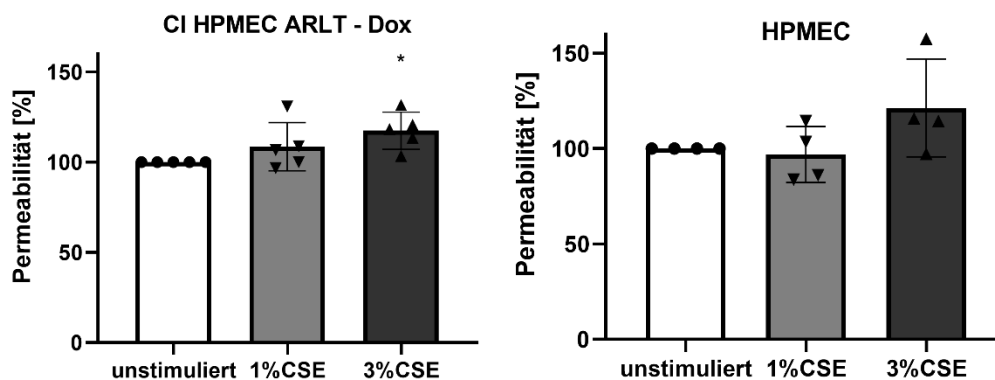


Abbildung 7: Messung der Permeabilität nach Zigarettenrauchexposition. CI HPMEC ARLT – Dox und HPMEC wurden mit 1 % CSE und 3 % CSE behandelt. Mittels eines Permeabilitätsassays wurde die Permeabilität in der unstimulierten Kontrollgruppe sowie in den beiden Behandlungsgruppen bestimmt ($n = 4$ HPMEC bzw. $n = 5$ CI HPMEC ARLT - Dox).

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.2.3 Einfluss von CSE auf die Apoptose-/Nekroserate

Eine gestörte Barrierefunktion kann unter anderem dadurch hervorgerufen werden, dass in Endothelzellen der apoptotische Zelluntergang eingeleitet wird mit einhergehendem Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Um zu untersuchen, ob Zigarettenrauch zur Apoptoseeinleitung in Endothelzellen führt, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Der Assay detektiert mittels Fluoreszenz das Wandern von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, eine typische Zellveränderung während der Apoptose. Zur Detektionsmessung wurde pSIVA-IANBD verwendet. Zusätzlich zur Apoptoserate kann der Apoptose-Assay die Anzahl nekrotischer Zellen bestimmen, da in nekrotischen Zellen die Zellmembran zunehmend permeabel wird und so von Propidium-Iodid gebunden werden kann. Dies löst ebenfalls eine Fluoreszenz aus, welche mit einem anderen Kanal gemessen wird. Zur Apoptose- und Nekrosedetektion wurden CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox und HPMEC mit verschiedenen Konzentrationen CSE behandelt (1 %, 3 % und 5 % Zigarettenrauch). Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe von pSIVA-IANBD und Propidium-Iodid. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Apoptose- und Nekroserate gemessen, welche in Abbildung 8A und Abbildung 8B dargestellt ist. Abbildung 8A ist zu entnehmen, dass bei allen Zellentypen nach 24 Stunden eine basale Apoptoserate von 2-3 Zellen/Well ohne Stimulation detektiert werden konnte. Nach Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch war in den CI HPMEC ARLT + Dox eine signifikante Erhöhung auf ca. 3,6 erkennbar ($3,589 \pm 0,1024$ vs. $2,738 \pm 0,3916$; $p = 0,0003$; $n = 4$). Ebenfalls ergab sich eine erhöhte Apoptoserate um 25 % in den CI HPMEC ARLT - Dox ($3,859 \pm 0,2138$ vs. $3,085 \pm 0,05608$; $p = 0,7043$; $n = 4$). In den HPMEC konnte nach 1%iger CSE-Stimulation eine signifikante Zunahme der Apoptosemenge um 20 % verzeichnet werden ($3,579 \pm 0,0742$ vs. $2,972 \pm 0,1008$; $p < 0,0001$; $n = 4$). Eine 3%ige Stimulation rief in den CI HPMEC ARLT + Dox einen signifikanten Anstieg auf 4,3 hervor ($4,282 \pm 0,03637$ vs. $2,738 \pm 0,3916$; $p < 0,0001$; $n = 4$). In den HPMEC und CI HPMEC ARLT - Dox war sogar eine noch höhere Zunahme, nämlich auf 4,5 ($4,577 \pm 0,03257$ vs. $2,972 \pm 0,1008$; $p < 0,0001$; $n = 4$) bzw. 5 ($5,145 \pm 0,1494$ vs. $3,085 \pm 0,05608$; $p = 0,0525$; $n = 4$) nachweisbar. 5 % Zigarettenrauch löste eine signifikante Erhöhung der Apoptosemenge um 87 % im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox ($5,125 \pm 0,1281$ vs. $2,738 \pm 0,3916$; $p < 0,0001$; $n = 4$) aus. In den CI HPMEC ARLT unter Bedingungen ohne Doxycyclin konnte ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate um 82 % ($5,619 \pm 0,07407$ vs. $3,085 \pm 0,05608$; $p = 0,0011$; $n = 4$) verzeichnet werden. In den HPMEC konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung um 83

% gemessen werden ($5,434 \pm 0,09633$ vs. $2,972 \pm 0,1008$; $p < 0,0001$; $n = 4$). Abbildung 8B veranschaulicht die Nekroserate nach 24 Stunden. Eine Stimulation mit Zigarettenrauch führte auch bezüglich der Nekrose zu konzentrationsabhängigen Veränderungen. Eine 1%ige Stimulation mit CSE rief in den CI HPMEC ARLT + Dox eine Erhöhung um 5 % hervor ($1,128 \pm 0,01258$ vs. $1,073 \pm 0,03594$; $p = 0,2288$; $n = 4$). In den CI HPMEC ARLT – Dox war ebenfalls ein geringfügiger Anstieg um 3 % zu verzeichnen ($1,207 \pm 0,04163$ vs. $1,17 \pm 0,02944$; $p = 0,3312$; $n = 4$). In den HPMEC führte eine 1%ige Stimulation analog zu den Ergebnissen der immortalisierten Zelllinie zu einer minimalen Erhöhung der Nekroserate ($1,143 \pm 0,0263$ vs. $1,138 \pm 0,03304$; $p = 0,9844$; $n = 4$). Eine Stimulation mit 3 % Zigarettenrauch ließ ebenfalls bei allen Zelltypen eine Erhöhung der Nekroserate verzeichnen. HPMEC und CI HPMEC ARLT + Dox zeigten nach Stimulation einen Anstieg auf 105 % des Kontrollwertes ($1,19 \pm 0,0216$ vs. $1,138 \pm 0,03304$; $p = 0,0313$; $n = 4$) bzw. auf das 1,06-Fache ($1,135 \pm 0,01732$ vs. $1,073 \pm 0,03594$; $p = 0,1141$; $n = 4$). Im Falle der CI HPMEC ARLT - Dox konnte sogar eine signifikante Steigerung um 21 % gemessen werden ($1,418 \pm 0,03304$ vs. $1,17 \pm 0,02944$; $p < 0,0001$; $n = 4$). Nach 5%iger Stimulation mit Zigarettenrauch wiesen die CI HPMEC ARLT - Dox ($1,273 \pm 0,0206$ vs. $1,17 \pm 0,02944$; $p = 0,0019$; $n = 4$) und HPMEC ($1,188 \pm 0,01708$ vs. $1,138 \pm 0,03304$; $p = 0,0402$; $n = 4$) eine signifikante Erhöhung auf, allerdings war diese weniger stark ausgeprägt als die Erhöhung der Nekroserate nach 3%iger Stimulation. Im Gegensatz dazu konnte bei den CI HPMEC ARLT + Dox ($1,155 \pm 0,01$ vs. $1,073 \pm 0,03594$; $p = 0,0021$; $n = 4$) bei 5%iger Stimulation nochmals eine signifikant erhöhte Nekroserate im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden, die zusätzlich höher ausfiel als die Nekrosemenge nach 3%iger Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass eine Behandlung endothelialer Zellen mit Zigarettenrauch in Endothelzellen zu einer Induktion von Apoptose und Nekrose führt. Das Ausmaß dieser Veränderung erfolgt konzentrationsabhängig.

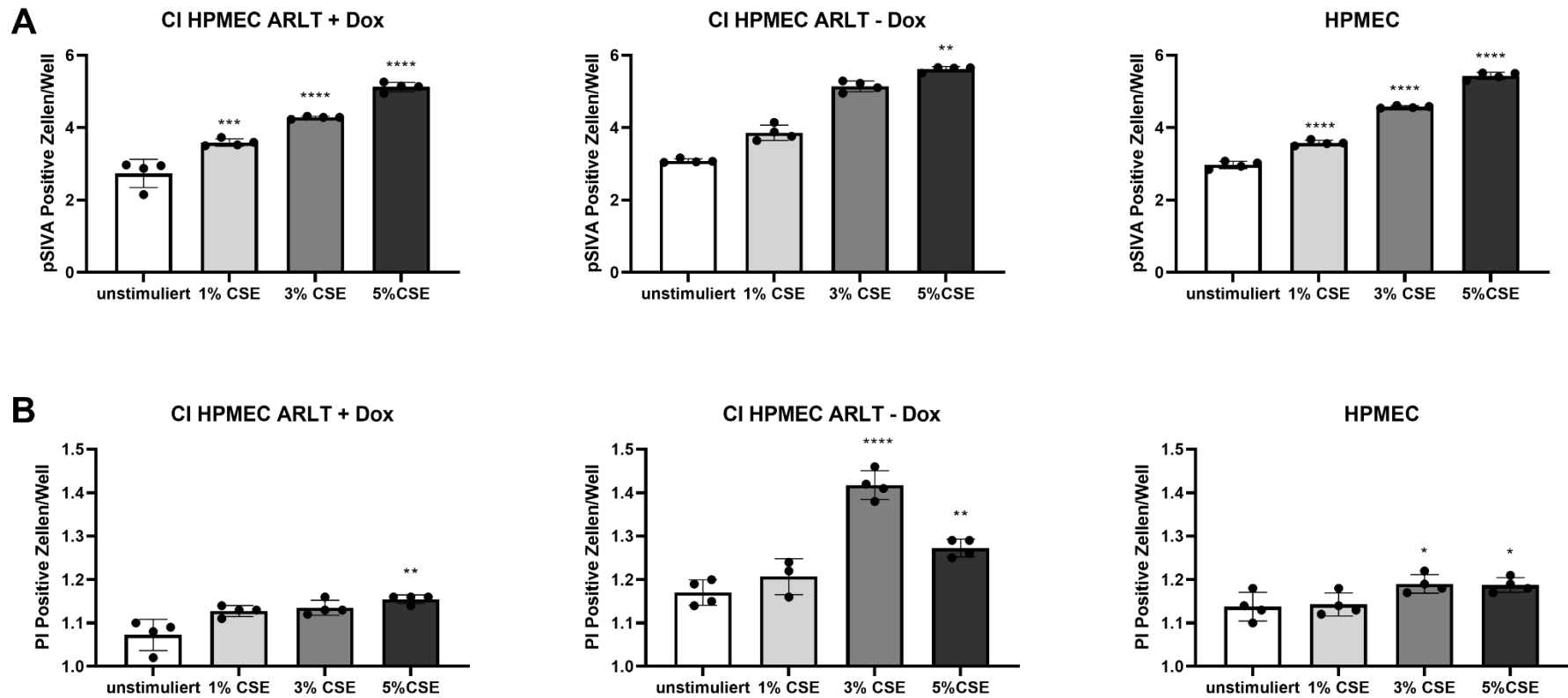


Abbildung 8: Sterberate der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Zigarettenrauchexposition

A) Apoptoserate der HPMEC und CI HPMEC ARLT. Mittels Apoptose-Assay wurde die Apoptoserate anhand von pSIVA-positiven Zellen gemessen. Eine Messung erfolgte bei unstimulierten Zellen sowie nach 24-stündiger Behandlung mit Zigarettenrauch der Konzentrationen 1 %, 3 % und 5 % (n=4).

B) Nekroserate der HPMEC und CI HPMEC ARLT. Mittels Apoptose-Assay wurde die Nekroserate anhand von PI-positiven Zellen gemessen. Eine Messung erfolgte bei unstimulierten Zellen sowie nach 24-stündiger Behandlung mit Zigarettenrauch der Konzentrationen 1 %, 3 % und 5 % (n=4).

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test. Bei Nichtvorliegen von Normalverteilung wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test durchgeführt.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.3 Molekulare Prozesse in der endothelialen Dysfunktion

3.3.1 Einfluss von CSE auf Eicosanoide

Nachdem gezeigt wurde, dass Zigarettenrauch zu einer Veränderung der Permeabilität und Apoptoserate führt und somit die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion begünstigen kann, sollte genauer untersucht werden, welche molekularen Prozesse in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion involviert sind und möglicherweise durch Zigarettenrauch beeinflusst werden können. Genauer gesagt wurde der Signalweg der Eicosanoide betrachtet, da Störungen bzw. Missverhältnisse in diesem Signalweg eine endotheliale Dysfunktion begünstigen können. Dementsprechend wurde untersucht, ob Zigarettenrauch auf die Genexpression von PTGIS, PTGS1 und PTGS2 Einfluss nimmt. Hierzu wurden CI HPMEC ARLT + Dox/- Dox und HPMEC mit Zigarettenrauchkonzentrationen von 1 % und 3 % für 24 Stunden stimuliert. Jedes Experiment beinhaltete unstimulierte Zellen, welche als Kontrolle fungierten und bei der Normalisierung der Daten auf 1 gesetzt wurden. Nach Isolation von RNA und Umschreibung in cDNA wurde die qRT-PCR verwendet, um die mRNA-Transkription der Gene PTGS1 (COX-1), PTGS2 (COX-2) und PTGIS (Prostacyclinsynthase) zu bestimmen.

Abbildung 9A ist zu entnehmen, dass sich die mRNA-Expression von PTGS1 konzentrationsabhängig nach Zigarettenrauchstimulation veränderte. In den CI HPMEC ARLT + Dox war nach Stimulation mit 1 % CSE eine geringfügige Erhöhung der COX-1-mRNA-Abundanz um 1,2 zu konstatieren ($1,211 \pm 0,1108$; $p = 0,2046$; $n = 5$). Unter Kultivierungsbedingungen ohne Doxycyclin führte eine 1%ige Behandlung ebenfalls zu einer minimalen Erhöhung der mRNA-Expression von PTGS1 ohne Signifikanz ($1,048 \pm 0,1875$; $p = 0,8190$; $n = 5$). Eine Stimulation der primären HPMEC mit 1 % CSE reduzierte die mRNA-Transkription von PTGS1 um 9 % ($0,9141 \pm 0,09185$; $p = 0,2646$; $n = 5$). Stimulierte man die Zellen hingegen mit 3 % Zigarettenrauch, zeigte sich sowohl im Falle der HPMEC als auch im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox eine Reduktion der mRNA-Menge von PTGS1. Während bei den CI HPMEC ARLT + Dox lediglich eine signifikante Verringerung auf 0,95 erfolgte ($0,9517 \pm 0,3267$; $p = 0,0067$; $n = 5$), war bei den CI HPMEC ARLT ohne Doxycyclin und HPMEC eine größere Reduktion nachweisbar. Sie betrug im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox 18 % ($0,8222 \pm 0,1608$; $p = 0,1257$; $n = 5$), bei den HPMEC rief eine Stimulation mit 3 % CSE einen signifikanten Abfall der mRNA-Menge um 28 % hervor ($0,7262 \pm 0,1265$; $p = 0,0008$; $n = 5$).

Bezogen auf das PTGS2-Gen (vgl. Abbildung 9B) zeigte sich nach 1%iger Behandlung mit Zigarettenrauch einheitlich eine Erhöhung der mRNA-Expression in allen 3 Zelltypen, welche im Falle der HPMEC eine Signifikanz aufwiesen. In den CI HPMEC ARLT + Dox war eine Erhöhung auf das 1,27-Fache nachweisbar ($1,271 \pm 0,3412$; $p = 0,3012$; $n = 5$), bei den CI HPMEC ARLT – Dox wurde ein Anstieg auf das 1,4-Fache ($1,395 \pm 0,3312$; $p = 0,3055$; $n = 5$) gemessen. Bezüglich der HPMEC ließ sich eine noch größere signifikante Erhöhung, nämlich um 90 % ($1,898 \pm 0,2609$; $p = 0,0007$; $n = 5$), detektieren. Eine Stimulation mit 3 % CSE führte in den CI HPMEC ARLT + Dox nicht zu einer Erhöhung der PTGS2-mRNA-Abundanz ($0,9905 \pm 0,3988$; $p = 0,9982$; $n = 5$). Im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox und HPMEC kam es jedoch nochmals zu einem deutlich höheren Anstieg der mRNA-Abundanz von PTGS2 um 71,5 % ($1,715 \pm 0,6941$; $p = 0,0463$; $n = 5$) bzw. auf das 3,6-Fache ($3,632 \pm 0,4267$; $p < 0,0001$; $n = 5$), welche in beiden Fällen als signifikant anzusehen war.

Abbildung 9C veranschaulicht die mRNA-Expression von PTGIS, welche bezogen auf die Zelllinien sehr einheitliche Ergebnisse zeigte. Im Falle einer 1%igen Behandlung mit Zigarettenrauch konnte keine Änderung der mRNA-Abundanz nachgewiesen werden ((CI HPMEC ARLT + Dox: $1,044 \pm 0,2137$; $p = 0,8677$; $n = 5$) (CI HPMEC ARLT - Dox: $1,062 \pm 0,2821$; $p = 0,8425$; $n = 5$) (HPMEC: $1,078 \pm 0,3764$; $p = 0,8557$; $n = 5$)). Nach Stimulation mit 3 % zeigte sich hingegen einheitlich eine Reduktion der mRNA-Expression von PTGIS. Während bei den CI HPMEC ARLT + Dox eine signifikante Verringerung um 36 % festgestellt werden konnte ($0,6405 \pm 0,2137$; $p = 0,0067$; $n = 5$), verminderte sich der mRNA-Gehalt im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox auf 71,6 % bezogen auf den Kontrollwert ($0,7161 \pm 0,2004$; $p = 0,0786$; $n = 5$). Der stärkste Abfall manifestierte sich nach 3%iger Stimulation der HPMEC. Verglichen mit dem unstimulierten Kontrollwert nahm die mRNA-Expression signifikant auf weniger als die Hälfte (48,4 %) ab ($0,4835 \pm 0,2579$; $p = 0,0169$; $n = 5$).

Aus den vorliegenden Daten wird erkennbar, dass eine Stimulation mit Zigarettenrauch in Endothelzellen zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung der Eicosanoid-Expression führt.

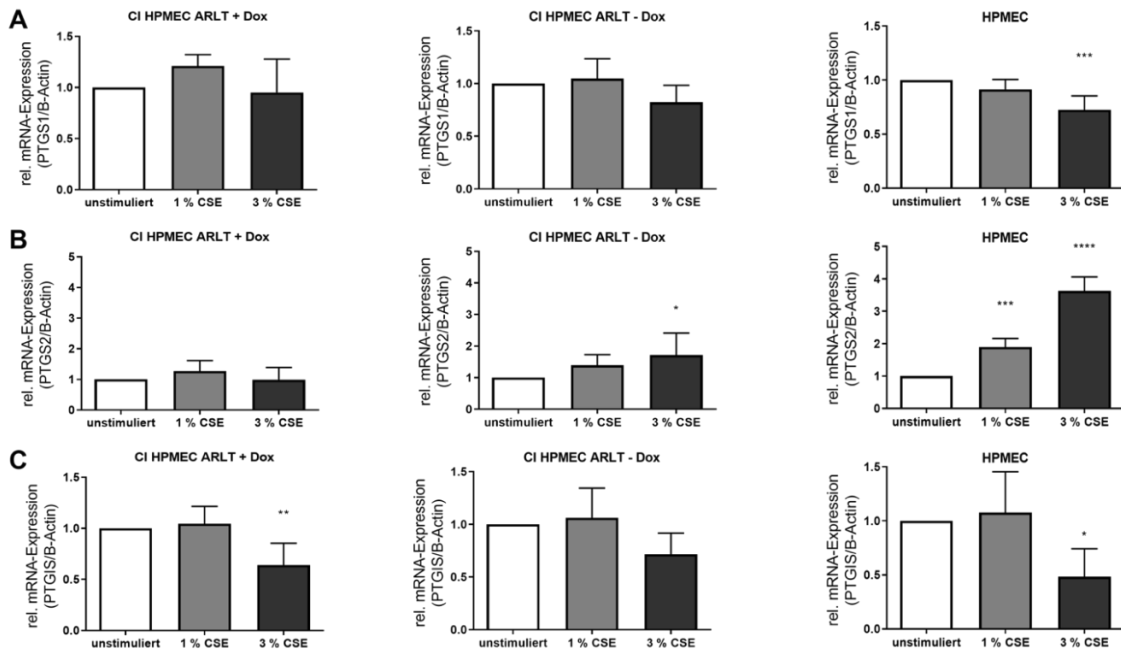


Abbildung 9: Eicosanoid-Expression der CI HPMEC ARLT und HPMEC nach Zigarettenrauchstimulation

A) mRNA-Expression von PTGS1 nach 24-stündiger Stimulation mit CSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 1 % CSE sowie 3 % CSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGS1 in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (1 % CSE und 3 % CSE) (n=5).

B) mRNA-Expression von PTGS2 nach 24-stündiger Stimulation mit CSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 1 % CSE sowie 3 % CSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGS2 in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (1 % CSE und 3 % CSE) (n=5).

C) mRNA-Expression von PTGIS nach 24-stündiger Stimulation mit CSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 1 % CSE sowie 3 % CSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGIS in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (1 % CSE und 3 % CSE) (n=5).

Die Signifikanzen wurden bei Erfüllung einer Normalverteilung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test berechnet. Falls keine Normalverteilung vorlag, erfolgte eine Signifikanz-Analyse mittels Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's Test.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.3.2 Einfluss von WSE auf Eicosanoide und Makrophagen

In Anlehnung an die Versuche mit Zigarettenrauch sollten im nächsten Schritt auch Experimente mit Holzrauch durchgeführt werden. Um zunächst zu überprüfen, ob auch Holzrauch in Zellen als Stimulanz fungiert und eine ähnliche proinflammatorische Wirkung wie Zigarettenrauch besitzt, wurden Makrophagen für 24 Stunden mit Holzrauch der Konzentrationen 0,5 % und 1 % behandelt. Anschließend erfolgten eine RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der proinflammatorischen Gene TNF- α und IL-6 gemessen. Zellen ohne Holzrauchbehandlung fungierten als Kontrolle, ihre Expressionsmenge wurde als 1 definiert.

Abbildung 10A veranschaulicht die Expressionsmenge des Gens TNF- α in der unstimulierten Kontrollgruppe sowie nach Stimulation mit 0,5 % Holzrauch und 1 % Holzrauch. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass eine Stimulation mit einer niedrigen Holzrauch-Konzentration (0,5 %) zu keiner nennenswerten Erhöhung der mRNA-Abundanz verglichen mit der Kontrollgruppe ($1,097 \pm 0,2561$; $p = 0,981$; $n = 3$) führte. Dies passt zu der Beobachtung nach 1%iger Zigarettenrauchstimulation, bei der sich ebenfalls keine Erhöhung der mRNA-Expressionsmenge von TNF- α konstatieren ließ. Eine 1%ige Stimulation hatte hingegen ähnlich zum Einfluss des Zigarettenrauches eine erhebliche signifikante Zunahme der mRNA-Expression von TNF- α auf das 6-Fache zur Folge ($6,289 \pm 1,247$; $p = 0,0002$; $n = 3$).

In Abbildung 10B ist die mRNA-Transkriptionsmenge von IL-6 dargestellt. Sie zeigt, dass bereits nach 0,5%iger Behandlung mit Holzrauch eine Steigerung der mRNA-Menge um den Faktor 18 messbar war ($18,59 \pm 15,03$; $p = 0,1099$; $n = 3$), deren Expressionsmenge nach der Stimulation mit 1 % WSE nochmals signifikant auf das 40-Fache gesteigert werden konnte ($40,01 \pm 6,821$; $p = 0,0043$; $n = 3$).

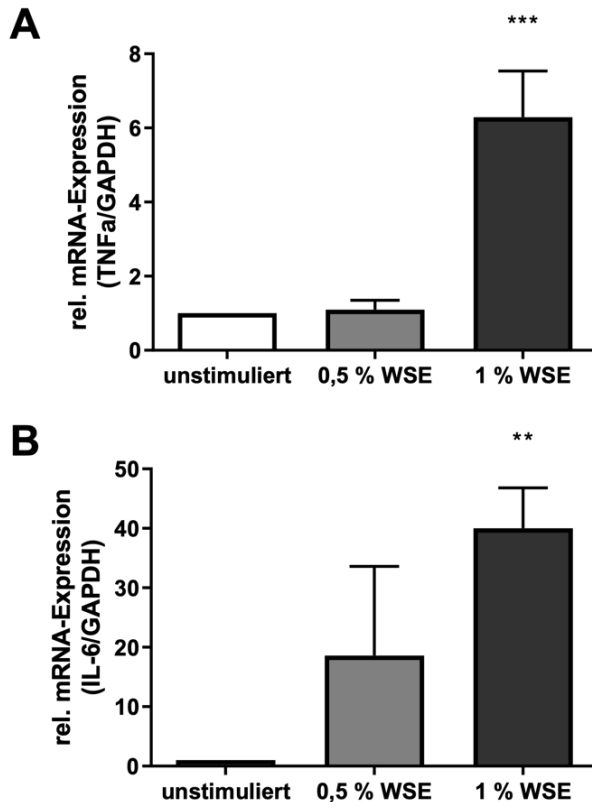


Abbildung 10: Expression von TNF- α und IL-6 in murinen Makrophagen

A) Expression von TNF- α in murinen Makrophagen nach Holzrauchstimulation. Murine Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 0,5 % WSE sowie 1 % WSE behandelt. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die mRNA-Expression von TNF- α gemessen (n=3).

B) Expression von IL-6 in murinen Makrophagen nach Holzrauchstimulation. Murine Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 0,5 % WSE sowie 1 % WSE behandelt. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die mRNA-Expression von IL-6 gemessen (n=3).

Die Signifikanz-Berechnung wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test durchgeführt. Bei Nichterfüllen der Normalverteilungsvoraussetzung kam der Kruskal-Wallis Test mit darauffolgendem Dunn's Test zur Anwendung.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob auch Holzrauch analog zu Zigarettenrauch Veränderungen der Eicosanoid-Genexpression hervorruft. Es wurde daher die mRNA-Expression von PTGS1, PTGS2 und PTGIS nach Behandlung der Zellen mit Holzrauch gemessen. Die Stimulation erfolgte auf CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox und HPMEC für einen Zeitraum von 24 Stunden mit den Konzentrationen 0,5 % WSE und 1 % WSE. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, deren mRNA-Abundanz auf 1 gesetzt wurde. Zur Messung kam die Methode der Polymerase-Kettenreaktion zum Einsatz.

Abbildung 11A veranschaulicht die mRNA-Expression von PTGS1. Aus ihr ist erkennbar, dass eine Stimulation mit 0,5 % Holzrauch in allen Zelltypen zu einer Reduktion der mRNA-Menge führte. Bei den CI HPMEC ARLT + Dox konnte eine signifikante Verringerung auf 65,5 % ($0,6549 \pm 0,274$; $p = 0,0112$; $n = 5$) festgestellt werden, bei den CI HPMEC ARLT - Dox war ein Abfall um 20 % ($0,8001 \pm 0,3891$; $p = 0,4587$; $n = 4$) zu verzeichnen. Bei den HPMEC zeigte sich eine Abnahme der mRNA-Abundanz von PTGS1 auf 0,86 ($0,8601 \pm 0,02251$; $p = 0,4348$; $n = 3$). Die Stimulation mit 1 % Holzrauch zeigte keine einheitlichen Veränderungen in den Zelltypen. Bei den HPMEC rief eine derartige Behandlung verglichen mit der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der mRNA-Abundanz auf das 1,6-Fache hervor ($1,616 \pm 0,2483$; $p = 0,0035$; $n = 3$). Bei der immortalisierten Zelllinie war hingegen erneut eine Reduktion zu verzeichnen, welche im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox signifikant -38 % im Vergleich zum Kontrollwert betrug ($0,6234 \pm 0,08837$; $p = 0,0065$; $n = 5$). Bei den CI HPMEC ARLT - Dox ließ sich eine signifikante Verringerung um sogar 55 % detektieren ($0,4546 \pm 0,2011$; $p = 0,0249$; $n = 4$).

Ebenso erfolgte die Messung der mRNA von PTGS2, deren Expressionsmenge in Abbildung 11B dargestellt ist. Eine Stimulation mit 0,5 % Holzrauch führte in allen Zelltypen zu einer erheblichen Erhöhung der mRNA-Abundanz. Bei den CI HPMEC ARLT + Dox konnte ein signifikanter 10,9-facher Anstieg verzeichnet werden ($10,90 \pm 9,977$; $p = 0,0356$; $n = 5$), während bei den CI HPMEC ARLT - Dox eine Erhöhung um den Faktor 2,8 gemessen werden konnte ($2,8 \pm 2,321$; $p = 0,0721$; $n = 4$). Im Falle der HPMEC war ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Abundanz um das 2,8-Fache detektierbar ($2,824 \pm 0,3191$; $p = 0,0857$; $n = 3$). Eine 1%ige Stimulation mit Holzrauch führte ebenfalls einheitlich zu einer Erhöhung der mRNA-Menge ((CI HPMEC ARLT + Dox: $2,964 \pm 1,251$; $p = 0,819$; $n = 5$) (CI HPMEC ARLT - Dox: $1,515 \pm 1,082$; $p > 0,9999$; $n = 4$) (HPMEC: $6,877 \pm 1,547$; $p = 0,0004$; $n = 3$). Diese war allerdings weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur Erhöhung nach 0,5%iger Stimulation.

Abbildung 11C veranschaulicht die mRNA-Expression des Gens PTGIS. Während sich nach Stimulation mit 0,5 % Holzrauch die mRNA-Expression in den CI HPMEC ARLT - Dox nur geringfügig veränderte ($0,9056 \pm 0,7509$; $p = 0,9398$; $n = 4$), rief die Stimulation bei den CI HPMEC ARLT + Dox eine signifikante Reduktion auf 50 % des Ausgangswertes hervor ($0,5024 \pm 0,1924$; $p < 0,0001$; $n = 5$). Bei den HPMEC ließ sich sogar eine signifikante Verringerung auf nur noch 37 % der mRNA-Expression von

PTGIS in der unstimulierten Kontrolle feststellen ($0,3669 \pm 0,0296$; $p < 0,0001$; $n = 3$). Die 1%ige Stimulation führte in allen 3 Zelltypen zu einem Abfall der mRNA-Abundanz verglichen mit der des Kontrollwertes. Bei der immortalisierten Zelllinie mit Doxycyclin betrug die Reduktion signifikant ca. 46 % ($0,4615 \pm 0,03837$; $p < 0,0001$; $n = 5$), im Falle von Kultivierungsbedingungen ohne Doxycyclin ergab sich eine Verringerung um 38 % ($0,718 \pm 0,2459$; $p = 0,6047$; $n = 4$). Bei den HPMEC konnte ein signifikanter Abfall auf 48,6 % detektiert werden ($0,4857 \pm 0,1268$; $p = 0,0003$; $n = 3$).

Die Ergebnisse aus den Experimenten zeigen, dass auch Holzrauch ähnlich wie Zigarettenrauch Einfluss auf den Eicosanoid-Signalweg nimmt und die Genexpression von PTGS1, PTGS2 und PTGIS konzentrationsabhängig verändert.

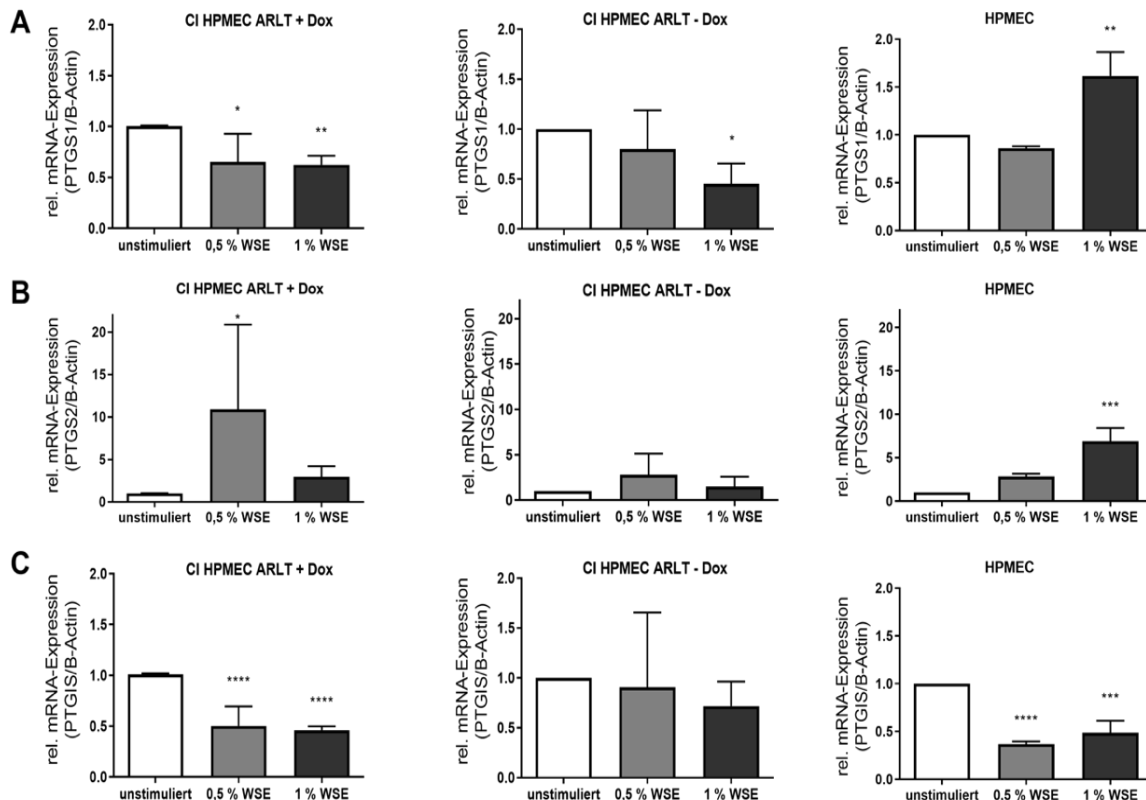


Abbildung 11: Eicosanoid-Expression der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Holzrauchexposition
A) mRNA-Expression von PTGS1 nach 24-stündiger Stimulation mit WSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 0,5 % WSE sowie 1 % WSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGS1 in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (0,5 % WSE und 1 % WSE).
B) mRNA-Expression von PTGS2 nach 24-stündiger Stimulation mit WSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 0,5 % WSE sowie 1 % WSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGS2 in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (0,5 % WSE und 1 % WSE).
C) mRNA-Expression von PTGIS nach 24-stündiger Stimulation mit WSE. CI HPMEC ARLT + Dox/-Dox sowie HPMEC wurden für 24 Stunden mit 0,5 % WSE sowie 1 % WSE behandelt. Mittels qRT-PCR erfolgte eine Messung der mRNA-Expression von PTGIS in den unstimulierten Zellen und den Behandlungsgruppen (0,5 % WSE und 1 % WSE).
Die Signifikanzen wurden bei Erfüllung einer Normalverteilung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test berechnet. Falls keine Normalverteilung vorlag, erfolgte eine Signifikanz-Analyse mittels Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's Test. Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.
CI HPMEC ARLT – Dox $n=4$ CI HPMEC ARLT + Dox $n=5$ HPMEC $n=3$

3.4 Iloprost

Iloprost, ein Wirkstoff aus der Klasse der Prostacyclin-Analoga wird aufgrund seiner thrombozytenaggregationshemmenden und gefäßerweiternden Wirkung unter anderem als Therapeutikum bei pulmonaler Hypertonie eingesetzt. Bis heute ist nicht genau geklärt, über welchen Mechanismus Iloprost im Organismus wirkt. Nachdem bereits untersucht wurde, ob Zigarettenrauch die Permeabilität und Apoptose endothelialer Zellen beeinflusst, sollte im Folgenden exploriert werden, ob Iloprost möglicherweise einen schützenden Effekt auf Endothelzellen ausübt und die Wirkung von Zigarettenrauch abschwächen kann.

3.4.1 Einfluss von Iloprost auf die Permeabilität

Um den Einfluss von Iloprost auf die Permeabilität zu ermitteln, wurde ein Permeabilitätsassay angewandt. Hierzu wurde die Permeabilität von CI HPMEC ARLT – Dox unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Unstimulierte Zellen fungierten als Kontrolle, deren Permeabilität für die Vergleichsmessung als 100 % festgelegt wurde. Während ein Teil der Zellen nur mit 3 % Zigarettenrauch behandelt wurde, wurde eine andere Gruppe mit 3 % Zigarettenrauch und zusätzlich Iloprost stimuliert. Zu einem Teil der Zellen wurde lediglich Iloprost hinzugegeben, um eine Aussage über die alleinige Wirkung von Iloprost treffen zu können. 30-50 Minuten nach Behandlung erfolgte die Messung der Permeabilität.

Abbildung 12 veranschaulicht die Permeabilität in % in Abhängigkeit von der jeweiligen Bedingung. Ihr lässt sich entnehmen, dass eine Stimulation mit Iloprost zu einer Verringerung der Permeabilität auf 61,8 % verglichen mit dem Kontrollwert führte ($61,8 \pm 27,71$ vs. $1,00 \pm 0,00$; $p = 0,1357$; $n = 3$). Weiterhin erkennbar ist, dass eine Stimulation mit 3 % Zigarettenrauch eine Erhöhung der Permeabilität um 22,4 % hervorrief ($122,4 \pm 14,39$ vs. $1,00 \pm 0,00$; $p = 0,5013$; $n = 3$). Diese Steigerung konnte durch die zusätzliche Zugabe von Iloprost jedoch aufgehoben werden, sodass insgesamt durch die Zugabe von Zigarettenrauch und Iloprost eine signifikante Verminderung der Permeabilität auf 65,54 % resultierte ($122,4 \pm 14,39$ vs. $65,54 \pm 20,82$; $p = 0,0247$; $n = 3$).

Die Auswertung des Permeabilitätsassays illustriert, dass Iloprost nicht nur bei alleiniger Gabe eine protektive Wirkung auf die Permeabilität besitzt. Vielmehr schwächt es ebenso die permeabilitäts-induzierenden Effekte im Rahmen einer Zigarettenrauchstimulation ab.

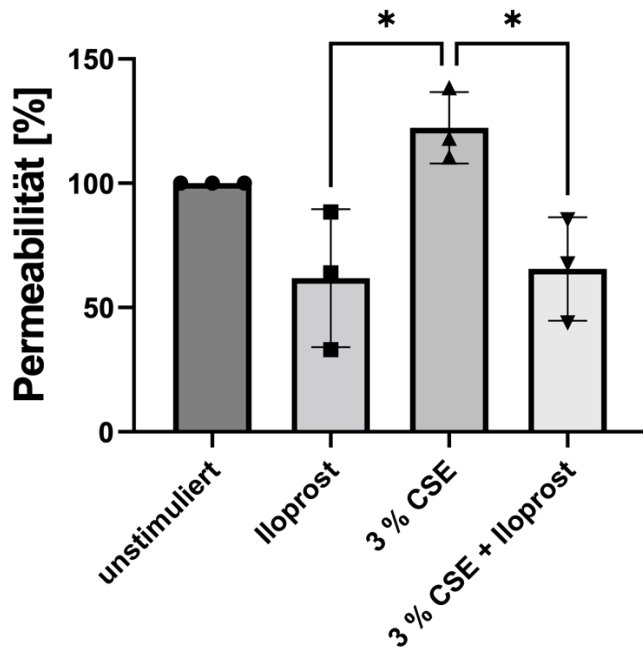


Abbildung 12: Messung der Permeabilität nach Zigarettenrauchexposition und Hinzugabe von Iloprost. CI HPMEC ARLT – Dox wurden mit 3 % CSE und Iloprost (10 µg/ml) behandelt. Mittels eines Permeabilitätsassays wurden die Permeabilität in der unstimulierten Kontrollgruppe sowie den drei Behandlungsgruppen bestimmt (n = 3).

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test.

Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

3.4.2 Einfluss von Iloprost auf Apoptose

Um zu eruieren, ob Iloprost auch die Apoptoserate beeinflusst, wurde ein Apoptose-Assay angewandt. Zur Apoptosemessung wurden CI HPMEC ARLT + Dox/- Dox und HPMEC mit verschiedenen Konzentrationen CSE behandelt (1 %, 3 % und 5 % Zigarettenrauch). Während weiterhin eine alleinige Zugabe von Iloprost erfolgte, wurde ebenfalls ein Teil der Zellen mit Zigarettenrauch und Iloprost behandelt (1 % CSE + Iloprost, 3 % CSE + Iloprost). Zur Detektion der basalen Apoptoserate fungierten unstimulierte Zellen. Direkt im Anschluss an die Stimulation erfolgte die Zugabe von pSIVA-IANBD und Propidium-Iodid. Die Messung der Apoptoserate erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubationszeit.

Die Messwerte sind in Abbildung 13 dargestellt. Aus der Grafik ist erkennbar, dass die basale Apoptoserate bei den CI HPMEC ARLT + Dox und CI HPMEC ARLT – Dox 2-3 Zellen/Well betrug, was im Einklang zur basalen Apoptoserate der HPMEC stand. Wie bereits in Kapitel 3.2.3 ausführlich beschrieben, führte eine Stimulation sowohl mit 1 %

Zigarettenrauch als auch mit einer Konzentration von 3 % und 5 % zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen in allen 3 Zelltypen. Die alleinige Substitution von Iloprost bewirkte in den Endothelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen ((CI HPMEC ARLT – Dox: $3,039 \pm 0,06439$ vs. $3,085 \pm 0,05608$; $p = 0,9944$; $n = 4$);(CI HPMEC ARLT + Dox: $2,846 \pm 0,1146$; $p = 0,997$; $n = 3$);(HPMEC: $2,974 \pm 0,1785$ vs. $2,972 \pm 0,1008$; $p > 0,9999$; $n = 4$)).

Im Gegensatz dazu schwächte die Hinzugabe von Iloprost bei gleichzeitiger Stimulation mit Zigarettenrauch den proapoptotischen Effekt des Zigarettenrauches ab. Bei den CI HPMEC ARLT + Dox führte eine Behandlung mit Iloprost nach 1%iger Zigarettenrauch-Stimulation zu einer signifikanten Verringerung der Apoptoserate um 4 % verglichen mit der alleinigen Stimulation mit 1 % CSE ($3,45 \pm 0,1836$ vs. $3,589 \pm 0,1024$; $p = 0,9106$; $n = 4$). Analog dazu war auch eine signifikante Verminderung der Apoptosemenge in den CI HPMEC ARLT – Dox nach Iloprost-Hinzugabe bei 1%iger CSE-Stimulation feststellbar und zwar auf 90 % des Wertes nach alleiniger Behandlung mit 1 % CSE ($3,488 \pm 0,04599$ vs. $3,859 \pm 0,2138$; $p = 0,0056$; $n = 4$). Die Zelllinie zeigte ähnliche Ergebnisse wie die primären Zellen, in denen die Iloprost-Behandlung ebenfalls die Apoptoserate nach Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch verringerte ($3,462 \pm 0,07823$ vs. $3,579 \pm 0,0742$; $p > 0,9999$; $n = 4$). Bei Betrachtung der Werte nach 3%iger Stimulation mit CSE und Behandlung mit Iloprost fiel ebenfalls eine Reduktion der Apoptosemenge verglichen mit der alleinigen Zigarettenrauch-Behandlung auf. Im Falle der CI HPMEC ARLT + Dox wurde die Apoptoserate um 2,3 % gesenkt ($4,185 \pm 0,1022$ vs. $4,282 \pm 0,03637$; $p = 0,98$; $n = 4$), während sich bei den CI HPMEC ARLT – Dox eine Verringerung um 2 % konstatieren ließ ($5,048 \pm 0,1202$ vs. $5,145 \pm 0,1494$; $p = 0,8722$; $n = 4$). Die immortalisierten Zellen verhielten sich auch bei 3%iger Stimulation mit CSE und Iloprost-Hinzugabe ähnlich zu den primären Zellen, in denen ebenfalls ein Abfall auf 95 % im Vergleich zur ursprünglichen Apoptoserate nach CSE-Exposition festgestellt werden konnte ($4,366 \pm 0,1003$ vs. $4,577 \pm 0,03257$; $p > 0,9999$; $n = 4$).

Aus den erhobenen Daten des Apoptose-Assays ist ersichtlich, dass Iloprost den proapoptotischen Effekt des Zigarettenrauches vermindern kann und protektiv in Bezug auf Apoptose wirkt.

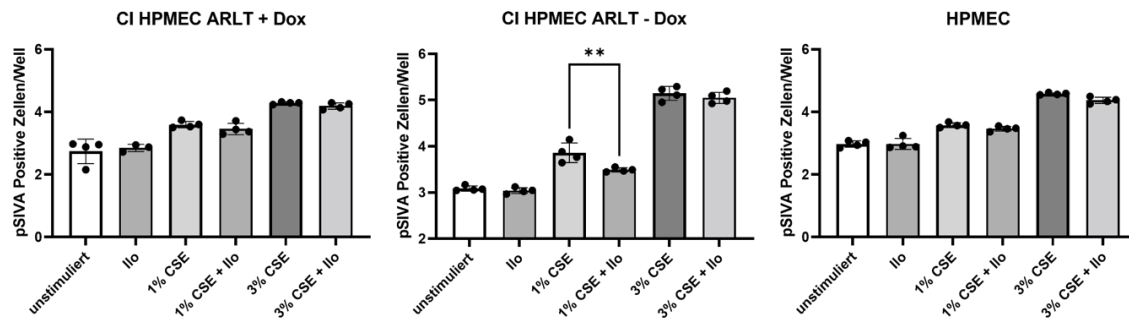


Abbildung 13: Apoptoserate der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Zigarettenrauchexposition und Iloprostgabe. Mittels Apoptose-Assay wurde die Apoptoserate anhand von pSIVA-positiven Zellen gemessen. Eine Messung erfolgte bei unstimulierten Zellen sowie nach 24-stündiger Behandlung mit Zigarettenrauch der Konzentrationen 1 % und 3 % sowie bei Zellen, die mit Iloprost (10 µg/ml) und Zigarettenrauch behandelt wurden. Die Signifikanzen wurden bei Erfüllung einer Normalverteilung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test berechnet. Falls keine Normalverteilung vorlag, erfolgte eine Signifikanz-Analyse mittels Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's Test. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden nur die Signifikanzen für unstimuliert vs. Iloprost und 1 % CSE vs. 1 % CSE + Iloprost sowie 3 % CSE vs. 3 % CSE + Iloprost dargestellt. Die restlichen Signifikanzen wurden bereits in Abbildung 8 dargestellt. Signifikanzen sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

4 Diskussion

Wissenschaftlichen Studien zufolge korreliert das Auftreten vieler kardiovaskulärer sowie respiratorischer Erkrankungen mit dem Vorhandensein einer endothelialen Dysfunktion (42,129,134). Demzufolge sind Untersuchungen zur Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion in den letzten Jahren vermehrt Bestandteil der Forschung geworden. Für das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion scheinen neben endogenen Faktoren (110,156) verschiedene Umweltnoxen prädisponierend zu wirken (79). Derzeitige Erkenntnisse gehen davon aus, dass sowohl Zigarettenrauch als auch Holzrauch Endothelzellen und endotheliale Prozesse beeinflussen, exakte Auswirkungen sind bis dato nicht vollumfänglich erforscht.

Ziel der Studie war es daher, die Auswirkungen von Rauchgas auf die Endothelfunktion und Inflammation zu untersuchen. Für die Experimente wurde eine immortalisierte Zelllinie sowie Makrophagen verwendet. Neben Experimenten zu Permeabilität, Apoptose und Nekrose wurden des Weiteren Genexpressionsanalysen durchgeführt. Einerseits wurden inflammatorische Marker (TNF- α , IL-6) gemessen. Eine endotheliale Dysfunktion kann durch ein Missverhältnis von Vasokonstriktion und Vasodilatation begünstigt werden, weshalb andererseits die Genexpression verschiedener Eicosanoide, welche den Gefäßtonus beeinflussen, bestimmt wurde. Diverse Experimente zur Endothelfunktion wurden zudem nach Hinzugabe des Prostacyclinanalogons Iloprost wiederholt, mit der Frage nach einem protektiven Effekt in Bezug auf eine endotheliale Dysfunktion.

Die Ergebnisse der Arbeit demonstrieren, dass die immortalisierte Zelllinie die für Endothelzellen typische Zellmorphologie und Gen-/Proteinexpression aufweist. Zudem erfüllt die immortalisierte Zelllinie funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen wie die Ausbildung einer Barrierefunktion. Nach Validation der immortalisierten Zelllinie als geeignetes Endothelzellmodell konnte festgestellt werden, dass die Exposition mit Zigarettenrauch die physiologischen Funktionen endothelialer Zellen beeinträchtigt. Die Behandlung mit Zigarettenrauch führte in Endothelzellen zu einer vermehrten Permeabilität und demzufolge zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion. Ein Apoptoseassay erbrachte den Nachweis, dass die Hinzugabe von Zigarettenrauch sowohl die Apoptose- als auch die Nekroserate steigert. Weiterhin ergaben RNA-Messungen, dass Zigarettenrauch und Holzrauch konzentrationsabhängig die Genexpression der

Eicosanoide (PTGS1, PTGS2 und PTGIS) verändert, deren Signalweg einen Schlüsselprozess in der Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion einnehmen könnte. In Experimenten mit dem Prostacyclinanalogon Iloprost konnte nachgewiesen werden, dass Iloprost einen schützenden Effekt auf Endothelzellen ausübt. Zum einen resultierte im Permeabilitätsassay bei gleichzeitiger Iloprost- und Zigarettenrauchsubstitution im Vergleich zur alleinigen Zigarettenrauchbehandlung eine signifikante Verminderung der Permeabilität. Zum anderen schwächte die Hinzugabe von Iloprost bei simultaner Zigarettenrauchexposition den proapoptischen Effekt des Zigarettenrauchs ab. Zudem wurde an Makrophagen getestet, ob Rauchgasextrakte an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind. Genexpressionsanalysen zu TNF- α und IL-6 verzeichneten eine Erhöhung der mRNA-Menge beider Gene nach Zigarettenrauch- und Holzrauchstimulation.

4.1 Immortalisierte Zelllinie als Endothelzellmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Experimente eine immortalisierte Zelllinie (CI HPMEC ARLT) verwendet. Die Immortalisierung sowie Kultivierung ist Kapitel 2.2.5 zu entnehmen.

Ein wesentlicher Vorteil einer immortalisierten Zelllinie stellt die aufgehobene Hayflick-Grenze im Vergleich zur Primärkultur dar. Primäre Zellen können sich nicht unendlich vermehren, da die Telomerverkürzung bei jeder Mitose nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen (ca. 52-mal bei menschlichen Zellen) zur Zellalterung und folglich auch zu adaptiven Veränderungen führt. Für Zellkulturexperimente ist häufig eine hohe Zellzahl erforderlich, weshalb die Verwendung primärer Zellen einen erheblichen Kostenfaktor impliziert. Zudem besteht bei primären Zellen aufgrund von Unterschieden bezüglich des Zellmaterials verschiedener Spender eine Heterogenität der Zellkultur. Durch Immortalisierung ist eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit und somit eine verlängerte Lebensdauer erreichbar. Mittels Kultivierung kann in kürzester Zeit eine hohe Zellzahl zur Verfügung gestellt werden, zudem resultiert aus der unbegrenzten Verfügbarkeit eine exorbitante Kosteneinsparung.

Bei der immortalisierten Zelllinie CI HPMEC ARLT handelt es sich um eine wachstumskontrollierte Zelllinie. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wird das Zellwachstum durch die Zugabe von Doxycyclin gesteuert. Nach Hinzugabe von Doxycyclin erfolgte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Transkription von SV40 T-Antigen, deren Menge

mit der Zellzahl korrelierte. Ohne Substitution stellte sich ein Zellzyklusarrest ein. Demzufolge wird bei der verwendeten Zelllinie eine unkontrollierte Proliferation verhindert und eine homogene Zellpopulation kann gewährleistet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Umgebungsbedingungen der Zellen (Temperatur, CO₂-Belastung) in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Zudem erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel, wodurch eine gleichmäßige Nährstoffversorgung gewährleistet wurde. Durch die oben genannte Standardisierung konnten reproduzierbare Ergebnisse sichergestellt werden.

Immortalisierte Zellen bergen aufgrund der genetischen Manipulation das Risiko, dass das Verhalten der Zellen *in vitro* nicht auf die Reaktion im lebenden Organismus übertragbar sein könnte. Primäre Zellen hingegen werden direkt aus Spendergewebe entnommen und zeigen ein ähnliches Verhalten zur *in-vivo*-Situation. Um zu evaluieren, ob die verwendete Zelllinie ein geeignetes Endothelzellmodell darstellt, wurde dieses mit primären Zellen verglichen. In der qRT-PCR sowie Durchflusszytometrie wurde festgestellt, dass die immortalisierte Zelllinie CI HPMEC ARLT genau wie primäre Zellen die für Endothelzellen typischen Gene und Oberflächenmarker exprimiert, wengleich die Expressionshöhe in primären und immortalisierten Zellen nicht identisch ist (vgl. Kapitel 3.1.2). Ebenso wies die immortalisierte Zelllinie mikroskopisch die endothelzellspezifische Kopfsteinpflasterstruktur auf. In Bezug auf die Dichtigkeit ergab sich nur bei Hinzugabe von Doxycyclin in den CI HPMEC ARLT verglichen mit den primären Zellen ein Unterschied. CI HPMEC ARLT – Dox und HPMEC verzeichneten mikroskopisch eine ähnliche Dichtigkeit.

Die immortalisierte Zelllinie erfüllt somit die für Endothelzellen typische Zellmorphologie und ähnelt phänotypisch den primären Zellen.

Kapitel 3.1.3 ist zu entnehmen, dass die immortalisierte Zelllinie auch funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen erfüllt. Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass eine 24-stündige Inkubation mit TNF- α die Proteinexpression von CD54 signifikant erhöht und die Zelllinie somit als empfänglich für externe Stimuli anzusehen ist. Weiterhin wurde im Permeabilitätsassay verzeichnet, dass die Hinzugabe von Thrombin und TNF-Alpha in immortalisierten Zellen genau wie in primären Zellen zu einer erhöhten Permeabilität führt. Folglich erfüllt auch die

immortalisierte Zelllinie funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen wie beispielsweise die Ausbildung einer Barrierefunktion.

Für die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergeben sich aufgrund der Modellauswahl jedoch auch gewisse Einschränkungen in Bezug auf die Übertragbarkeit auf die in-vivo-Situation im menschlichen Körper. In Zellkultorexperimenten ist es aufgrund der Komplexität des Organismus nicht exakt möglich, die physiologische Situation in vivo abzubilden. Hierfür sind beispielsweise Tiermodelle besser geeignet, wobei jedoch auch die ethischen Aspekte tierexperimenteller Studien berücksichtigt werden müssen.

Aus den o.g. Aspekten ist ersichtlich, dass die immortalisierte Zelllinie als Modellsystem für Endothelzellen geeignet ist und im Hinblick auf Kosteneinsparung, Wachstumskontrolle und aufgehobener Hayflick-Grenze erhebliche Vorteile mit sich bringt.

4.2 Einfluss von Rauchgasextrakt auf physiologische Endothelfunktionen

Die immortalisierte Zelllinie wurde in der vorliegenden Studie genutzt, um die Auswirkungen von Rauchgasextrakt auf Endothelzellen und deren Funktion zu testen. Zu den funktionellen Charakteristika endothelialer Zellen zählt die Ausbildung einer Grenzschicht, welche die Durchlässigkeit für bestimmte Agenzien reguliert (vgl. Kapitel 1.1). Ein durchgeführter Permeabilitätsassay erbrachte den Nachweis, dass Zigarettenrauch konzentrationsabhängig zu einer erhöhten Permeabilität endothelialer Zellen führt. Eine Inkubation für 30-50 Minuten mit 1 % Zigarettenrauch führte bereits zu einer Steigerung der Permeabilität um 8,6 %. Eine Konzentrationserhöhung auf 3 % Zigarettenrauch konnte sogar einen signifikanten Anstieg auf ca. 118 % im Vergleich zum Ausgangswert verzeichnen (vgl. Kapitel 3.2.2). Demzufolge beeinträchtigt die Exposition mit Rauchgas die Barrierefunktion endothelialer Zellen, welche ein entscheidendes funktionelles Charakteristikum von Endothelzellen darstellt.

Zur Ausbildung einer Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe sind Endothelzellen untereinander über Zell-Zell-Kontakte wie beispielsweise Adhärenskontakte oder Tight-Junctions verbunden (30). Eine beeinträchtigte Barrierefunktion kann durch einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte hervorgerufen werden (25). Ein Apoptose-Assay ergab den Nachweis, dass Zigarettenrauch in Endothelzellen zu einer Induktion von Apoptose und Nekrose führt. Die Rate apoptotischer und nekrotischer Zellen unterschied sich hierbei je

nach Rauchgaskonzentration. So konnte nach 5%iger Rauchgasstimulation eine Steigerung der Apoptoserate auf ca. 85 % im Vergleich zur basalen Apoptoserate gemessen werden. Die Anzahl nekrotischer Zellen stieg ebenfalls nach Zigarettenrauchbehandlung, als Höchstwert wurde ein Anstieg um 21 % verzeichnet (vgl. Kapitel 3.2.3). Entsprechend führt die Behandlung mit Rauchgas zu einem vermehrten Zelluntergang, welcher mit einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten einhergeht und folglich eine suffiziente Barriereausbildung nicht mehr gewährleistet.

Andere Forschungsgruppen kamen ebenfalls zu der Erkenntnis, dass Zigarettenrauch als Risikofaktor für das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion angesehen werden kann. Beispielsweise untersuchte die Forschungsgruppe Bernhard et al. die Struktur der Mikrotubuli nach Zigarettenrauchexposition und dokumentierte eine Depolymerisation der Mikrotubuli nach Behandlung. Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls eine physikalische Schädigung der Endothelzellen verzeichnet werden konnte. Zudem decken sich die Messungen der vorliegenden Studie zur Apoptose und Nekrose mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Diese kamen in ihren Untersuchungen ebenfalls zu dem Resultat, dass Zigarettenrauch den Zelluntergang fördert (107,135,162). Zahlreiche Studien in vitro als auch in vivo beschäftigten sich mit dem Einfluss von Zigarettenrauch in Bezug auf oxidativen Stress, dessen Vorhandensein ebenfalls als Trigger für eine endotheliale Dysfunktion gilt (139). Zum einen wurde eine erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidase nach Stimulation dokumentiert, zum anderen war auch die Konzentration an Superoxidanionen nachweislich gesteigert (1,22,176).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie gehen folglich konform mit den Beobachtungen anderer Studien, dass Rauchgasextrakt an dem Entstehen einer endothelialen Dysfunktion mitbeteiligt ist.

4.3 Inflammation im Rahmen der Rauchgasexposition

Eine endotheliale Dysfunktion impliziert die Ausschüttung diverser Zytokine und Selektine, welche inflammatorische Prozesse initiieren und die Diapedese von Leukozyten ermöglichen (148,155). Neben Endothelzellen zählen Makrophagen zu den entscheidenden Mediatoren von Entzündungsreaktionen. Vor diesem Hintergrund wurden Makrophagen für 24 Stunden mit Zigarettenrauch und Holzrauch behandelt und die mRNA-Menge der proinflammatorischen Gene TNF- α und IL-6 bestimmt. In der

durchgeführten qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass eine 1%ige Stimulation mit Zigarettenrauch keine signifikante Veränderung der mRNA-Menge von TNF- α und IL-6 hervorrief. Bei höherer Konzentration (3 % Zigarettenrauch) konnte hingegen ein Anstieg von TNF- α um das 5,5-Fache gemessen werden. In Bezug auf das IL-6-Gen war sogar eine signifikante Erhöhung der mRNA-Abundanz auf das 68-Fache im Vergleich zum Ausgangswert nachweisbar (vgl. Kapitel 3.2.1).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein. Diese dokumentierten ebenfalls einen entzündungsfördernden Effekt durch Zigarettenrauch. Beispielsweise wurden im Blut rauchender Personen im Vergleich zur Kontrollgruppe der Nichtraucher eine erhöhte Rate der inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α gemessen (6). Korrespondierend dazu wurden bei Rauchern erhöhte Spiegel an Neutrophilen, welche zusätzlich zu Makrophagen in Entzündungsvorgänge involviert sind, verzeichnet (71). Ebenso wurden Tierexperimente und in vitro Modelle genutzt, um akute Effekte des Zigarettenrauch zu untersuchen. Diese ergaben, dass auch eine kurzzeitige Stimulation mit Zigarettenrauch die Expression proinflammatorischer Mediatoren fördert (72,121). Zudem wurde auch nach kurzzeitiger Inkubation eine erhöhte Anzahl inflammatorischer Zellen registriert (81,145).

Außer Zigarettenrauch scheint auch Holzrauch zelluläre Funktionen zu beeinflussen. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge wird ein vermehrtes Auftreten sowie die Progression diverser Krankheiten nach Holzrauchexposition beobachtet (vgl. Kapitel 1.5). Bis dato ist nicht genau erforscht, welchen genauen Beitrag Holzrauch zur Krankheitsentstehung und -fortschreitung leistet. In Anbetracht aktueller Studien wird von einem Einfluss auf inflammatorische Prozesse ausgegangen. Im Zuge dessen wurde in der vorliegenden Studie analog zu den Experimenten mit Zigarettenrauch ebenso eine Behandlung der Makrophagen mit Holzrauch durchgeführt. Nach Stimulation mit 0,5 % Holzrauch konnte ähnlich zu der Beobachtung nach Behandlung der Zellen mit niedriger Zigarettenrauchkonzentration keine signifikante Änderung der mRNA-Transkription von TNF- α gemessen werden. In Bezug auf das IL-6-Gen war jedoch eine Erhöhung der exprimierten mRNA um den Faktor 18 detektierbar. Eine 1%ige Stimulation mit Holzrauch führte zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression von TNF- α auf das 6-Fache, die Transkriptionsmenge der IL-6-mRNA konnte sogar signifikant auf das 40-Fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe angehoben werden (vgl.

Kapitel 3.3.2). Die gemessenen Werte belegen, dass Holzrauch eine ähnliche proinflammatorische Wirkung wie Zigarettenrauch besitzt, indem er die Expression entzündungsfördernder Zytokine verstärkt. Im Einklang zu den Forschungsergebnissen der vorliegenden Arbeit stehen auch bereits durchgeführte Zellkulturexperimente an Epithelzellen und Monozyten. Die Forschungsgruppen Bølling et al. sowie McCarthy et al. beobachteten eine Zunahme der Inflammationsmarker GM-CSF, TNF- α sowie der Interleukine 6 und 8. Neben Zellkulturanalysen wurden bis dato Studien durchgeführt, in welchen das Blutserum von Holzrauch-exponierten Individuen auf die Expression spezifischer inflammatorischer Biomarker untersucht wurde. Diese verzeichneten erhöhte Spiegel von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin sowie IL-1ra, IL-6 und IL-8 (19,39).

In Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse dieser Studie sowie den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen übt Zigarettenrauch über die vermehrte Expression diverser Zytokine und Selektine sowie die Aktivitätssteigerung entzündungsvermittelnder Zellen eine proinflammatorische Wirkung auf den Organismus aus. Analog zu Zigarettenrauch beeinflusst auch die Exposition mit Holzrauch die Expressionsmenge proinflammatorischer Gene. Entzündungszustände im Organismus prädestinieren das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion und sorgen bei bereits vorliegendem Endothelschaden zu dessen Fortschreiten. Demzufolge sind sowohl Zigarettenrauch als auch Holzrauch über die Induktion proinflammatorischer Prozesse am Auftreten und Fortschreiten kardiovaskulärer und respiratorischer Erkrankungen beteiligt.

4.4 Einfluss von Rauchgasextrakt auf molekulare Prozesse in der endothelialen Dysfunktion

Nachdem in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Rauchgasextrakt auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion untersucht wurde, wurden weiterhin Experimente durchgeführt, um zu evaluieren, welche molekularen Prozesse in der endothelialen Dysfunktion eine Rolle spielen könnten. Im Speziellen wurden die Auswirkungen von Zigarettenrauch und Holzrauch auf den Eicosanoid-Signalweg betrachtet. Aktuellen Erkenntnissen wissenschaftlicher Studien zufolge scheinen Cyclooxygenasen, insbesondere die Cyclooxygenase-2 maßgeblich in inflammatorische Prozesse involviert zu sein (149,165). Bis dato ist bekannt, dass es sich bei der Cyclooxygenase-2 um ein induzierbares Enzym handelt, welches zum einen im Rahmen inflammatorischer Vorgänge vermehrt exprimiert wird, dessen Produktion zum anderen

aber auch direkt durch Endotoxine, Mitogene und Tumorentagenen gesteigert werden kann (vgl. Kapitel 1.6). Cyclooxygenasen sind bekanntlich an der Synthese verschiedener Prostaglandine und Thromboxane beteiligt. An wissenschaftlicher Bedeutung hat insbesondere Prostacyclin gewonnen, ein Prostaglandin mit vasodilatatorischer Wirkung. Forschungsgruppen haben bereits die Hypothese aufgestellt, dass ein Prostacyclinmangel mit dem Auftreten einer pulmonalen Hypertonie assoziiert sein könnte (83). Demzufolge könnte ein Missverhältnis von Vasokonstriktion und Vasodilatation ebenso die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und entsprechend auch die Entwicklung weiterer Krankheiten begünstigen (42,134).

Nach Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch über 24 Stunden war in der qRT-PCR keine signifikante Veränderung der mRNA-Menge von PTGS1 und PTGIS nachweisbar. Eine Behandlung mit höherer Konzentration (3 % Zigarettenrauch) führte jedoch zu einer sichtbaren Abnahme der mRNA-Abundanz von PTGS1 und PTGIS (vgl. Abbildung 9A + C). Des Weiteren wurde der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Expression des PTGS2-Gens untersucht. Nach Stimulation mit 1 % Zigarettenrauch wurde einheitlich in allen Zelltypen eine Erhöhung der mRNA-Menge verzeichnet. Eine 3%ige Behandlung führte in den CI HPMEC ARLT + Dox zu keiner signifikanten Änderung, im Falle der CI HPMEC ARLT – Dox und HPMEC war allerdings ein deutlich höherer signifikanter Anstieg detektierbar (vgl. Abbildung 9B).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Genexpressionsanalysen nach 24-stündiger Behandlung mit Holzrauch. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine Stimulation mit Holzrauch in Endothelzellen analog zu Zigarettenrauch eine Erhöhung der mRNA-Menge von PTGS2 hervorrief (vgl. Abbildung 11 B). Des Weiteren konnte eine Verringerung der mRNA-Abundanz des PTGIS-Gens nach Stimulation mit Holzrauch nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11 C). In Bezug auf das PTGS1-Gen führte nur die Stimulation mit 0,5 % Holzrauch in HPMEC zu einer Reduktion der mRNA-Menge. Nach Behandlung mit 1 % Holzrauch war eine Erhöhung der mRNA-Expression von PTGS1 nachweisbar. Die immortalisierte Zelllinie verzeichnete hingegen sowohl bei 0,5%iger Stimulation als auch bei 1%iger Behandlung einen Abfall der mRNA-Abundanz von PTGS1.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein. Bis dato sind zum Einfluss von Rauchgasextrakt auf den

Eicosanoid-Signalweg nur wenige Studien vorhanden. Analog zu unseren Erkenntnissen wurde nach Zigarettenrauchexposition *in vitro* eine verminderte Expression der Gene von COX-1 und Prostacyclin sowie ein Anstieg der COX-2-mRNA und cPLA2-mRNA beobachtet (112,125). Des Weiteren wurde auch eine verminderte Proteinexpression von Prostacyclin im Lungengewebe von Emphysepatienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen (112). Im Einklang zu unseren Beobachtungen an Endothelzellen wurde auch in humanen Fibroblasten der Lunge nach Zigarettenrauchexposition eine veränderte Eicosanoidexpression verzeichnet, und zwar wurde eine Induktion der COX-2- und PGE-2-Synthese detektiert (101). Auch *in vivo* konnte festgestellt werden, dass Zigarettenrauch auf den Eicosanoid-Signalweg Einfluss zunehmen scheint (169). Bezüglich Holzrauch ist nach aktueller Studienlage bekannt, dass Holzrauch-exponierte Individuen eine gesteigerte Expression von COX-2 aufweisen und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Karzinomen tragen (65). Diverse andere epidemiologische Studien demonstrierten ebenso einen Zusammenhang zwischen der Exposition mit Holzrauch und dem Auftreten von kardiovaskulären und respiratorischen Erkrankungen sowie einem erhöhtem Tumorrisiko (31,45,86). Nach bestem Wissen sind bis dato keine konkreten Untersuchungen zum Einfluss von Holzrauch auf den Eicosanoid-Signalweg erfolgt.

Bei Betrachtung der erhobenen Daten wird ersichtlich, dass Zigarettenrauch konzentrationsabhängig zu einer Veränderung der mRNA-Expression von COX-1, COX-2 und der Prostacyclinsynthese in Endothelzellen führt. Analog zu Zigarettenrauch bewirkt auch Holzrauch in Endothelzellen eine veränderte Genexpression der genannten Eicosanoide. COX-1, ein ubiquitär vorkommendes Enzym, besitzt überwiegend eine protektive Wirkung im menschlichen Organismus. Ein Mangel an COX-1, welcher, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, durch Zigarettenrauch und Holzrauch hervorgerufen werden kann, beeinträchtigt somit physiologische Zellfunktionen und kann folglich auch die Gewebshomöostase stören. Zu ähnlichen Auswirkungen kann ein durch Rauchgasextrakt induzierter Prostacyclinmangel führen. Resultat eines Prostacyclinmangels ist eine vermehrte Vasokonstriktion mit einhergehender Minderdurchblutung nachgeschalteter Organe, was eine erhebliche Funktionsstörung der Organe zur Folge haben kann. Demzufolge scheinen sowohl Zigarettenrauch als auch Holzrauch durch eine Veränderung des Eicosanoid-Signalwegs an der Entstehung von Funktionsstörungen am Endothel und diverser Krankheiten beteiligt zu sein.

4.5 Prostacyclinanaloga zur Protektion vor endothelialer Dysfunktion

Wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge liegt bei der pulmonalen Hypertonie ein Missverhältnis zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation vor, welches unter anderem mit dem Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion einhergeht (83). Iloprost, ein Prostacyclinanalogon mit vasodilatatorischen Eigenschaften, wird daher therapeutisch seit vielen Jahren bei der pulmonalen Hypertonie eingesetzt (7). Der zelluläre Einfluss von Iloprost ist bis dato nicht vollumfänglich erforscht. Ziel der vorliegenden Studie war es daher zu untersuchen, welche Effekte durch Iloprost in Endothelzellen hervorgerufen werden und inwieweit Iloprost einer durch Zigarettenrauch-induzierten endothelialen Dysfunktion entgegensteuern kann.

In einem durchgeführten Permeabilitätsassay konnte nachgewiesen werden, dass eine alleinige Behandlung mit Iloprost für 30-50 Minuten zu einer reduzierten Permeabilität auf 61,8 % im Vergleich zum Ausgangswert ohne Stimulation führte (vgl. Abbildung 12). Der Abbildung ist ebenso entnehmbar, dass durch die Exposition mit Zigarettenrauch ein Permeabilitätsanstieg hervorgerufen wurde. Von entscheidendem Interesse ist die Beobachtung, dass nach gleichzeitiger Behandlung mit Zigarettenrauch und Iloprost kein Anstieg der Permeabilität verzeichnet werden konnte. Vielmehr resultierte trotz Zigarettenrauchexposition eine signifikante Verminderung der Permeabilität auf ca. 65 %.

Ein Apoptoseassay erbrachte den Nachweis, dass die isolierte Inkubation mit Iloprost im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe keine signifikante Änderung der Apoptoserate zur Folge hatte (vgl. Abbildung 13). Im Gegensatz dazu wurde erwartungsgemäß nach Zigarettenrauchbehandlung eine gesteigerte Apoptoserate gemessen. Bei Zugabe von Zigarettenrauch und Iloprost wurde im Vergleich zur alleinigen Substitution von Zigarettenrauch eine geringere Anzahl an Apoptosen verzeichnet. Analog zu den Ergebnissen des Permeabilitätsassays führt demzufolge die Behandlung mit Iloprost auch bezüglich des Zelltodes zu einer Abschwächung des Zigarettenrauch-induzierten Effektes.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stehen auch die Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen. Ferner konnte in Tiermodellen, welche aufgrund ischämischer oder anderweitig geschädigter Gewebe eine gestörte Barrierefunktion aufwiesen, nach Iloprostinzugabe ein abschwächender Effekt dokumentiert werden

(12,13). Genauer gesagt wurde Iloprost analog zu unseren Resultaten eine Permeabilitätsverbessernde Wirkung zugesprochen. Im Rahmen von Experimenten an Ratten stellten andere Arbeitsgemeinschaften fest, dass die Zugabe von Iloprost in ischämischen Geweben zu einer Reduktion der Caspasen 3, 8 und 9, welche in apoptotische Signalwege eingebunden sind, führt (16). Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass Iloprost protektiv auf Endothelzellen wirkt und vor einer endothelialen Dysfunktion schützt, wird des Weiteren durch die Beobachtungen von Zoukourian et al. unterstützt. In deren Studie wurde der Einfluss diabetischer Erythrozyten auf das Endothel isoliert und nach simultaner Applikation von Iloprost untersucht. Im Einklang mit unseren Resultaten stabilisierte Iloprost die Permeabilität des endothelialen Monolayers. Zusätzlich dazu konnten weitere endothelzellprotektive Wirkungen durch Iloprost verzeichnet werden. Einerseits wurde der Anstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-6 abgeschwächt, andererseits wurde nach Iloprostsubstitution weniger oxidativer Stress generiert (179).

Die erhobenen Daten illustrieren, dass Iloprost in Endothelzellen zu einer verminderten Permeabilität führt und somit einen protektiven Effekt auf Endothelzellen ausübt. Folglich wird so die Ausübung endothelzellspezifischer Funktionen, wie die Ausbildung einer Grenzschicht, welche für Pathogene und toxische Agenzien nicht passierbar ist, gewährleistet. Darüber hinaus ist Iloprost in der Lage, die Zigarettenrauch-induzierten Auswirkungen auf Endothelzellen abzuschwächen. Auch bei simultaner Zigarettenrauchexposition wird einer erhöhten Permeabilität entgegengewirkt und vor dem Zelltod geschützt, wodurch das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion verhindert wird.

5 Fazit und Ausblick

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit primärer Zellen und einem damit verbundenen hohen Kostenfaktor wurde in der vorliegenden Studie die immortalisierte Zelllinie CI HPMEC ARLT etabliert. Die Charakterisierung ergab, dass es sich um eine wachstumskontrollierte Zelllinie mit endothelzellspezifischen Eigenschaften handelt. Sie weist die typische Endothelzellmorphologie auf und exprimiert analog zu primären Zellen die Gene und Proteine, die für Endothelzellen charakteristisch sind. Zudem erfüllt sie funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen wie beispielsweise die Ausbildung einer Barrierefunktion zum Schutz vor toxischen Agenzien. Die genannten Aspekte zeigen auf, dass es sich bei der immortalisierten Zelllinie CI HPMEC ARLT um ein geeignetes Endothelzellmodell handelt. Darüber hinaus können CI HPMEC ARLT auch als Drug Screening Modell fungieren. CI HPMEC ARLT wurden daher in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss von Zigarettenrauch und Holzrauch sowie die simultane Hinzugabe von Iloprost auf Endothelzellen und inflammatorische Zellen zu untersuchen. Die erhobenen Daten zeigen, dass Zigarettenrauch und Holzrauch ähnliche zelluläre Wirkungen ausüben. Beiden gemeinsam ist, dass sie zu einer vermehrten Expression inflammatorischer Gene führen und somit Entzündungsvorgänge induzieren. Des Weiteren sind beide Stoffe an der Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion mitbeteiligt. Nach Exposition mit Zigarettenrauch konnten eine vermehrte Permeabilität sowie erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen werden. Zudem wird die Expression verschiedener Enzyme und Prostaglandine im Eicosanoidstoffwechsel durch die Stimulation mit Rauchgasextrakten verändert. Von maßgebender Bedeutung ist eine hervorgerufene Reduktion des Prostacyclinsynthesegens. Resultieren kann ein Prostacyclinmangel, welcher eine verminderte Vasodilatation zur Folge hat und so das Auftreten einer Funktionsstörung im Endothel begünstigt. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass der Signalweg der Eicosanoide demzufolge einen Schlüsselprozess in der endothelialen Dysfunktion einnehmen könnte. Iloprost, ein Prostacyclinanalogon schwächte in den durchgeführten Experimenten die Wirkung von Zigarettenrauch ab. Folglich scheint Iloprost die Endothelfunktionen zu stabilisieren und einer endothelialen Dysfunktion entgegenzuwirken.

Da es sich um in vitro Analysen handelt, sind weitere Experimente, insbesondere in vivo Untersuchungen notwendig, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus zu ermöglichen. Dennoch liefern die erhobenen Daten einen

erweiterten Einblick in die zellulären Auswirkungen von Rauchgasextrakt und die therapeutische Wirkung von Iloprost. Als brauchbares Drug Screening Modell könnten CI HPMEC ARLT künftig auch in weiteren Studien genutzt werden, um die Auswirkungen anderer Schadstoffe oder Medikamente zu beurteilen.

6 Zusammenfassung

Zahlreichen kardiovaskulären und respiratorischen Erkrankungen liegt vermutlich eine gestörte Endothelfunktion zugrunde, die durch endogene und exogene Faktoren begünstigt werden kann. Aktuellen Studien zufolge scheint die Exposition mit Rauchgasextrakten die Krankheitsentstehung sowie -progression zu fördern. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Auswirkungen von Zigarettenrauch und Holzrauch auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Zudem wurde der simultane Einfluss des Prostacyclinanalogons Iloprost auf Endothelzellen eruiert. Im Rahmen der Studie wurde die immortalisierte Zelllinie CI HPMEC ARLT etabliert. Die Zellmodellcharakterisierung ergab, dass es sich um eine wachstumskontrollierte Zelllinie mit endothelzellspezifischen Eigenschaften handelt. Sie besitzt einerseits die typische Zellmorphologie, weist andererseits in der qRT-PCR und Durchflusszytometrie analog zu primären Zellen kennzeichnende Gene und Proteine sowie funktionelle Charakteristika endothelialer Zellen auf. Folglich fungieren CI HPMEC ARLT als geeignetes Endothelzellmodell. Die erhobenen Daten zeigen, dass Zigarettenrauch und Holzrauch ähnliche zelluläre Wirkungen ausüben. Sie führen zu einer vermehrten Expression inflammatorischer Gene und induzieren somit Entzündungsvorgänge. Des Weiteren sind beide Stoffe an der Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion mitbeteiligt. Nach Exposition mit Zigarettenrauch konnten eine vermehrte Permeabilität sowie erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen werden. Zudem wurde die Expression verschiedener Enzyme und Prostaglandine im Eicosanoid-Signalweg durch die Stimulation mit Rauchgasextrakten verändert. Von maßgebender Bedeutung ist eine hervorgerufene Reduktion des Prostacyclinsynthasegens, welche eine verminderte Vasodilatation zur Folge haben kann und deshalb das Auftreten einer Funktionsstörung im Endothel prädestiniert. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass der Signalweg der Eicosanoide folglich einen Schlüsselprozess in der endothelialen Dysfunktion einnehmen könnte. Iloprost schwächte in den durchgeführten Experimenten die Wirkung von Zigarettenrauch ab. Demgemäß scheint Iloprost die Endothelfunktionen zu stabilisieren und einer endothelialen Dysfunktion entgegenzuwirken. Die Daten der Studie liefern einen erweiterten Einblick in die zellulären Auswirkungen von Rauchgasextrakt und die therapeutische Wirkung von Iloprost. Als brauchbares Drug Screening Modell könnten CI HPMEC ARLT künftig auch in weiteren Studien genutzt werden, um die Auswirkungen anderer Schadstoffe oder Medikamente zu beurteilen.

7 Summary

Many cardiovascular and respiratory diseases supposedly underlie an impaired function of endothelium that can be promoted by endogenous and exogenous factors. According to current studies exposition to smoke can cause disease development and aggravate existing illness. The aim of this study was to investigate the cellular impact of cigarette smoke and wood smoke. Furthermore iloprost, a prostacyclin analogue was given simultaneously to endothelial cells to explore its effect. As part of this study an immortalized cell line called CI HPMEC ARLT has been established. Cell line characterization revealed that the cell line is growth controlled and owns endothelial cell specific properties. Actually, immortalized cells show typical morphologies of endothelial cells and in qRT-PCR and flow cytometry genes and proteins are expressed in the same way as primary cells do. Furthermore, they exhibit endothelial-specific functions. Therefore, CI HPMEC ARLT can be used as an endothelial cell model. Our data show that cigarette smoke and wood smoke have similar cellular effects. Both of them led to an increase of inflammatory markers which indicates an induction of inflammatory processes in case of exposition to smoke. Moreover, they are involved in development and progression of endothelial dysfunction. In fact, after stimulation with cigarette smoke increased permeability and increasement of apoptosis rate was measured. Incubation with cigarette smoke and wood smoke caused changed expressions of enzymes and prostaglandins enlisted in eicosanoid pathway. Of interest a reduction of prostacyclin synthase gene was recognized which can cause limited vasodilatation and consequently supports impaired endothelial function. Our results illustrate that imbalance in eicosanoid expression may be relevant in development of endothelial dysfunction. When iloprost was given to endothelial cells simultaneously, adverse effects of cigarette smoke were attenuated. Accordingly, iloprost seems to stabilize endothelial functions and counteracts functional disorder. The data of this study give further insights of the cellular impact of smoke and the therapeutical effect of iloprost. As a useful drug screening model CI HPMEC ARLT could be used in the future to observe impact of other pollutants or drugs.

8 Abkürzungsverzeichnis

±	plus/minus
>	größer
<	kleiner
≤	kleiner oder gleich
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
5-HPETE	5-Hydroxyperoxyarachidonsäure
ACTB	β-Actin
Apaf-1	Apoptotic Protease-activating Factor 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAD Protein	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bax Protein	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Unterscheidungsgruppen/cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI HPMEC ARLT + Dox	immortalisierte primäre mikrovaskuläre Endothelzellen mit Doxycyclin
CI HPMEC ARLT – Dox	immortalisierte primäre mikrovaskuläre Endothelzellen ohne Doxycyclin
cm	Zentimeter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSE	Zigarettenrauchgasextrakt
CT-Wert	Zyklus-Schwelle
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
dsDNA	doppelsträngige DNA

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Epoxyeicosatriensäure
ELAM-1	Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1
ERS	European Respiratory Society
ESC	European Society of Cardiology
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-Associating Death Domain-Containing Protein
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat-konjugiert
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM	Wachstumsmedium
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen/Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/Stunden
H ₂ O	Wasser
HETE	Hydroxyeicosatriensäure
HPMEC	Humane primäre mikrovaskuläre Endothelzellen
hTert	Humane Telomerase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density Lipoproteine
LVEF	linksventrikuläre Auswurfraction
M	Mol
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
min	Minuten
Mio	Millionen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl der Experimente
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCH	Pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PGH2	Prostaglandin H2
PGI2	Prostacyclin
PH	pulmonale Hypertonie
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
pSIVA	Polarity-Sensitive Indicator of Viability & Apoptosis
PTGIS	Prostacyclinsynthase
PTGS1/COX-1	Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 1/Cyclooxygenase-1
PTGS2/COX-2	Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2/Cyclooxygenase-2
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RA	Rezeptorantagonist
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
S.	Seite
SV40TAg	SV40T-Antigen
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta

Tie	Tyrosinkinase mit Immunglobulin-ähnlichen und EGF-ähnlichen Domänen
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
tPA	Gewebsplasminogenaktivator
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth Factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WSE	Holzrauchgasextrakt

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsaufbau WSE-Generierung	31
Abbildung 2: Versuchsaufbau CSE-Generierung	32
Abbildung 3: Wachstumskontrolle der CI HPMEC ARLT	44
Abbildung 4: Phänotypische Eigenschaften der CI HPMEC ARLT	48
Abbildung 5: Funktionelle Charakteristika der CI HPMEC ARLT und HPMEC	50
Abbildung 6: Expression von TNF-Alpha und IL-6 in murinen Makrophagen	52
Abbildung 7: Messung der Permeabilität nach Zigarettenrauchexposition	53
Abbildung 8: Sterberate der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Zigarettenrauchexposition	56
Abbildung 9: Eicosanoid-Expression der CI HPMEC ARLT und HPMEC nach Zigarettenrauchstimulation.....	59
Abbildung 10: Expression von TNF-Alpha und IL-6 in murinen Makrophagen	61
Abbildung 11: Eicosanoid-Expression der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Holzrauchexposition.....	64
Abbildung 12: Messung der Permeabilität nach Zigarettenrauchexposition und Hinzugabe von Iloprost	66
Abbildung 13: Apoptoserate der HPMEC und CI HPMEC ARLT nach Zigarettenrauchexposition und Iloprostgabe	68

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach (147))	17
Tabelle 2: Auflistung generelle Labormaterialien	23
Tabelle 3: Auflistung Reagenzien	24
Tabelle 4: Auflistung Kits und enthaltene gebrauchsfertige Reagenzien	24
Tabelle 5: Auflistung Antikörper Durchflusszytometrie	25
Tabelle 6: Auflistung Primer und Primersequenzen qRT-PCR	26
Tabelle 7: Auflistung Medien und Zusätze für Zellkultur	27
Tabelle 8: Zusammensetzung Supplement-Mix Endothelial Cell Growth Medium MV27	
Tabelle 9: Zusammensetzung des Ansatzes zum Splitten der Makrophagen	28
Tabelle 10: Auflistung sonstige Materialien	28
Tabelle 11: Auflistung Geräte	29
Tabelle 12: Auflistung Software	30
Tabelle 13: Formel zur Zellzahlbestimmung	34
Tabelle 14: Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsgemisches	37
Tabelle 15: Zusammensetzung des qRT-PCR-Reaktionsgemisches	38
Tabelle 16: qRT-PCR-Programm.....	38
Tabelle 17: Livak-Methode.....	39

11 Literaturverzeichnis

1. Abdelghany TM, Ismail RS, Mansoor FA, Zweier JR, Lowe F, Zweier JL. Cigarette smoke constituents cause endothelial nitric oxide synthase dysfunction and uncoupling due to depletion of tetrahydrobiopterin with degradation of GTP cyclohydrolase. *Nitric Oxide*. 2018;76:113–21.
2. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal*. 2016 Dec 1;10(4):347–54.
3. Adetona O, Reinhardt TE, Domitrovich J, Broyles G, Adetona AM, Kleinman MT, et al. Review of the health effects of wildland fire smoke on wildland firefighters and the public. *Inhal Toxicol*. 2016 Feb 23;28(3):95–139.
4. Al-Qaisi M. Measurement of endothelial function and its clinical utility for cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag*. 2008 Jun;Volume 4:647–52.
5. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
6. Barbieri SS, Zacchi E, Amadio P, Gianellini S, Mussoni L, Weksler BB, et al. Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2011 Jun 1;90(3):475–83.
7. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1996 Feb 1;334(5):296–301.
8. Barst RJ, Gibbs JSR, Ghofrani HA, Hoepfer MM, McLaughlin V v, Rubin LJ, et al. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S78–84.
9. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Aug;34(8):1731–8.

10. Bernhard D, Csordas A, Henderson B, Rossmann A, Kind M, Wick G. Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules. *FASEB J*. 2005 Jul;19(9):1096–107.
11. Bevilacqua MP. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules. *Annu Rev Immunol*. 1993 Apr;11(1):767–804.
12. Birukova AA, Wu T, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Tian X, et al. Iloprost improves endothelial barrier function in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Eur Respir J*. 2013 Jan;41(1):165–76.
13. Blebea J, Cambria RA, DeFouw D, Feinberg RN, Hobson RW, Duran WN. Iloprost attenuates the increased permeability in skeletal muscle after ischemia and reperfusion. *J Vasc Surg*. 1990 Dec;12(6):657–65; discussion 665-6.
14. Bølling AK, Totlandsdal AI, Sallsten G, Braun A, Westerholm R, Bergvall C, et al. Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2012;9(1):45.
15. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168–75.
16. Canacankatan N, Sucu N, Aytacoglu B, Gul OE, Gorur A, Korkmaz B, et al. Affirmative effects of iloprost on apoptosis during ischemia-reperfusion injury in kidney as a distant organ. *Ren Fail*. 2012;34(1):111–8.
17. Cao S, Yang C, Gan Y, Lu Z. The Health Effects of Passive Smoking: An Overview of Systematic Reviews Based on Observational Epidemiological Evidence. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139907.
18. Capdevila J, Marnett LJ, Chacos N, Prough RA, Estabrook RW. Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyicosatetraenoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982 Feb;79(3):767–70.

19. Caravedo MA, Herrera PM, Mongilardi N, de Ferrari A, Davila-Roman VG, Gilman RH, et al. Chronic exposure to biomass fuel smoke and markers of endothelial inflammation. *Indoor Air* [Internet]. 2015/10/18. 2016;26(5):768–75.
20. Cascio WE. Wildland fire smoke and human health. *Science of The Total Environment*. 2018 May;624:586–95.
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993 Nov;88(5 Pt 1):2149–55.
22. Chang KH, Park JM, Lee CH, Kim B, Choi KC, Choi SJ, et al. NADPH oxidase (NOX) 1 mediates cigarette smoke-induced superoxide generation in rat vascular smooth muscle cells. *Toxicol In Vitro*. 2017 Feb;38:49–58.
23. Chazova I, Loyd JE, Zhdanov VS, Newman JH, Belenkov Y, Meyrick B. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1995 Feb;146(2):389–97.
24. Chen HW, Lii CK, Ku HJ, Wang TS. Cigarette smoke extract induces expression of cell adhesion molecules in HUVEC via actin filament reorganization. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Mar;50(2):96–104.
25. Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med*. 2021 Apr;27(4):314–31.
26. Collen D. Molecular mechanism of action of newer thrombolytic agents. *J Am Coll Cardiol*. 1987 Nov;10(5):11B-15B.
27. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):411–9.

28. Cryer B. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal toxicity. *Curr Opin Gastroenterol*. 2001 Nov;17(6):503–12.
29. D’Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991 Sep 1;115(5):343–9.
30. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. Vol. 5, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004. p. 261–70.
31. Delgado J, Martinez LM, Sánchez TT, Ramirez A, Iturria C, González-Avila G. Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure. *Chest* [Internet]. 2005 Jul;128(1):124–31.
32. Department of Health U, Services H. The Health Consequences of Smoking - 50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General [Internet]. 2014.
33. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years’ observations on male British doctors. *BMJ*. 1994 Oct 8;309(6959):901–11.
34. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-Like Protein Regulates Programmed Cell Death Downstream of Bcl-x_L and Cytochrome *c*. *Mol Cell Biol*. 1998 Jan;18(1):608–15.
35. Egawa G, Nakamizo S, Natsuaki Y, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Sci Rep*. 2013;3:1932.
36. El-Mahdy MA, Abdelghany TM, Hemann C, Ewees MG, Mahgoup EM, Eid MS, et al. Chronic cigarette smoke exposure triggers a vicious cycle of leukocyte and endothelial-mediated oxidant stress that results in vascular dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2020 Jul 1;319(1):H51–65.
37. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes [Internet]. 1998.

38. Fagerholm SC, Guenther C, Llorca Asens M, Savinko T, Uotila LM. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. *Front Immunol*. 2019 Feb 19;10.
39. Falfán-Valencia R, Ramírez-Venegas A, Pérez Lara-Albisua JL, Ramírez-Rodríguez SL, Márquez-García JE, Buendía-Roldan I, et al. Smoke exposure from chronic biomass burning induces distinct accumulative systemic inflammatory cytokine alterations compared to tobacco smoking in healthy women. *Cytokine* [Internet]. 2020;131(February):155089.
40. Ferrer E, Peinado VI, Díez M, Carrasco JL, Musri MM, Martínez A, et al. Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. *Respir Res*. 2009 Aug 14;10:76.
41. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2006 Apr;16(3):222–33.
42. Fink AN, Frishman WH, Azizad M, Agarwal Y. Use of prostacyclin and its analogues in the treatment of cardiovascular disease. *Heart Dis* [Internet]. 1999;1(1):29–40.
43. Fitch MN, Phillippi D, Zhang Y, Lucero JA, Pandey RS, Liu J, et al. Effects of inhaled air pollution on markers of integrity, inflammation, and microbiota profiles of the intestines in Apolipoprotein E knockout mice. *Environ Res*. 2020;181(July).
44. Forchhammer L, Loft S, Roursgaard M, Cao Y, Riddervold IS, Sigsgaard T, et al. Expression of adhesion molecules, monocyte interactions and oxidative stress in human endothelial cells exposed to wood smoke and diesel exhaust particulate matter. *Toxicol Lett* [Internet]. 2012;209(2):121–8.
45. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015 Dec;386(10010):2287–323.

46. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010 May 21;459(6):923–39.
47. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy.* 2005 Jun 1;4(3):281–6.
48. Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 1998 Aug 29;352(9129):719–25.
49. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 2009 Oct;30(20):2493–537.
50. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 2016 Jan 1;37(1):67–119.
51. Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 1;61(2):227–37.
52. Giannini D, Leone A, Di Bisceglie D, Nuti M, Strata G, Buttitta F, et al. The effects of acute passive smoke exposure on endothelium-dependent brachial artery dilation in healthy individuals. *Angiology [Internet].* 2007;58(2):211–7.
53. Gomberg-Maitland M, Olschewski H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal.* 2008 Apr 1;31(4):891–901.
54. Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Dec 1;7(12):a006080.

55. Green S, Stuart D. Oxygen and pulmonary arterial hypertension: effects, mechanisms, and therapeutic benefits. *Eur J Prev Cardiol.* 2021;28(1):127–36.
56. Grünig E, Benjamin N, Krüger U, Kaemmerer H, Harutyunova S, Olsson KM, et al. General measures and supportive therapy for pulmonary arterial hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018. *Int J Cardiol.* 2018 Dec 1;272S:30–6.
57. Grünwald J, Haudenschild CC. Intimal injury in vivo activates vascular smooth muscle cell migration and explant outgrowth in vitro. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* 1984 May;4(3):183–8.
58. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 2015 Nov;278(5):483–93.
59. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *Journal of Clinical Investigation.* 1997 Nov 1;100(9):2153–7.
60. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;44(2):532–53.
61. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *The Lancet.* 2014 May;383(9932):1933–43.
62. Hoeper MM, Ghofrani HA, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(5):73–84.
63. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med.* 2016;4(4):306–22.
64. Hoffmann DHI. THE CHANGING CIGARETTE, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health.* 1997 Mar;50(4):307–64.
65. Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, Dictor M, Steiniche T, et al. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer.* 2008 May 1;122(9):2154–9.

66. Horinouchi T, Mazaki Y, Terada K, Miwa S. Cigarette Smoke Extract and Its Cytotoxic Factor Acrolein Inhibit Nitric Oxide Production in Human Vascular Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull.* 2020 Nov 1;43(11):1804–9.
67. Hörl WH. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. *Pharmaceuticals.* 2010 Jul 21;3(7):2291–321.
68. Humbert M, Ghofrani HA. The molecular targets of approved treatments for pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* 2016 Jan;71(1):73–83.
69. Humbert M, Montani D, Evgenov O V, Simonneau G. Definition and classification of pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol.* 2013;218:3–29.
70. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun;43(12):S13–24.
71. Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1983 Nov;128(5):833–8.
72. Husari A, Shihadeh A, Talih S, Hashem Y, El Sabban M, Zaatari G. Acute Exposure to Electronic and Combustible Cigarette Aerosols: Effects in an Animal Model and in Human Alveolar Cells. *Nicotine Tob Res.* 2016 May;18(5):613–9.
73. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 1987 Mar;18(3):234–9.
74. Jan R, Chaudhry G e S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019 Jun 1;9(2):205–18.
75. Keusch S, Hildenbrand FF, Bollmann T, Halank M, Held M, Kaiser R, et al. Tobacco Smoke Exposure in Pulmonary Arterial and Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Respiration.* 2014;88(1):38–45.
76. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology.* 2016 Jul 9;37(7):8471–86.
77. Kirkby NS, Chan M V., Zaiss AK, Garcia-Vaz E, Jiao J, Berglund LM, et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and

- NFAT transcriptional pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Jan 12;113(2):434–9.
78. Kirkby NS, Lundberg MH, Harrington LS, Leadbeater PDM, Milne GL, Potter CMF, et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Oct 23;109(43):17597–602.
79. Konradt C, Hunter CA. Pathogen interactions with endothelial cells and the induction of innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*. 2018 Oct;48(10):1607–20.
80. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. In 2016. p. 511–40.
81. Koyama S, Rennard SI, Leikauf GD, Robbins RA. Bronchial epithelial cells release monocyte chemotactic activity in response to smoke and endotoxin. *The Journal of Immunology*. 1991 Aug 1;147(3):972–9.
82. Krause W, Kraus T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986;30(1):61–8.
83. Kurakula K, Smolders VFED, Tura-Ceide O, Jukema JW, Quax PHA, Goumans MJ. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension: Cause or Consequence? *Biomedicines*. 2021 Jan 9;9(1).
84. Lammers AE, Apitz C, Zartner P, Hager A, Dubowy KO, Hansmann G. Diagnostics, monitoring and outpatient care in children with suspected pulmonary hypertension/paediatric pulmonary hypertensive vascular disease. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of paediatric pulmonary hypertension. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart*. 2016 May;102 Suppl 2:ii1-13.
85. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte - endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med*. 2009 Jul;13(7):1211–20.

86. Laumbach RJ, Kipen HM. Respiratory health effects of air pollution: Update on biomass smoke and traffic pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012 Jan;129(1):3–11.
87. Lavi S, Prasad A, Yang EH, Mathew V, Simari RD, Rihal CS, et al. Smoking is associated with epicardial coronary endothelial dysfunction and elevated white blood cell count in patients with chest pain and early coronary artery disease. *Circulation*. 2007 May 22;115(20):2621–7.
88. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Stamatelopoulos K, Voutsas A, Stamatelopoulos S. Effects of acute cigarette smoking on endothelium-dependent arterial dilatation in normal subjects. *Am J Cardiol*. 1998 May 15;81(10):1225–8.
89. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III12-19.
90. Li JH, Zhang HD, Wang ZZ, Lu QQ, Li D, Lian TY, et al. Acute Iloprost Inhalation Improves Right Ventricle Function in Pulmonary Artery Hypertension: A Cardiac Magnetic Resonance Study. *Front Pharmacol*. 2018;9:1550.
91. Li J, Fu X, Yang R, Zhang W. Atherosclerosis Vascular Endothelial Secretion Dysfunction and Smooth Muscle Cell Proliferation. *J Healthc Eng*. 2022 Mar 9;2022:1–13.
92. Liu PL, Chen YL, Chen YH, Lin SJ, Kou YR. Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: Role of AIF and EndoG. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5 33-5).
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
94. van Loon RLE, Roofthoof MTR, van Osch-Gevers M, Delhaas T, Strengers JLM, Blom NA, et al. Clinical characterization of pediatric pulmonary hypertension: complex presentation and diagnosis. *J Pediatr*. 2009 Aug;155(2):176-82.e1.

95. Lu Y, Yang Y, Xiao L, Li S, Liao X, Liu H. Autocrine and Paracrine Effects of Vascular Endothelial Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6695663.
96. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF. An evolving new paradigm: Endothelial cells - Conditional innate immune cells. Vol. 6, *Journal of Hematology and Oncology.* 2013.
97. Majed BH, Khalil RA. Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul;64(3):540–82.
98. Malerba M, Nardin M, Radaeli A, Montuschi P, Carpagnano GE, Clini E. The potential role of endothelial dysfunction and platelet activation in the development of thrombotic risk in COPD patients. *Expert Rev Hematol.* 2017 Sep 2;10(9):821–32.
99. Mandegar M, Fung YCB, Huang W, Remillard C V, Rubin LJ, Yuan JXJ. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* 2004 Sep;68(2):75–103.
100. Mandras SA, Mehta HS, Vaidya A. Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2020;95(9):1978–88.
101. Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KMA, Baglole CJ, Phipps RP, et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E₂ synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2004 Nov;287(5):L981–91.
102. Martin SA, Brash AR, Murphy RC. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J Lipid Res.* 2016 Jul;57(7):1126–32.
103. Masaki T, Sawamura T. Endothelin and endothelial dysfunction. Vol. 82, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences.* 2006. p. 17–24.

104. May T, Butueva M, Bantner S, Markusic D, Seppen J, MacLeod RAF, et al. Synthetic gene regulation circuits for control of cell expansion. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2010 Feb 1;16(2):441–52.
105. McCarthy CE, Duffney PF, Wyatt JD, Thatcher TH, Phipps RP, Sime PJ. Comparison of in vitro toxicological effects of biomass smoke from different sources of animal dung. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2017/06/03. 2017;43:76–86.
106. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*. 1981 May;57(5):946–55.
107. Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, Winter B, Eichmair E, Gebetsberger J, et al. Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell Death Dis*. 2012 Nov 15;3:e424.
108. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 2008 Jan 1;93(1):141–7.
109. Mombouli J v, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Jan;31(1):61–74.
110. Moreau KL, Hildreth KL, Meditz AL, Deane KD, Kohrt WM. Endothelial Function Is Impaired across the Stages of the Menopause Transition in Healthy Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Dec 1;97(12):4692–700.
111. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*. 2013 Jan;50(1):7–22.
112. Nana-Sinkam SP, Lee JD, Sotto-Santiago S, Stearman RS, Keith RL, Choudhury Q, et al. Prostacyclin prevents pulmonary endothelial cell apoptosis induced by cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Apr 1;175(7):676–85.

113. Nandakishore R, Yalavarthi P, Kiran Y, Rajapranathi M. Selective Cyclooxygenase Inhibitors: Current Status. *Curr Drug Discov Technol*. 2014 May 31;11(2):127–32.
114. Neuman MG, Katz GG, Malkiewicz IM, Mathurin P, Tsukamoto H, Adachi M, et al. Conference article. *Alcohol*. 2002 Oct;28(2):117–28.
115. Noll T, Wozniak G, Mccarson K, Hajimohammad A, Metzner HJ, Inserte J, et al. Effect of Factor XIII on Endothelial Barrier Function [Internet]. Vol. 189, *J. Exp. Med*. 1999.
116. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*. 2014 Nov;41(5):694–707.
117. Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med*. 1996 May 1;124(9):820–4.
118. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2002 Aug 1;347(5):322–9.
119. O’Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*. 1993 Sep 13;330(2):157–60.
120. Organization WHealth. *Global Health Risks : Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*. World Health Organization; 2009. 70 p.
121. Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, et al. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007 Jan;292(1):H130–9.
122. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation*. 1989 Nov;80(5):1198–206.

123. Pirro M, Bagaglia F, Paoletti L, Razzi R, Mannarino MR. Review: Hypercholesterolemia-associated endothelial progenitor cell dysfunction. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008 Oct 18;2(5):329–39.
124. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057–69.
125. Reinders JH, Brinkman HJ, van Mourik JA, de Groot PG. Cigarette smoke impairs endothelial cell prostacyclin production. *Arteriosclerosis*. 1986;6(1):15–23.
126. Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner D, et al. The Short-term Effects of Digoxin in Patients With Right Ventricular Dysfunction From Pulmonary Hypertension. *Chest*. 1998 Sep;114(3):787–92.
127. Risau W. Development and differentiation of endothelium. In: *Kidney International, Supplement*. Nature Publishing Group; 1998.
128. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999 Jan 14;340(2):115–26.
129. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell. *Science* (1979). 1973 Jun 29;180(4093):1332–9.
130. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:816460.
131. Rubenstein DA, Yin W. Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2018. p. 1117–56.
132. Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1997 Jan 9;336(2):111–7.
133. Russwurm M, Russwurm C, Koesling D, Mergia E. NO/cGMP: the past, the present, and the future. *Methods Mol Biol*. 2013;1020:1–16.
134. Safdar Z. Treatment of pulmonary arterial hypertension: The role of prostacyclin and prostaglandin analogs. *Respir Med*. 2011 Jun;105(6):818–27.

135. Sakhatskyy P, Gabino Miranda GA, Newton J, Lee CG, Choudhary G, Vang A, et al. Cigarette smoke-induced lung endothelial apoptosis and emphysema are associated with impairment of FAK and eIF2 α . *Microvasc Res*. 2014 Jul;94:80–9.
136. Samuelsson B. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. *Harvey Lect [Internet]*. 1979;75:1–40.
137. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*. 1999 May;24(3):189–95.
138. Schermuly RT, Schulz A, Ghofrani HA, Meidow A, Rose F, Roehl A, et al. Pharmacokinetics and metabolism of infused versus inhaled iloprost in isolated rabbit lungs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Nov;303(2):741–5.
139. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*. 2011 Jun 21;34(6):665–73.
140. Scott AF, Reilly CA. Wood and Biomass Smoke: Addressing Human Health Risks and Exposures. *Chem Res Toxicol [Internet]*. 2019/02/06. 2019;32(2):219–21.
141. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol*. 2015 Nov;25(11):639–50.
142. Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 2):H1624-33.
143. Sherman CB. Health effects of cigarette smoking. *Clin Chest Med*. 1991 Dec;12(4):643–58.
144. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*. 2017 May;9(5):434–49.
145. Shoji S, Ertl RF, Koyama S, Robbins R, Leikauf G, Von Essen S, et al. Cigarette Smoke Stimulates Release of Neutrophil Chemotactic Activity from Cultured Bovine Bronchial Epithelial Cells. *Clin Sci*. 1995 Mar 1;88(3):337–44.
146. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004 Sep;56(3):387–437.

147. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53(1).
148. Sluiter TJ, van Buul JD, Huveneers S, Quax PHA, de Vries MR. Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021 Mar 24;9(4):328.
149. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Oct 27;95(22):13313–8.
150. Strange JW, Wharton J, Phillips PG, Wilkins MR. Recent insights into the pathogenesis and therapeutics of pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Mar;102(3):253–68.
151. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep [Internet]*. 2007;59(3):247–58.
152. Tallima H. Clarification of Arachidonic Acid Metabolic Pathway Intricacies. *ACS Omega*. 2021 Jun 22;6(24):15559–63.
153. Tanaka N, Sato T, Fujita H, Morita I. Constitutive Expression and Involvement of Cyclooxygenase-2 in Human Megakaryocytopoiesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Mar;24(3):607–12.
154. Thenappan T, Chan SY, Weir EK. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(5):H1322–31.
155. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis C, et al. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*. 2021 Jul 6;9(7).
156. Toda N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther*. 2012 Feb;133(2):159–76.

157. Toledo RT. Wood smoke components and functional properties. In: International Smoked Seafood Conference Proceedings. Alaska Sea Grant, University of Alaska Fairbanks; 2008. p. 55–61.
158. Tomić M, Micov A, Pecikoza U, Stepanović-Petrović R. Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Potential Benefits of NSAIDs Modified-Release Preparations. In: *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Elsevier; 2017. p. 1–29.
159. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Jan;10(1):4–18.
160. Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2018 Mar 15;114(4):529–39.
161. Tudor RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):643–9.
162. Tudor, Wood, Taraseviciene, Flores, Voekel. Cigarette smoke extract decreases the expression of vascular endothelial growth factor by cultured cells and triggers apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 1):241S–2S.
163. Unosson J, Blomberg A, Sandström T, Muala A, Boman C, Nyström R, et al. Exposure to wood smoke increases arterial stiffness and decreases heart rate variability in humans. *Part Fibre Toxicol*. 2013 Jun 6;10:20.
164. Vane J, Corin RE. Prostacyclin: A Vascular Mediator. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2003 Dec;26(6):571–8.
165. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Mar 15;91(6):2046–50.

166. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(1):22–96.
167. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res*. 2020 Feb 26;9:148.
168. Wilkins MR. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *European Respiratory Review*. 2012 Mar 1;21(123):19–26.
169. Witten ML, Quan SF, Sobonya RE, Bruck D, Devine L, Lemen RJ. Acute cigarette smoke exposure alters lung eicosanoid and inflammatory cell concentrations in rabbits. *Exp Lung Res*. 1988;14(6):727–42.
170. Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *J Appl Physiol (1985)*. 2006 Feb;100(2):672–8.
171. Wright JL, Tai H, Churg A. Cigarette smoke induces persisting increases of vasoactive mediators in pulmonary arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Nov;31(5):501–9.
172. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019 Jan 31;39(1).
173. Yue J, Zhang K, Chen J. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer Microenviron*. 2012 Dec;5(3):275–83.
174. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jun;877:173090.
175. Zeglinski MR, Turner CT, Zeng R, Schwartz C, Santacruz S, Pawluk MA, et al. Soluble Wood Smoke Extract Promotes Barrier Dysfunction in Alveolar Epithelial Cells through a MAPK Signaling Pathway. *Sci Rep [Internet]*. 2019/07/13. 2019;9(1):10027.
176. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*. 2006 Aug;48(2):278–85.

177. Zhou K, Parker JD. The role of vascular endothelium in nitroglycerin-mediated vasodilation. *Br J Clin Pharmacol*. 2019 Feb 1;85(2):377–84.
178. Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N, Darley-USmar VM. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans*. 2005 Dec 1;33(6):1385.
179. Zoukourian C, Wautier MP, Chappey O, Dosquet C, Rohban T, Schmidt AM, et al. Endothelial cell dysfunction secondary to the adhesion of diabetic erythrocytes. Modulation by iloprost. *Int Angiol*. 1996 Sep;15(3):195–200.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Christian Troidl für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas sowie die umfassende Unterstützung und Begleitung während meiner Forschungsarbeiten.

Ein großes Dankeschön richte ich an Herrn Dr. Christoph Lipps, der mir als Betreuer stets zur Seite stand und mir zahlreiche Denkanstöße zur Planung und Durchführung meiner Experimente gab.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeiter*innen der experimentellen Kardiologie in Gießen für die Unterstützung und die sehr angenehme Atmosphäre im Büro und im Labor bedanken. Henrike Thomas und Daniela Reitz gilt ein besonderes Dankeschön für die Einarbeitung in die Zellkultur. Ebenso bedanke ich mich bei Antje Weber und Behnoush Parviz für das Vertrautmachen mit RNA-Isolation, cDNA-Synthese und der Durchführung der PCR. Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Sabine Schäfer, Steffanie Wolfram und Julia Paul, die mir bei Fragen jeglicher Art stets weitergeholfen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ohne eure Hilfsbereitschaft, aufmunternden Worte und Ratschläge wäre die Durchführung meiner Doktorarbeit sehr viel schwieriger gewesen.

Als letztes möchte ich vor allem meiner Familie und meinem engen Freundeskreis danken für die Zuversicht und mentale Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Bruder Marcel, die meine Entscheidungen stets respektieren und mir in jeglichen Lebenssituationen tatkräftig zur Seite stehen. Danke für eure aufmunternden Worte und, dass ihr mir meinen bisherigen Weg so ermöglicht habt!