Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Der Einfluss inflammatorischer Mediatoren des Metabolischen Syndroms auf die Regulation des Hyaluronsäure-Systems an humanen, glatten Gefäßmuskelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martina Rosen

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Kongressbeiträge und Veröffentlichungen

Rosen M; Roeck K; Fischer J.W. (2009): Insulin like growth factor and tumor necrosis factor alpha induce hyaluronan synthesis in human vascular smooth muscle cells. Naunyn-Schmiedeberg`s Archives of Pharmacology. 379, 57.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG 7
	1.1.Extrazelluläre Matrix 7
	1.2. Hyaluronsäure, Hyaluronsäuresynthasen und Hyaluronidasen. 7
	 1.3. Atherosklerose und proatherosklerotische Wirkungen von Hyaluronsäure
	1.4.Metabolisches Syndrom und Diabetes Mellitus
	1.5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit
2.	MATERIAL UND METHODEN18
	2.1.Materialien 18 2.1.1. Substanzen 18 2.1.2. Chemikalien und Kits 18 2.1.3. Zellkultur 19 2.1.4. Puffer und Lösungen 19 2.1.5. Antikörper 20
	2.2. Geräte und Materialien20
	2.3.Zellkultur21 2.3.1. Kultivierung21

2.4. Bestimmung der mRNA-Expression von Hyaluronsäure-	
Synthasen 1-3	22
2.4.1. Präparation (RNA-Isolierung)	22
2.4.2. RNA-Quantifizierung	22
2.4.3. cDNA-Synthese	23
2.4.4. Real-Time PCR	23

2.5.Bestimmung von Hyaluronsäure im Medium 2.5.1. Zellkultur, Stimulation sowie Medium- und	25
Proteinernte 2.5.2. Hvaluronsäure-Quantifizierung	25
2.5.3. Proteinbestimmung	
2.6. Migrationsversuche	27
2.7. Proliferationsversuche	28
2.8. Färbungen von Hyaluronsäure	28
2.9. Statistik	29

3.	ERGEBNISSE	30
	3.1.Stimulation mit TNFα	32
	3.2.Stimulation mit IL-6	.34
	3.3. Stimulation mit IGF-1	.36
	3.4. Stimulation mit Insulin	40
	3.5. Stimulation mit Angiotensin II	43
	3.6. Stimulation mit Leptin	46
	3.7. Stimulation mit Adiponectin	48
	3.8. Stimulation mit einem Thromboxan A ₂ Analogon	51
	3.9. Stimulation mit Exendin-4	.53
	3.10.Migration und Proliferation3.10.1.Migration3.10.2.Proliferation	55 55 56

4.	DISKUSSION	57
	4.1. TNFα als Hyaluronsäure-induzierendes Adipokin	58
	4.2. IL-6 beeinflusst die Hyaluronsäure strukturell	59

	4.3. Der Wachstumsfaktor IGF-1 stimuliert die Hyaluronsäure Sekretion	60
	4.4. Insulin zeigt unter diesen Versuchsbedingungen keine Effekte	63
	4.5. Angiotensin II zeigt keinen Einfluss auf das Hyaluronsäure System der VSMC	65
	4.6. Leptin verändert die Struktur der Hyaluronsäure	.66
	4.7. Adiponectin senkt die HAS 2-mRNA-Expression	67
	4.8. Thromboxan beeinflusst das Hyaluronsäure-System auf verschiedene Arten	.68
	4.9. Exendin-4 ohne Einfluss auf das Hyaluronsäure-System der VSMC	69
	4.10. Zusammenfassung der regulatorischen Effekte auf das Hyaluronsäure-System der VSMC und deren Relevanz für die Atherosklerose	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG	74
6.	SUMMARY	75
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	.76
8.	LITERATURVERZEICHNIS	.78
9.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	82
10.	. DANKSAGUNG	83

1. EINLEITUNG

1.1. Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus verschiedenen Makromolekülen wie Kollagen, Elastin, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen. Mit Ausnahme der Hyaluronsäure liegen die Glykosaminoglykane Protein-gebunden vor und werden als Proteoglykane bezeichnet. Hierzu zählen zum Beispiel Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat.

Die EZM ist ein komplexes, bioaktives Kompartiment, das unterschiedliche physiologische Aufgaben erfüllt. Sie verleiht dem Gewebe Stabilität und spielt eine wichtige Rolle im Bereich der Zelladhäsion, -migration und –proliferation (Katsuda, et al., 2003). Die EZM, im Speziellen die Hyaluronsäure, trägt außerdem entscheidend zur Pathogenese verschiedener Krankheiten bei.

1.2. Hyaluronsäure, Hyaluronsäuresynthasen und Hyaluronidasen

Die Hyaluronsäure (HA) ist ein wichtiger Bestandteil der EZM. Sie besteht aus unverzweigt aneinander gereihten Dissacharideinheiten aus N-Acetyl-Glucosamin und Glukuronsäure, welche jeweils $\beta(1,4)$ - oder $\beta(1,3)$ -glykosidisch verbunden sind (Stern, et al., 2006) (Abbildung 1-1).



Abbildung 1-1: Hyaluronsäure besteht aus alternierenden Einheiten N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, die $\beta(1-4)$ bzw. $\beta(1-3)$ verknüpft sind und sich nicht verzweigen. Modifiziert nach (Toole, 2004).

Das HA-Polymer ist aus 2.000-25.000 Dissacharideinheiten aufgebaut, hat ein Molekulargewicht von bis zu 10^7 Da und eine Polymerlänge von 2-25 μ m (Toole, 2004).

Im Gegensatz zu den übrigen Glykosaminoglykanen wird die HA nicht am Golgi-Apparat oder am endoplasmatischen Retikulum hergestellt.

Die Synthese der HA erfolgt stattdessen durch membranständige Hyaluronsäuresynthasen (HAS). Diese verknüpfen durch ihre Glykosyltransferasefunktion UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Acetyl-D-Glykosamin alternierend miteinander (Prehm, 1984).



Abbildung 1-2: Modell der Hyaluronsäureproduktion einer glatten Gefäßmuskelzelle sowie der HA-Interaktion mit Bindeproteinen und Rezeptoren.

Man unterscheidet drei verschiedene Isoenzyme der Hyaluronsäuresynthasen (HAS 1-3). Bei dem Isoenzym HAS 3 kennt man heute zwei verschiedene Splicing-Varianten: HAS 3v1 und HAS 3v2 (Monslow, et al., 2003). Über Funktion und Regulationsmöglichkeiten der HAS 3v2 ist bisher nichts bekannt.

Die verschiedenen HAS-Isoenzyme zeigen unterschiedliche enzymatische Aktivität. Sie variieren unter anderem in der von ihnen synthetisierten HA-Kettenlänge und in der Genexpressions-Regulation durch verschiedene Stimuli. Diese Unterschiede lassen verschiedene physiologische Funktionen im menschlichen Körper vermuten (Itano, et al., 1999).

Der Katabolismus der HA bis hin zum Oligomer erfolgt überwiegend durch die Hyaluronidase 1 und die Hyaluronidase 2. Insgesamt sind im menschlichen Genom 6 verschiedene Hyaluronidasen bekannt (Csoka, et al., 2001).

Die HA kommt in vielen Gebieten des menschlichen Körpers vor. So findet man sie vor allem an den Stellen, wo ihre elastischen Eigenschaften und ihre Fähigkeit, Wasser zu binden, von entscheidender Bedeutung sind: als Schmiermittel in der Gelenkflüssigkeit, im Glaskörper des Auges, in der Haut, im Knorpel und in der Nabelschnur (Fraser, et al., 1997). Aber auch in anderen Geweben und Prozessen spielt HA eine wichtige Rolle. Sie ist zum Beispiel an der Wundheilung (Slevin, et al., 2002) und am Tumorwachstum (Toole, et al., 2002), (Twarock, et al., 2009) entscheidend beteiligt. Weiterhin ist die HA in die Embryonalentwicklung eingebunden: ein Knockout der HAS2 führt zur Letalität des Embryos im Mutterleib (Camenisch, et al., 2000).

Funktionell ist die Auswirkung der HA auf Migration und proliferative Prozesse verschiedener Zelltypen bekannt (Lee, et al., 2000). Die durch HA vermittelte Beeinflussung von Migration und Proliferation spielt vor allem in der (Patho-) Physiologie glatter Muskelzellen eine wichtige Rolle, da diese Prozesse in der Progression der Atherosklerose eine entscheidende Bedeutung haben (Evanko, et al., 1999). Dieser Aspekt der pro-atherosklerotischen Eigenschaften der HA wird in Abschnitt 1.3.2. genauer beschrieben.

1.3. Atherosklerose und proatherosklerotische Wirkungen der HA

1.3.1. Atherosklerose

Die mit Atherosklerose assoziierten Folgekrankheiten sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen (Loppnow, et al., 2008).

Auch in Deutschland sind ungefähr 40 % aller Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen. Damit liegen diese Erkrankungen deutlich vor den Tumorerkrankungen, an denen ungefähr 25 % der Deutschen versterben (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2011).

Unter Atherosklerose versteht man eine entzündliche Erkrankung des arteriellen Blutgefäßsystems, die mit einer Einlagerung von Fetten, Thromben, Bindegewebe und Kalk in die Gefäßwand einhergeht. Dies bezeichnet man als atherosklerotische "Plaquebildung".

Histologisch ist die Atherosklerose durch einen Verlust des typischen Aufbaus der Arterienwand gekennzeichnet. Die physiologische Dreischichtigkeit aus Intima (Endothelzellen und subendotheliales Bindegewebe), Media (glatte Gefäß-Muskelzellen) und Adventitia (Bindegewebe) wird aufgehoben.

Nach der "Response to injury"-Hypothese von Russell Ross geht der Atherosklerose-Entstehung ein Endothelschaden voraus. Dieser wird zum Beispiel ausgelöst durch erhöhte LDL (Low Density Lipoprotein)-Konzentrationen im Blut, durch freie Radikale, Genveränderungen, erhöhte Homocysteinspiegel oder infektiöse Mikroorganismen wie das Herpesvirus oder Chlamydien (Ross, 1999).

Die hierdurch verursachte Permeabilitätserhöhung und die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen führen zur vermehrten Einwanderung von Leukozyten und Monozyten in die Gefäßwand. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche vermehrt oxidiertes LDL aufnehmen, und werden schließlich als Schaumzellen bezeichnet, die den Hauptteil des atherosklerotischen Plagues ausmachen. Infolge der Entzündung werden glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Media aktiviert. Die VSMC differenzieren von einem physiologisch kontraktilen, ruhenden Phänotyp zu einem synthetischen Phänotyp, wandern in die Intima ein und bilden dort vermehrt die EZM. So tragen sie in einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion zur Entstehung der sogenannten Neointimahyperplasie bei, die aus VSMC und EZM-Molekülen besteht (Ross, 1999).

10



Abbildung 1-3: Pathophysiologie der Atherosklerose nach (Ross, 1999).

Zu den gefährlichsten Folgekrankheiten der Atherosklerose gehören der Herzinfarkt und der Schlaganfall, jeweils ausgelöst durch eine Plaqueruptur oder eine Minderperfusion des entsprechenden Gewebes. Oftmals erleben Atherosklerose-Patienten eine jahrzehnte-dauernde symptomlose Phase, ehe sie plötzlich eine Ischämie (Minderdurchblutung) erleiden (Davies, et al., 1985).

1.3.2. Proatherosklerotische Wirkungen der Hyaluronsäure

Die Neointima in atherosklerotischen Plaques wird dominiert von extrazellulärer Matrix. Daher ist die Funktion der HA in der Pathophysiologie der Atherosklerose ein entscheidender Faktor. Es ist bekannt, dass die HA aktiv an der Modulation von Proliferation, Migration, Gefäßneubildung und Entzündung im atherosklerotischen Plaque beteiligt ist. Durch eine Akkumulation von HA-Molekülen wird zum Beispiel die Migrations- und Proliferationsrate von glatten Gefäßmuskelzellen beeinflusst (Evanko, et al., 1999). In erodierten Plaques wurde außerdem eine Versikan- und HA-reiche EZM nachgewiesen (Kolodgie, et al., 2004). Dies könnte darauf hinweisen, dass HA die Stabilität atherosklerotischer Plaques deutlich absenkt. Des Weiteren ist HA ein wichtiger Ligand des CD44-Rezeptors, der ebenfalls in Entzündungsprozesse, Leukozytenmigration und Zellproliferation im Rahmen der Atherosklerose eingebunden ist (Lesley, et al., 1993).

Die Regulation des HA-Systems spielt also eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Entstehung und Stabilität atherosklerotischer Plaques.

1.4. Metabolisches Syndrom und Diabetes Mellitus

1.4.1. Metabolisches Syndrom und Fettgewebe

Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose und der damit verbundenen Folgekrankheiten. Hierzu zählen hohes Alter, männliches Geschlecht, genetische Veranlagung, Bewegungsmangel, Übergewicht, Rauchen, Diabetes Mellitus, Bluthochdruck, erhöhte Blutfettwerte, Gicht und viele weitere. Das sogenannte "Metabolischen Syndrom" fasst eine Risikokonstellation zusammen, die zu einem deutlich erhöhten Risiko, eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zu erleiden, führt. Nach der Internationalen Diabetes Federation (IDF) sind neben einer diagnostizierten Adipositas (= Fettleibigkeit; definiert als Taillenumfang ≥94 cm bei Männern bzw. ≥80 cm bei Frauen) das Vorliegen von zwei weiteren Risikofaktoren, nämlich Diabetes Mellitus Typ 2, Fettstoffwechselstörungen oder Bluthochdruck (>130mmHg systolisch) Voraussetzung für das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms (Paoletti, et al., 2006).

Die an erster Stelle genannte Adipositas kennzeichnet die Wichtigkeit des Fettgewebes in diesem Zusammenhang. Lange Zeit galt das weiße Fettgewebe lediglich als Energiespeicher des menschlichen Körpers. Mittlerweile ist darüber hinaus seine Funktion als endokrines Organ vielfach beschrieben worden. Das Metabolische Syndrom geht mit einer Entzündung des Fettgewebes und einer damit verbundenen Produktion verschiedener Mediatoren einher. Da es sich bei diesen Stoffen meist um Zytokine handelt, wurde der Begriff Adipozytokine oder Adipokine eingeführt, benannt nach ihrer Produktion im Fettgewebe. Zu den mehr als einhundert Adipokinen zählen unter anderem Interleukin 6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1), Adiponektin, Leptin und Angiotensin II (Ang II) (Fischer-Posovszky, et al., 2007) (Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: Fettgewebe als endokrines Organ. Modifiziert nach (Fischer-Posovszky, et al., 2007). Rot unterstrichen wurden die in dieser Arbeit experimentell untersuchten Faktoren.

Perivaskuläres Fettgewebe wirkt über die Produktion verschiedener Moleküle als lokaler Promotor der Atherosklerose. Es werden unter anderem Entzündungsreaktionen, Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und die Gefäßneubildung gefördert (Thalmann, et al., 2007).

1.4.2. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus als eine der Hauptkomponenten des Metabolischen Syndroms ist definiert als eine Erhöhung der Plasmaglukosekonzentration. Diese entsteht entweder durch absoluten Insulinmangel (Typ 1) oder durch relativen Insulinmangel in Folge herabgesetzter Insulinsensitivität bis hin zur Insulinresistenz verschiedener Gewebe (Typ 2). Für manche der oben genannten Adipokine ist ein fördernder Einfluss auf diese Insulinresistenz beschrieben, so dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Diabetes Mellitus und dem endokrinen Fettgewebe besteht (Zou, et al., 2008).

In-vitro Untersuchungen haben außerdem einen Zusammenhang zwischen Diabetes Mellitus und HA aufgezeigt: HA akkumuliert besonders in den Fettzellen, die zuvor durch einen hohen Glukosespiegel im Nährmedium zur Hypertrophie angeregt wurden. Auch nachfolgende *in-vivo* Studien an diabetischen Mäusen haben diese Anhäufung der HA im univakuolären Fettgewebe darstellen können. Assoziiert ist dieser Prozess mit erleichterter Monozytenadhäsion und –chemotaxis (Han, et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass die HA in die inflammatorische Reaktion während des Diabetes Mellitus involviert ist.

Aus all diesen Zusammenhängen wird deutlich, wie sehr das Metabolische Syndrom und der Diabetes Mellitus über das Fettgewebe in entzündliche Prozesse und in die Pathogenese der Atherosklerose eingebunden sind.

Unklar bleibt jedoch, in wie weit die vom Fettgewebe produzierten Mediatoren direkt auf das HA-System der glatten Muskelzellen einwirken und somit möglicherweise über diesen Wirkmechanismus an der Atheroskleroseentstehung teilhaben.

1.4.2.1. Inkretinmimetika als Beispiel der Antidiabetika

In diesem Kontext sollten in der hier vorliegenden Arbeit nicht nur die sogenannten Adipokine, sondern auch Insulin und das neue Antidiabetikum Exenatide in ihrer Wirkung auf das HA-System glatter Muskelzellen untersucht werden.

In Deutschland sind seit dem Jahr 2007 in der Arzneimittelgruppe der Antidiabetika sogenannte Inkretinmimetika auf dem Markt. Leitsubstanz ist das Exenatide, ein Polypeptid aus 39 Aminosäuren. Es handelt sich hierbei um die biotechnologisch hergestellte Variante des Exendin-4, eines Polypeptids aus dem Speichel der nordamerikanischen Gila-Krustenechse. Die Struktur des Exenatide ähnelt dem im Darm produzierten Glucagon-likepeptide 1 (GLP-1) und wirkt agonistisch am GLP-1-Rezeptor, über den in der Bauchspeicheldrüse glukoseabhängig eine Insulinfreisetzung erreicht wird. Exenatide wirkt somit blutzuckersenkend und wird zur Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2 eingesetzt.

1.4.2.2. Erhöhte Thrombozytenaggregation bei Diabetes Mellitus

Eine weitere Besonderheit bei Betrachtung des Krankheitsbildes Diabetes Mellitus stellt die Thrombozytenaggregation und damit die Blutgerinnung dar. Das erhöhte atherothrombotische Risiko bei Typ 2-Diabetikern wird von verschiedenen Autoren mit einer gesteigerten Thrombozytenaktivität in Die beschriebene, erhöhte Verbindung gebracht. Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren auf Thrombozytenoberflächen sowie die deutlich gesteigerte Produktion von Thromboxan und Thrombin, die beide die Aggregation der Blutplättchen fördern, bringen die Blutgerinnung des Diabetikers ins Ungleichgewicht (Natarajan, et al., 2008). Aus diesem Grund sollte auch das prothrombotische Milieu auf Basis der gesteigerten Thrombozytenaktivität bei der Betrachtung des Diabetes Mellitus und seiner Folgekrankheiten, zum Beispiel der Atherosklerose, nicht außer Acht gelassen werden. Daher sollten auch die Effekte des Thomboxans auf das HA-System der glatten Muskelzellen untersucht werden.

1.5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Es ist mehrfach bewiesen, dass Hypertoniker, adipöse Menschen, Raucher und vor allem auch Diabetiker ein erhöhtes Risiko haben, eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zu erleiden (Paoletti, et al., 2006).

Die Mechanismen, über die diese Risikofaktoren auf die Entstehung der Atherosklerose einwirken, sind sicherlich noch nicht hinreichend aufgeklärt.

Es ist auch bekannt, dass die HA auf vielfältige Weise in die Entstehung der Atherosklerose eingebunden ist.

Die Regulationsmöglichkeiten der verschiedenen HAS-Isoenzyme sind jedoch weitgehend unerforscht. Vor allem bleibt bisher unklar, welche Faktoren an der gesteigerten Aktivität der HAS-Isoenzyme beteiligt sind.

Des Weiteren steht fest, dass die HA eng mit dem Fettgewebe diabetischer Mäuse assoziiert ist und somit während inflammatorischer Prozesse des Diabetes Mellitus eine besondere Funktion einnehmen könnte.

Offen bleibt an dieser Stelle jedoch die Frage, inwiefern das HA-System durch die metabolischen Veränderungen in der Pathogenese von Hypertonie, Adipositas und vor allem Diabetes reguliert wird.

Somit sollte in dieser Arbeit die Beziehung zwischen dem Metabolischen Syndrom und der HA-Produktion an VSMC aus menschlichen Koronararterien untersucht werden. Schwerpunktmäßig sollte der Effekt der verschiedenen vermehrt im Blut zirkulierenden Stoffe (wie Insulin, Thromboxan und der Adipokine) auf das HA-System betrachtet werden.

Weiterhin sollten die Effekte des Arzneistoffs Exenatide, auf das Proliferationsund Migrationsverhalten der glatten Muskelzellen untersucht werden.

Somit sollten mögliche Rückschlüsse auf die Pathogenese der Atherosklerose gezogen werden.



Abbildung 1-5: Modellvorstellung der Auswirkung des Metabolischen Syndroms auf die Atherosklerose über die Hyaluronsäure.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Substanzen

SUBSTANZ	SUBSTANZKLASSE	HERSTELLER, ORT	END- KONZENTRATION
Adiponectin	Hormon	R&D Systems, Wiesbaden	0,1 μg/ml 1 μg/ml
Ang II	Hormon	Bachem, Weil am Rhein	0,1 μM, 1 μM
Exendin-4	Antidiabetikum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 nM
IGF-1	Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 ng/ml
IL-6	Zytokin	Biomol, Hamburg	10 ng/ml
Insulin	Hormon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 ng/ml 1000 ng/ml
Leptin	Hormon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 ng/ml
LY294002	Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt	10 μM
TNF α	Zytokin	Biomol, Hamburg	10 ng/ml
U-46619	Hormon-Analogon	Cayman- Chemical, USA	3 μΜ

Tabelle 1

2.1.2. Chemikalien und Kits

CHEMIKALIEN UND KITS	HERSTELLER, ORT	
[³ H]-Thymidin	PerkinElmer, Massachusetts,	
	USA	
Chloroform	Sigma, Taufkirchen	
Einbettmedium PROLONG GOLD	Invitrogen, Karlsruhe	
Ethanol	Merck, Darmstadt	
HA Test Kit	Corgenix, Colorado, USA	
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Natriumhydroxid 0,1 M	Merck, Darmstadt	

Paraformaldehyd 3,7 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Perchlorsäure 0,3 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UCD	Invitrogen, Karlsruhe	
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden	
QuantiTecRec Transcription Kit	Qiagen, Hilden	
Streptomyces Hyaluronidase 2 U/ml	MP Biomedicals, Eschwege	
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe	
TriReagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Tritonlösung 0,1 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	

Tabelle 2

2.1.3. Zellkultur

SUBSTANZ	HERSTELLER, ORT	
Humane glatte Muskelzellen aus	Promocell, Heidelberg	
Koronararterien		
Smooth muscle cell growth medium 2	Promocell, Heidelberg	
+ firmeneigener Zusatz: "SupplementMix",		
enthält:		
 Epidermalen Wachstumsfaktor 		
 Basis Fibroblasten Faktor 		
- Insulin		
- Fötales Kälberserum		
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe	
DMEM, versetzt mit	Invitrogen, Karlsruhe	
- Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe	
 nicht-essentielle Aminosäuren 	Invitrogen, Karlsruhe	
PBS, steril	Invitrogen, Karlsruhe	
Penicillin/Streptamycin	Invitrogen, Karlsruhe	
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin	

Tabelle 3

2.1.4. Puffer und Lösungen

PUFFER/ LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
1 x PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 8,3 mM Na₂HPO₄ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH₂PO₄

Tabelle 4

2.1.5. Antikörper

ANTIKÖRPER	HERSTELLER, ORT	EINGESETZTE KONZENTRATION
Hyaluronsäurebindeprotein HABP	Seikagaku, Japan	0,2 μg/ml
Streptavidin-konjugierter FITC-Zweitantikörper	DAKO, Hamburg	1,25 μg/ml

Tabelle 5

2.2. Geräte und Materialien

	GERÄTE	HERSTELLER, ORT
Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Elisa-Reader	Microplate Reader	BioRad, München
Fluoreszenzimager	Taiphoon 8600 Imager	GE Healthcare Europe, München
Fluoreszenzmikroskop inkl.	Nikon Eclipse TE-2000	Nikon, Badhoevedorp,
Kamera und Software	Software	Niederlande
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	"Function Line" BB16	Heraeus, Hanau
Migrationskammer	Boyden-Kammer	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Migrationsmembran	Polycarbonat-Membran, 10 μm Poren	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Mikroskop	Olympus CK 40	Olympus, Hamburg
Phospho-Imager	Typhoon 8600 Imager	GE Healthcare Europe, München
Real-Time-PCR	7300 RealTime PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
RNA-Messung	Spectrophotometer ND- 1000	PeqLab, Erlangen
Sterile Werkbank	Antair BSK	Anthos-Mikrosysteme, Köln
Szintillationszähler	LS6000IC	BeckmanCounter, Krefeld
Wasseraufbereitungsanlage	Milli Q Biocel	Millipore, Schwalbach
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R, kühlbar Minifuge RF	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau

Tabelle 6

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kultivierung

Die glatten Muskelzellen aus menschlichen Koronararterien wurden in Smoothe-muscle-cell (SMC2)-Medium mit firmeneigenem Kultivierungs-Zusatz angezüchtet, dem zusätzlich Penicillin und Streptamycin gegen bakterielle Kontaminationen zugesetzt wurden. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versorgt und regelmäßig mikroskopisch beobachtet. Sobald die Zellen zu ca. 80 % konfluent waren, wurden sie gesplittet. Zum Ablösen der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich durch eine 3-minütige Behandlung mit 1x-Trypsin bei Raumtemperatur abgelöst. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 %-igem DMEM gestoppt. Die Zellen wurden anschließend in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation des Röhrchens für 5 Minuten bei 1000 revolutions per minute (rpm, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur (RT) wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in frischem SMC-Medium resuspendiert. Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt. Durch Auszählen von 10 µl dieses Gemischs mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt.

Trypanblau penetriert durch seine negative Ladung nur Zellen, in denen das aktiv aufrechterhaltene innere Membranpotential zusammengebrochen ist und färbt somit nur abgestorbene Zellen an.

Zur Weiterzucht wurden die Zellen auf neue Kulturschalen oder für Stimulationsexperimente auf 6-, 12- oder 24-Loch-Platten ausgesät.

2.3.2. Stimulationsversuche

Für die Stimulationsexperimente wurden die glatten Muskelzellen zwischen Passage 5 und 10 in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät. Nach einer

Kultivierungsphase in 1 ml Vollmedium wurden die Zellen für 24 Stunden in DMEM ohne FCS synchronisiert. Dies führt dazu, dass die Zellen in die sogenannte G0-Phase des Zellzyklus übergehen. Die Stimulationseffekte sollten durch die Zyklusunabhängigkeit einheitlicher sein.

Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Inkubationszeiten mit den verschiedenen Konzentrationen der Substanzen versetzt.

2.4. Bestimmung der mRNA-Expression der HAS 1-3

2.4.1. Präparation (RNA-Isolierung)

Zum Ernten der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit TriReagent (1 ml pro 6-well) versetzt. Die Substanz bewirkt die Lyse der Zellen, so dass unter anderem die RNA freigesetzt wird.

Durch Zugabe von Chloroform bildete sich ein klarer Überstand, in dem sich unter anderem die RNA löste. Zur besseren Trennung wurde diese wässrige Phase anschließend bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA wurde mit Isopropanol gefällt, bei 4°C für 30 Minuten zu einem Pellet herunter zentrifugiert und anschließend in 75 %-igem Ethanol gewaschen. Nach wiederholter 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Schließlich wurde die RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Löslichkeit zu verbessern. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –80°C.

2.4.2. RNA-Quantifizierung

Nach dem Auftauen wurde im ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer die RNA-Konzentration der Proben in ng/µl bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz diente reines ultra-gefiltertes H₂O. Der Wert [260/280] gibt den Quotienten der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm an und gibt Aufschluss über die Anwesenheit von möglichen Kontaminationen, zum Beispiel Protein oder Phenol. Er ist Maßstab für die Reinheit der Probe. Ein Wert von 1,5 gilt als rein, Quotienten zwischen 1,8 und 2,1 werden akzeptiert.

2.4.3. cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der gewonnenen RNA in doppelsträngige cDNA (copy) wurde das QuantiTecRec Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurde jeweils 1 μ g der RNA-Proben in insgesamt 12 μ l RNAse-freiem H₂O gelöst. Zur Entfernung von genomischer DNA wurde die Probe mit 2 μ l DNA-wipe-out Buffer gemischt, für 2 Minuten im Cycler auf 42°C erhitzt und anschließend direkt auf Eis überführt.

Im nächsten Schritt wurde ein zuvor hergestellter MasterMix aus

4 μl RT-Buffer

1 µl Primer

1 µl Enzym hinzupipettiert.

Die Proben wurden vermischt, im Cycler für 30 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend für 3 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zum Abschluss wurde die erhaltene cDNA in jeweils 100 μ l H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

2.4.4. Real-Time PCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können Nukleotidsequenzen in millionenfacher Kopie hergestellt werden. Dazu werden kurze Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, die sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren (*Anlagerung*) und das zu amplifizierende Stück einschließen. Für jedes zu amplifizierende Gen werden zwei verschiedene Primer eingesetzt ("vorwärts" und "rückwärts"), da nur so die Polymerase an beiden Strängen ansetzen kann, um die DNA zu kopieren. Vom 3'-Ende der Oligonukleotide synthetisiert die hitzestabile Taq-Polymerase den neuen Strang

(*Elongation*). Durch Erhitzen wird der entstandene DNA-Doppelstrang getrennt (*Denaturierung*) und die Oligonukleotide können sich erneut an die DNA (Matrize oder Amplifikat) anlagern. Durch zyklisches Wiederholen dieses Prozesses kann die DNA somit exponentiell vermehrt werden.

Bei der quantitativen Real-Time PCR ist zusätzlich die Darstellung des Produktverlaufs, also der gewonnenen DNA möglich. Diese erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen während der PCR. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Für die quantitative Real-Time PCR wurde Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG der Firma Invitrogen genutzt.

PCR- Ansatz

cDNA	5 μΙ
Oder H ₂ O	5 μl
qPCR supermix	10 μl
Primer	5 nM; 2,5 μl je Primer
Tabelle 7	

Temperaturprofil

50°C	2 Minuten	1x	
95°C	2 Minuten	1x	Denaturierung
95°C	15 Sekunden	40 – 60 Zyklen	Anlagerung
60°C	30 Sekunden		Elongation

Tabelle 8

Verwendete Primer

GEN	PRIMER-SEQUENZEN
humane HAS 1	5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3'
	5'-CTGGAGGTGTACTTGGTAGC-3'
humane HAS 2	5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3'
	5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
humane HAS 3v1	5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3'
	5'- CCCACTAATACACTGCACAC-3'
humaner GLP-1	5'-CATCAAATGCAGACTTGCCA-3'
Rezeptor	5'-ATCACAAAGGCAAAGATGACC-3'
humane GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'
	5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'

Tabelle 9

Als Ergebnis wurde die relative Expression der entsprechenden Gene jeweils standardisiert auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als interne Kontrolle ausgegeben (Sussmann, et al., 2004).

2.5. Bestimmung der Hyaluronsäure im Medium

2.5.1. Zellkultivierung, Stimulation sowie Medium- und Proteinernte

Die Zellkultur und Stimulation erfolgte entsprechend der unter 2.3. für die RNA-Gewinnung beschriebenen Methode. Es wurden 12-Loch-Platten genutzt, in die 10.000 Zellen/cm² in jeweils 500 ml Medium ausgesät und stimuliert wurden. Nach 24-stündiger Stimulation wurde das Medium in sterile Eppendorf-Gefäße

überführt und bei -20°C eingefroren.

Die adhärenten Zellen wurden mit 75 µl einer 0,1 M NaOH-Lösung für 2-3 Minuten lysiert und anschließend ebenfalls in sterile Eppendorf-Gefäße überführt und bei –20°C eingefroren.

2.5.2. Hyaluronsäure-Quantifizierung im Medium

Die Hyaluronsäurequantifizierung wurde mit Hilfe des Hyaluronic Acid Test Kit durchgeführt. Das Prinzip des Kits basiert auf der quantitativen Bindung der HA an ein Hyaluronsäure bindendes Protein (HAbP).

Die genutzten Reaktionsgefäße wurden bereits vom Hersteller mit HAbP beschichtet. Die Zellkulturüberstände und jeweiligen Standards wurden in die Mikrovertiefungen pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Hierbei reagierte die enthaltene HA mit dem immobilisierten Bindeprotein. Durch viermaliges Waschen mit PBS wurden ungebundene Moleküle des Überstandes entfernt. Anschließend wurden 100 μ l an Meerettich-Peroxidase konjugiertes HAbP zugesetzt, das wiederum Komplexe mit gebundener HA bildet.

Nach einem weiteren vierfachen Waschschritt mit PBS wurde die Farbreaktion durch Zugabe eines Tetramethylbenzidin-Substrats und Wasserstoffperoxid ausgelöst und nach 30 Minuten durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Vertiefung beendet.

Die Farbintensität wurde im Photometer bei 450 nm gemessen.

2.5.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt, um die gemessenen HA-Konzentrationen auf die vorhandene Proteinmenge zu standardisieren. Die Angabe der HA-Konzentration erfolgte in ng HA/µg Protein.

Zunächst wurde auf einer 96-Well-Platte eine Standardreihe aus BSA-Lösung hergestellt, es wurden Proteinmengen von 400 ng bis 3200 ng eingesetzt. In weitere Wells wurden jeweils 5 μ l der zu bestimmenden Proteinprobe pipettiert.

Zur Bestimmung der verschiedenen Konzentrationen wurden in jedes Well 200 µl des 1:5 verdünnten Biorad-Farbreagenzes beigemischt.

Die Konzentrationsmessung erfolgte mittels Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Standardkurve sollte einen Korrelationskoeffizienten >0,99 aufweisen.

2.6. Migrationsversuche

Die Migrationsaktivität der glatten Muskelzellen wurde mit Hilfe einer modifizierten 48-Loch-Boyden-Kammer untersucht. Die Versuche erfolgten jeweils in 6-facher Bestimmung. Der Mittelwert des 6-fach Ansatzes entsprach n=1.

In die unteren Löcher der Kammer wurden jeweils 28 µl Medium mit dem entsprechenden Stimulus pipettiert. Als Negativ-Kontrolle galt FCS-freies Medium, als Positiv-Kontrolle PDGF-BB (10 ng/ml).

Zwischen die beiden Platten der Boyden Kammer wurde ein Polycarbonatfilter (Track-Etch Membrane, Whatman nucleopore, 25 x 80 mm PVDF) der Porengröße 10 µm platziert. Die Membran wurde zuvor mit durch 0,05 M Essigsäure verdünntem bovinem monomerem Kollagen Typ 1 beschichtet.

Zur Bestimmung der Migrationsrate wurden nun in die oberen Löcher der Boyden Kammer wurden jeweils 15.000 Zellen (in jeweils 45 µl Zellsuspension enthalten) pro Loch pipettiert, die Zellen waren nach dem Splitten in FCS-freiem Medium resuspendiert worden. Somit stellt zum Beispiel ein in die untere Kammer pipettiertes FCS-haltiges Medium einen Migration fördernden Stimulus dar.

Die Migrationsdauer betrug 6 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen.

Anschließend wurden die nicht migrierten Zellen durch Waschen mit PBS und Abschaben von der oberen Seite der Membran entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite wurden für 5 Minuten mit 80 %-igem Methanol fixiert und getrocknet.

Die Quantifizierung der Migration erfolgte nach Färbung der DNA innerhalb der Zellkerne mittels Propidiumjodid-Lösung (5 µg/ml PBS) mit Hilfe eines Typhoon 8600 Imagers.

Gemessen wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 532 nm und einer Detektionswellenlänge von 580 nm. Die ausgegebene Fluoreszenzintensität war proportional zur Anzahl der migrierten Zellen (Conley, et al., 2004).

2.7. Proliferationsversuche

Die Bestimmung der Proliferationsrate der VSMC erfolgte durch Messung der DNA-Neusynthese. Hierzu wurden die Zellen in 24-Loch-Platten in einer Dichte von 15.000 Zellen pro Loch ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium synchronisiert. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden, während der letzten 4-6 Stunden wurden pro Vertiefung 10 μ I [³H] markiertes Tymidin (1 μ Ci/mI) hinzugegeben.

Die Aufarbeitung erfolgte nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes zunächst durch 2-maliges Waschen mit kaltem PBS. Anschließend wurde durch Zugabe von Perchlorsäure für 2 Minuten die DNA gefällt. Es folgte die Lyse der DNA in 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (300 µl/Loch) unter ständiger Bewegung für 15 Minuten bei 37 °C.

30 µl der Probe wurden jeweils zur Proteinbestimmung eingesetzt (vergleiche 2.5.3.), die übrigen 270 µl wurden mit 4,7 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und ein Szintillationszähler registrierte die Zerfälle pro Zeit (Counts per minute, CPM).

Innerhalb eines Experimentes war jede Versuchsbedingung 3-fach vertreten; der Mittelwert des Dreifachansatzes entsprach n=1.

2.8. Färbung von Hyaluronsäure

Zur Färbung der Zellen wurden diese auf Deckgläschen kultiviert. Nach 24stündiger Stimulation wurden die VSMC zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten in einer 3,7 %-igen Formaldehydlösung auf Ethanol- und Essigsäurebasis fixiert.

Als Negativkontrolle erfolgte eine enzymatische Verdauung der HA mittels Hyaluronidase für eine Stunde bei 37°C.

Zur Darstellung der intrazellulären HA wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert.

Für die Affinitätshistochemie der HA wurden die Zellen für eine Stunde ebenfalls bei Raumtemperatur mit biotinyliertem HA-bindendem Protein (HAbP,

0,2 μg/ml, Seikagaku) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin konjugierten FITC (1,25 μg/ml, DAKO). Das Einbetten der Zellen erfolgte mittels ProLong Gold, der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI färbte gleichzeitig die Zellkerne der VSMC an.

Die Aufnahmen für die Färbung erfolgten am Fluoreszenzmikroskop der Firma Nikon.

2.9. Statistik

Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Die statistische Auswertung erfolgte abhängig vom Versuchsaufbau mit Hilfe des T-Tests, oder mittels ANOVA.

In den Analysen wurde ein Signifikanzniveau von *: p<0,05 festgelegt.

Die Analysen erfolgten mittels GraphPad-Software, Version 5.0.

3. ERGEBNISSE

Für die Versuche wurden glatte Muskelzellen aus humanen Koronararterien für 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert und anschließend für 6 oder 24 Stunden mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Alle diese Stimuli stehen im direkten Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom beziehungsweise mit dem Krankheitsbild des Diabetes Mellitus.

Es wurde die RNA aus den Zellen isoliert und das Expressionsniveau der verschiedenen Gene bestimmt. Als Referenzgen wurde jeweils das Expressionsniveau der GAPDH mRNA gemessen.

Zur Interpretation der Ergebnisse wurde bestimmt, zu welchem Anteil an der gesamten HAS-Expression die einzelnen Synthasen in humanen glatten Gefäßmuskelzellen jeweils exprimiert werden. Diese Messung erfolgte an für 30 beziehungsweise 48 Stunden Serum-deprivierten Zellen ohne Stimulation, so dass die basale Genexpression bestimmt wurde.

Die Ergebnisse der Expressionslevel unterschieden sich zwischen dem 30- und 48-Stunden-Wert nicht und sind aus Abbildung 3-1 ersichtlich.



Abbildung 3-1: Anteil der verschiedenen Synthase-Isoenzyme an der gesamten HAS-Expression.

Zusätzlich wurde die nach 24 Stunden in das Zellkulturmedium sezernierte HA-Menge quantifiziert.

Des Weiteren wurde die HA in und um die Zellen mikroskopisch untersucht, indem die HA angefärbt wurde und die Zellen anschließend mikroskopiert und fotografiert wurden.

Die Färbung erfolgte nach 24-stündiger Stimulation der glatten Muskelzellen mit den jeweiligen Substanzen und anschließender Fixierung. Die abgebildeten Ausschnitte der Zellfotos sind jeweils repräsentativ für die Zellen aus n=3 Versuchen ausgewählt.

Viele der Zellfotos besitzen dieselbe Kontrolle zum Vergleich, da die Zellen zum gleichen Zeitpunkt stimuliert, gefärbt und fotografiert wurden.

Als Negativkontrolle wurde eine nicht stimulierte Bedingung vor der Färbung mittels Hyaluronidase behandelt und so die HA enzymatisch verdaut (siehe Abbildung 3-2).



50 μπ

Α

В

Abbildung 3-2: Angefärbte HA (grün) und Zellkerne (blau) in VSMC; **A:** Kontrolle, **B:** HA-Verdauung.

3.1. Stimulation mit TNF α

Die Stimulation der VSMC mit TNF α (10 ng/ml) führte zu einer signifikanten Induktion der HAS 3v1 mRNA (6,226 ± 2,293 versus Kontrolle). Dieser Effekt war transient und war nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die Genexpression der übrigen HAS-Isoenzyme änderte sich durch die Inkubation nicht.

Die HA-Bestimmung im Medium nach 24 Stunden zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg (1,281 \pm 0,08120 versus Kontrolle), wie Abbildung 3-3 zeigt.

Das mikroskopische Bild der angefärbten HA in und um die glatten Muskelzellen zeigte eine gering reduzierte HA-Menge nach TNFα-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Stimulation mit dem Zytokin erschien die Anzahl der HA-gefüllten Vesikel erhöht, während die haarähnlichen Strukturen nicht mehr vorkamen (siehe Abbildung 3-3 E).





D



A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3), **B:** Stimulation für 24 h (n=3).

C: Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3).

Mittelwert ± SEM;*: p<0,05; **: p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

D+E: Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation **(E)** im Vergleich zur Kontrolle **(D)**.

3.2. Stimulation mit IL-6

Die Stimulation der Zellen mit einem weiteren vom Fettgewebe produzierten Zytokin, dem IL-6 (10 ng/ml), führte nicht zu Veränderungen im Expressionsniveau der HAS 3v1. Auch die übrigen HAS-Isoenzyme wurden durch Zugabe der Substanz IL-6 zu beiden Zeitpunkten nicht reguliert.

Die Menge der nach 24 Stunden ins Medium sezernierten HA änderte sich durch die Inkubation ebenfalls nicht (siehe Abbildung 3-4).

Die HA-Färbung zeigte eine Verringerung der HA durch Stimulation mit IL-6. Auffällig waren die extrazellulär liegenden strangförmigen Strukturen, sogenannten HA-Kabel, in denen sich die HA-Moleküle zu verdichten schienen (Pfeilmarkierung, siehe Abbildung 3-4 E).





D



Ε

Abbildung 3-4: Stimulation mit IL-6 (10 ng/ml).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3-4), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-7). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3); Mittelwert ± SEM. **D+E:** Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (**E**) im Vergleich zur Kontrolle (**D**).

3.3. Stimulation mit IGF-1

Wie aus Abbildung 3-5 ersichtlich, induzierte eine 24-stündige Inkubation mit IGF-1 (100 ng/ml) deutlich die Expression der HAS 2 mRNA (2,609 \pm 0,3925 versus Kontrolle). Dieser Effekt deutete sich nach 6 Stunden bereits an, erreichte hier jedoch noch keine Signifikanz.

Die übrigen Isoenzyme der HA-Synthase wurden durch die Stimulation nicht reguliert.

Die HA-Menge im Medium stieg nach 24-stündiger Behandlung der Zellen ebenfalls signifikant an $(1,508 \pm 0,1673 \text{ versus Kontrolle}, siehe Abbildung 3-5).$

Zur mechanistischen Überprüfung dieser Induktion der HAS 2 wurden die Zellen zusätzlich zum IGF-1 für 24 Stunden mit LY294002 (10 μ g/mL), einem Pi 3-Kinase-Inhibitor, versetzt (siehe Abbildung 3-6). Durch die kombinierte Inkubation wurde das Expressionsniveau der HAS 2 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IGF-1 signifikant abgesenkt (0,2998 ± 0,1198 versus 2,609 ± 0,3925). Die Werte liegen deutlich unter den Referenzwerten der nichtstimulierten Kontrolle.


Abbildung 3-5: Stimulation mit IGF-1 (100 ng/ml).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=4), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-6). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=6). Mittelwert \pm SEM;*: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.



Abbildung 3-6: Stimulation mit IGF-1 (100 ng/ml) und LY294002 (10 μ g/ml). Die Regulation der HAS 2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle nach 24-stündiger Stimulation (n=3). Mittelwert ± SEM; *: p<0,05 zur Kontrolle; #: p<0,05 zur alleinigen Stimulation mit IGF-1.

Die HA-Färbung für die Substanzen IGF-1 und LY294002 zeigte keine Veränderung der HA-Menge nach Inkubation mit IGF-1. Auffällig ist, dass die haarähnlichen Strukturen verschwanden und sich die HA, ähnlich wie bei Stimulation mit TNFα, in Vesikeln ablagerte.

Dieser Eindruck änderte sich auch durch die Zugabe des Pi 3-Kinase-Inhibitors nicht. Erst bei Stimulation allein mit LY294002 war eine deutliche Reduktion der HA-Menge erkennbar (siehe Abbildung 3-7).



Abbildung 3-7: Angefärbte HA und Zellkerne in VSMC **A:** Kontrolle, **B:** IGF-1 (100 ng/ml), **C:** IGF-1 (100 ng/ml) +LY294002 (10 μg/ml), **D:** LY294002 (10 μg/ml).

3.4. Stimulation mit Insulin

Die Inkubation mit Insulin für 6 oder 24 Stunden führte bei einer Konzentration von 100 ng/ml nicht zu Veränderungen des HAS-Expressionsniveaus im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Auch eine Dosiserhöhung auf 1000 ng/ml regulierte die HAS 1-3 nicht. Die Menge der ins Medium sezernierten HA änderte sich nach Stimulation mit beiden Konzentrationen ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9).

Auch im mikroskopischen Bild der mit 1000 ng/ml Insulin stimulierten Zellen wurden, verglichen mit der Kontrolle, keine Unterschiede in der HA-Menge oder Struktur deutlich (siehe Abbildung 3-9 E).





A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3-4), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-7). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3); Mittelwert ± SEM.





D



Abbildung 3-9: Stimulation mit Insulin (1000 ng/ml).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3-5), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-7). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3). Mittelwert ± SEM. **D+E:** Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (**E**) im Vergleich zur Kontrolle (**D**).

3.5. Stimulation mit Angiotensin II

Die Inkubation mit Angiotensin II (Ang II) für 6 Stunden zeigte bei einer Konzentration von 0,1 μ M eine Herabregulation der HAS 1 (0,7146 ± 0,1148 versus Kontrolle). Bei Dosissteigerung auf 1 μ M deutete sich diese Regulation noch an, stellte sich jedoch nicht mehr signifikant dar. Die Herunterregulation schien nach 24 Stunden aufgehoben zu sein. Im Expressionsniveau der übrigen HAS-Isoenzyme zeigten sich zu beiden Zeitpunkten keine Veränderungen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Dies änderte sich auch durch eine Dosiserhöhung auf 1 μ M nicht.

Die Menge der ins Medium sezernierten HA änderte sich nach Stimulation mit beiden Konzentrationen ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).

Auch im mikroskopischen Bild wurden nach Zugabe von 1 μ M Ang II keine Unterschiede in der HA-Menge oder andere Besonderheiten im Vergleich zur Kontrolle deutlich (siehe Abbildung 3-11 E).



Abbildung 3-10: Stimulation mit Ang II (0,1 μM).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3-4), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-7). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3). Mittelwert \pm SEM; *: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.





D



Ε



A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3-4), **B:** Stimulation für 24 h (n=5-6). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3); Mittelwert ± SEM. **D+E:** Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (**E**) im Vergleich zur Kontrolle (**D**).

3.6. Stimulation mit Leptin

Die Inkubation mit Leptin (100 ng/ml) für 6 Stunden und 24 Stunden führte nicht zu Veränderungen des HAS-Expressionsniveau im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

Die Menge der ins Medium sezernierten HA änderte sich nach Stimulation ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 3-12).

Bei der immunhistochemischen Färbung der HA zeigten sich im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle vermehrt haarförmige HA-Strukturen (siehe Abbildung 3-12 E).







A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3 bzw. n=4), **B:** Stimulation für 24 h (n=4). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3); Mittelwert ± SEM. **D+E:** Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (**E**) im Vergleich zur Kontrolle (**D**).

Ε

3.7. Stimulation mit Adiponectin

Bei der Stimulation mit Adiponectin war die Kontrolle für das Gen der HAS 1 auf Grund der insgesamt geringen Expression nach 6 Stunden und bei einer Dosierung von 1 μ g/ml nach 24 Stunden nicht nachweisbar. Über die Regulation der Synthase kann somit in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Durch die Stimulation mit Adiponectin in beiden Konzentrationen änderte sich die Expression der HAS 2 nach 6 Stunden (0,4146 \pm 0,02871 versus Kontrolle für 0,1 µg/ml bzw. 0,4638 \pm 0,1775 versus Kontrolle für 1 µg/ml). Nach 24 Stunden befand sich das Gen wieder auf Kontrollniveau.

Die HAS 1 bei 0,1 µg/ml nach 24 Stunden und die HAS 3v1 veränderten ihr Expressionsniveau durch die Stimulation nicht.

Die Menge der ins Medium sezernierten HA änderte sich nach Stimulation mit beiden Konzentrationen ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14).

Bei der Betrachtung der Zell-Färbung nach Stimulation mit 1 µg/ml Adiponectin waren ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Quantität und Struktur der HA erkennbar (siehe Abbildung 3-14 E).



Abbildung 3-13: Stimulation mit **Adiponectin (0,1 μg/ml)**. **A+B:** Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3), **B:** Stimulation für 24 h (n=3-4).

C: Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3). n.d.=nicht detektierbar; Mittelwert ± SEM; ***: p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.





D





Abbildung 3-14: Stimulation mit Adiponectin (1 µg/ml).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=3), **B:** Stimulation für 24 h (n=3-4).

C: Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3). n.d. = nicht detektierbar; Mittelwert \pm SEM; *: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

D+E: Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation **(E)** im Vergleich zur Kontrolle **(D)**.

3.8. Stimulation mit einem Thromboxan A₂ Analogon

Durch die Inkubation mit U-46619 (3 μ M), einem Thromboxan A₂ Analogon, wurde die mRNA-Expression der HAS 3v1 im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle (DMSO) nach 6 Stunden signifikant gesenkt (0,5857 ± 0,1560 versus Kontrolle). Das Expressionsniveau der HAS-1 der Kontrollen lag nach 6 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze. So können hier über die Expression nach Stimulation keine Aussagen getroffen werden.

Nach einer Inkubation für 24 Stunden lag eine deutliche Hochregulation der HAS 1-mRNA vor (2,377 \pm 0,2825 versus Kontrolle).

Die Quantifizierung der HA im Kulturmedium der glatten Muskelzellen zeigte nach 24-stündiger Behandlung mit 3 μ M U-46619 eine deutliche Absenkung der HA-Menge (0,5060 ± 0,04021 versus Kontrolle), wie aus Abbildung 3-15 ersichtlich wird.

Anhand der gefärbten und fotografierten Zellen ließ sich kein Unterschied der HA-Menge erkennen. Auffällig waren jedoch die hier mehrfach vorkommenden, mit weißen Pfeilen markierten HA-Kabel (siehe Abbildung 3-15 E).











Abbildung 3-15: Stimulation mit TXA2 (3 μM).

€

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle.

A: Stimulation für 6 h (n=4-5), B: Stimulation für 24 h (n=3-5).

C: Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3). n.d. = nicht detektierbar. Mittelwert ± SEM;*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.

D+E: Färbung der HA und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (E) im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle (D).

3.9. Stimulation mit Exendin-4

Der Rezeptor für das Glucagon-like-peptide 1 (GLP-1-R) des Magen-Darm-Traktes, das entscheidend an der Regulation des Glukose-Stoffwechsels beteiligt ist, ist nachweislich auch auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Auf Grund der oben beschriebenen Einflüsse des Glukosestoffwechsels auf die Atherosklerose wurde im Folgenden auch eine Inkubation mit Exendin-4, einem GLP-1-Analogon, durchgeführt.

Die Stimulation mit Exendin-4 in einer Konzentration von 100 nM senkte die Expression der HAS 1 nach 6 Stunden signifikant (0,06450 \pm 0,05416 versus Kontrolle).

Nach 24-stündiger Stimulation deutete sich dieser Effekt noch an, stellte sich jedoch nicht mehr signifikant als dar.

Die mRNA-Niveaus der übrigen HAS-Isoenzyme zeigten sich unverändert.

Auch die quantifizierte HA im Medium stagnierte im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

Die Färbung der HA zeigte keine Veränderung in der Intensität des Signals, jedoch stellten sich vesikelförmige Strukturen dar, in der sich die HA anzureichern schien (Abbildung 3-16).



Abbildung 3-16: Stimulation mit Exendin-4 (100 nM).

A+B: Die Regulation der HAS-Isoenzyme im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. **A:** Stimulation für 6 h (n=4 bzw. n=6), **B:** Stimulation für 24 h (n=3-5). **C:** Hyaluronsäurekonzentration im Medium im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Messung nach 24-stündiger Stimulation (n=3).

Mittelwert ± SEM; ***: p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.

D+E: Färbung der HÅ und der Zellkerne nach 24-stündiger Stimulation (E) im Vergleich zur Kontrolle (D).

3.10. Migration/ Proliferation

Die Pathogenese der Atherosklerose geht mit einer Phänotyp-Veränderung der VSMC einher. Kontraktile VSMC transformieren zu synthetischen VSMC, die durch eine gesteigerte Migrations- und Proliferationsrate charakterisiert sind. Diese phänotypischen Veränderungen sind mit einem Anstieg der HA assoziiert. Für die meisten der in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen ist das Migrations- und Proliferationsverhalten nach Stimulation glatter Muskelzellen hinreichend untersucht. Daher wurde hier der Einfluss des Exendin-4 auf die (PDGF-BB stimulierte) Migration und Proliferation von VSMC über einen Zeitraum von 6 h (Migration) beziehungsweise 24 h (Proliferation) analysiert.

3.10.1. Migration

In der Boyden-Migrationskammer zeigten die glatten Muskelzellen einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der Migrationsrate in Richtung des Mediums mit Exendin-4 (100 nM). Die Migrationsfrequenz der PDGF-Stimulation wurde durch das Exendin-4 nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3-17).



Abbildung 3-17: Migrationsrate der glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Exendin-4 (100 nM) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle und die Effekte im Vergleich zur Positiv-Kontrolle PDGF-BB; n=6-7. Mittelwert ± SEM; ***: p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.

3.10.2. Proliferation

Die Proliferation der glatten Muskelzellen wurde durch das Inkretinmimetikum Exendin-4 nicht beeinflusst. Auch die Kombination von Exendin und dem proliferations-fördernden Stimulus PDGF zeigte vergleichbare Werte wie die Stimulation allein mit PDGF (siehe Abbildung 3-18).



Abbildung 3-18: Die Proliferation der VSMC nach Stimulation mit PDGF-BB und Exendin-4; n=6. Mittelwert ± SEM; ***: p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.

4. DISKUSSION

Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass HA im Fettgewebe diabetischer Mäuse akkumuliert und dort möglicherweise inflammatorische Prozesse fördert (Han, et al., 2007). Dies legt eine enge Assoziation zwischen dem Krankheitsbild des Diabetes Mellitus und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nahe.

Darüberhinaus ist bekannt, dass eine HA-Akkumulation verknüpft mit verstärkter Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt (Evanko, et al., 1999). In erodierten atherosklerotischen Plaques wurde außerdem eine HA- und Versikan-reiche EZM nachgewiesen (Kolodgie, et al., 2004).

Diabetes Mellitus und das sogenannte Metabolische Syndrom allgemein als Krankheitskombination aus Adipositas, Hypertonie und Fettstoffwechselstörung gelten als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose (Paoletti, et al., 2006). Der genaue Mechanismus von der Stoffwechselveränderung bis zur Auswirkung auf die Blutgefäße ist sicherlich noch nicht hinreichend aufgeklärt. Bekannt ist jedoch die endokrine Funktion des Fettgewebes. Zu den mehr als einhundert vom Fettgewebe produzierten, sogenannten Adipokinen, zählen unter anderem Interleukin 6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), und Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) (Fischer-Posovszky, et al., 2007).

Aus diesem Grund sollte der Einfluss des Metabolischen Syndroms auf das HA-System der glatten Muskelzellen untersucht werden, um somit mögliche Auswirkungen auf die Zusammensetzung der vaskulären EZM beurteilen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mediatoren und Substanzen, die mit dem Metabolischen Syndrom in Beziehung stehen (TNFα, IL-6, IGF-1, Leptin und Thromboxan), das HA-System in humanen glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen können. Hingegen scheinen andere Substanzen unter den sogenannten Adipokinen keinen Einfluss auf den HA-Metabolismus zu haben.

Für die auf das HA-System einwirkenden Mediatoren besteht somit die Möglichkeit, dass sie an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind und diese regulieren.

Nachfolgend werden die Substanzen und ihre Effekte auf den HA-Metabolismus der glatten Muskelzellen im Einzelnen betrachtet.

Die Untersuchung des Expressionsanteils der verschiedenen HAS-Isoenzyme an der Gesamtheit der Synthasen (siehe Abbildung 3-2) zeigt eindeutig, wie gering die HAS 1 im Vergleich zu den anderen beiden HAS-Isoenzymen exprimiert wird. Dies bedeutet einerseits, dass eine Veränderung der HAS 1-Expression womöglich ohne Einfluss auf die sezernierte HA bleibt. Andererseits erklärt dies aber auch, warum das Gen häufig so niedrig exprimiert wurde, dass es mittels Real Time-PCR zum Teil nicht detektiert werden konnte und somit keine Aussagen über Regulationen getroffen werden können.

4.1. TNFα als Hyaluronsäure-induzierendes Adipokin

Nach Stimulation mit TNF α steigt die ins Zellkulturmedium sezernierte HA-Menge signifikant an. Vergleichbar mit Rabausch B., 2008 konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dies vermutlich aus der Hochregulation der HAS 3v1-mRNA resultiert. Andere Arbeiten zeigten bereits die HA-Akkumulation nach Stimulation mit TNF α und IL-1 β auch in Fibroblasten (Butler, et al., 1988). An dieser Stelle wird nun der Zusammenhang zwischen Diabetes und Atherosklerose hergestellt. Während TNF α als inflammatorisches Zytokin im Stoffwechsel des Metabolischen Syndroms vermehrt im Fettgewebe produziert und sezerniert wird (Thalmann, et al., 2007), führt möglicherweise die Plasma-Spiegelerhöhung der Substanz an den glatten Muskelzellen zu einer Veränderung der EZM. Hierdurch könnte die Atheroskleroseentstehung begünstigt werden. Diese Hypothese wird außerdem gestützt durch die bekannte migrationsfördernde und pro-proliferative Wirkung von TNF α (Jovinge, et al., 1997), die ihrerseits ebenfalls zur Plaquebildung in der Atherosklerose beiträgt. Bei Betrachtung der mittels HAbP angefärbten HA fällt im Vergleich zur Kontrolle außerdem die Anreicherung der HA in vesikelförmigen Strukturen auf. Die in der Kontrolle vorkommenden haarähnlichen Strukturen waren nicht mehr nachweisbar. Dies stützt die Hypothese, dass die perizelluläre HA in das Kulturmedium sezerniert wurde und hier eine quantitative Erhöhung derselben auftritt.

Die in verschiedenen Arbeiten postulierte Kabel-Bildung der extrazellulären HA nach Stimulation mit TNFα in Keratinozyten (Jokela, et al., 2008) beziehungsweise durch HAS 3-Überexpression in Epithelzellen der Niere (Selbi, et al., 2006) konnten durch Versuche für die glatten Muskelzellen nicht bestätigt werden.

TNFα als inflammatorisches Zytokin, das vom entzündeten Fettgewebe bei Diabetes Mellitus vermehrt sezerniert wird, könnte somit lokal durch eine HA-Erhöhung zum proatherosklerotischen Milieu in arteriellen Blutgefäßen im Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms beizutragen.

4.2. IL-6 beeinflusst die Hyaluronsäure strukturell

Nachdem TNFα die HA-Menge im Medium durch Erhöhung der Expression der HAS 3v1 ansteigen lässt, könnte man vermuten, dies sei ein allgemeiner Effekt der vom Fettgewebe im Metabolischen Syndrom vermehrt produzierten Zytokine. Vor allem IL-6 gilt als wichtiges Zytokin im Stoffwechsel des Diabetes Mellitus, da die IL-6-Serumkonzentration noch stärker mit der Insulinresistenz korreliert, als dies bei TNFα der Fall ist (Kern, et al., 2001). Daher würde man hier im besonderen Maße einen Eingriff in die Atherosklerose-Entstehung und damit in die Pathogenese der mit Diabetes Mellitus assoziierten (Folge-) Erkrankungen erwarten. Auch für IL-6 konnte bereits im Vorfeld die positive Wirkung auf migratorische und proliferative Prozesse glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (Wang, et al., 2003), so dass eine Akkumulation der HA sehr nahe liegt. Nach Stimulation mit IL-6 in einer Konzentration von 10 ng/ml zeigt sich jedoch keinerlei Regulation des HA-Systems.

Die HA-Färbung zeigt jedoch eine Beeinflussung der HA-Strukturen durch Stimulation mit IL-6. Während die geringere Farbintensität der Fotografie eine Absenkung der HA-Menge andeutet, fallen die strangförmigen Strukturen ins Auge. Es handelt sich hierbei möglicherweise um sogenannte HA-Kabel, in denen sich HA zu verdichteten Strängen zusammenlagert. Diese HA-Kabel sind bisher für Keratinozyten nach Stimulation mit IL-1 β und TNF α beschrieben (Jokela, et al., 2008). Die Strangbildung geht in unseren Experimenten, wie bisher beschrieben, ebenfalls nicht mit einer quantitativen Veränderung der HAS-Expression oder der sezernierten HA einher. Vielmehr spielt hier die Funktion der Kabel die entscheidende Rolle. Die HA-Stränge dienen Monozyten als Adhäsionsgrundlage, erleichtern die Bindung an die Zelle und fördern so die Entzündungsreaktion (Jokela, et al., 2008).

Man gewinnt den Eindruck, dass das Zytokin IL-6 möglicherweise nicht durch eine quantitative Beeinflussung der HA-Synthese, wohl aber durch strukturelle Veränderungen der HA zur Entzündungsreaktion bei Diabetes Mellitus beitragen könnte.

4.3. Der Wachstumsfaktor IGF-1 stimuliert die Hyaluronsäure-Sekretion

Auch der Wachstumsfaktor IGF-1 wird im menschlichen Körper vom Fettgewebe produziert (Wabitsch, et al., 2000). Wissenschaftler der Universität Zürich konnten zeigen, dass die mRNA-Expression des IGF-1 im weißen Fettgewebe von Ratten nahezu so hoch ist wie im Lebergewebe der Tiere (Peter, et al., 1993). Weitergehend wurden erhöhte Serumspiegel des freien IGF-1 in adipösen Männern nachgewiesen (Nam, et al., 1997). Der Wachstumsfaktor wurde bereits auf seine induzierenden Effekte bezüglich der Migration und Proliferation hin untersucht (Bornfeldt, et al., 1994). Es sind auch weitere Mechanismen zur Förderung der Atheroskleroseentstehung bekannt (Bayes-Genis, et al., 2000). In diesem Zusammenhang erwartet man durch die

Stimulation mit IGF-1 auch eine Hochregulation des HA-Systems. Im Gegensatz zu einer anderen Veröffentlichung (Erikstrup, et al., 2001) konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die nach 24 Stunden ins Kulturmedium sezernierte HA durch Stimulation mit IGF-1 signifikant erhöht wird. Dieser Anstieg resultiert höchstwahrscheinlich aus der Hochregulation der HAS 2-mRNA ebenfalls nach 24 Stunden.

Die Differenz zur oben zitierten Arbeit folgt möglicherweise aus den Unterschieden der eingesetzten Substanz-Konzentrationen und aus den abweichenden Versuchsbedingungen.

An dieser Stelle sollte die Hochregulation der HAS 2-mRNA mechanistisch untersucht werden. Für andere Stoffe aus der Substanzklasse der Wachstumshormone, wie zum Beispiel für den von Thrombozyten sezernierten Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF), ist ebenfalls ein positiver Effekt auf das Expressionsniveau der HAS 2 nachgewiesen. Diese Regulation erfolgt im Falle des PDGF in humanen Hautfibroblasten zu einem großen Anteil über den Pi 3-Kinase-Signalweg (Li, et al., 2007). In Erwartung eines ähnlichen Effekts, ausgelöst durch IGF-1, wurden die Zellen zusätzlich zum IGF-1 mit einem Pi 3-Kinase-Inhibitor, dem LY294002, versetzt. Im Ergebnis zeigte sich eine deutliche Absenkung der Expression der HAS 2 unter Kontrollniveau. Dies spricht dafür, dass auch die konstitutive Expression der Synthase über den Pi 3-Kinase-Signalweg vermittelt wird. Im Einklang damit senkt der Inhibitor alleine die mRNA-Expression der HAS 2 noch weiter ab als in der Bedingung IGF-1 + LY294002. Somit scheint die von IGF-1 ausgelöste Aktivierung durch LY294002 nicht vollständig gehemmt, sondern zusätzlich noch über einen anderen Signalweg verschaltet zu werden. Infrage kommt hier zum Beispiel das Signalling über die MAPK/ERK (mitogen-aktivierte Protein Kinase/ extrazellulär-signal-regulierte Kinase), das auch für PDGF nachgewiesen ist (Li, et al., 2007).

Diese Theorie bestätigt sich auch bei der Betrachtung der HA-Färbung nach Stimulation. Nach Zugabe des IGF-1 lösen sich die haarähnlichen HA-Strukturen und es bilden sich vermehrt HA-gefüllte Vesikel. Dies spricht für eine Abstoßung der perizellulären HA ins Zellkulturmedium, wie sie mittels HAbP

61

auch detektierbar ist. Nach Stimulation mit IGF-1 und LY294002 verändert sich die Menge der HA nicht, LY294002 scheint also die IGF-getriggerte Sekretionserhöhung nicht vollständig zu unterbinden.

Erst bei Zugabe des Inhibitors alleine fällt die HA-Menge rapide ab. Auch die im Kontroll-Well konstitutiv produzierte HA ist bei Inkubation mit LY294002 nicht anfärbbar. Somit zeigt dies erneut, dass auch die konstitutive HAS-Aktivierung über den Pi 3-Kinase-Akt-Signalweg reguliert wird.

Es konnte nachgewiesen werden, dass IGF-1 als ein vom Fettgewebe produzierter Wachstumsfaktor neben den Einflüssen auf Migration und Proliferation außerdem Auswirkungen auf das HA-System der glatten Muskelzellen hat. Während die konstitutive HAS-Aktivierung anscheinend zum Teil über den Pi 3-Kinase-Signalweg verschaltet wird, erfolgt die IGF-1getriggerte Hochregulation der Gene möglicherweise zusätzlich noch über die MAPK/ERK (siehe Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Mögliche Signaltransduktion in VSMC. Die Aktivierung der HAS-Isoenzyme erfolgt konstitutiv über den Pi 3-Kinase-Signalweg. Durch die Stimulation mit IGF-1 werden zusätzlich andere Mechanismen aktiviert. Möglich ist zum Beispiel die Signaltransduktion via RAS- (Ratten-Sarkom), Raf-1-Protein (schnellwachsendes Fibrosarkom) und ERK.

4.4. Insulin zeigt unter diesen Versuchsbedingungen keine Effekte

Analog zu den starken Effekten bei der Stimulation mit IGF-1 würde man durch die Zugabe von Insulin ähnliche Auswirkungen auf das HA-System der glatten Muskelzellen erwarten, da sich die beiden Hormone strukturell sehr ähnlich sind. Sowohl der Insulin- als auch der IGF-1-Rezeptor zählen zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, unterscheiden sich jedoch von den anderen Rezeptoren der Familie durch ihre kovalenten, dimeren Strukturen. Rezeptoren und Liganden von Insulin und IGF-1 sind einander so ähnlich, dass die Hormone auch (mit geringerer Affinität) an den jeweils anderen Rezeptor binden können (De Meyts, et al., 2002).

Darüber hinaus steht Insulin als zentrales Hormon des Glukosestoffwechsels im Mittelpunkt des Diabetes Mellitus. Es beeinflusst neben der Glukoseaufnahme in die Zelle eine Reihe verschiedener Stoffwechsel-Mechanismen und hat somit einen wichtigen Einfluss auf das Gesamtkrankheitsbild des Metabolischen Syndroms. Bei Diabetes-Patienten liegen im Vergleich zum Gesunden erhöhte Insulinspiegel vor. Durch die den Diabetes Mellitus Typ II kennzeichnende Insulin-Resistenz der verschiedenen Gewebe sind außerdem die Blutglukosespiegel erhöht. Dies hat eine konsekutiv gesteigerte Insulinproduktion der Bauchspeicheldrüse mit daraus resultierenden erhöhten Insulinspiegeln im Blut zur Folge (Weidmann, et al., 1993). Diese erhöhten Insulinspiegel sind in der Lage, auf den Metabolismus der glatten Muskelzellen Einfluss zu nehmen.

Zur Insulinwirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen sind bisher zum Beispiel migratorische und proliferative Effekte bekannt, die Atherosklerose-fördernd wirksam werden können (Ruiz-Torres, et al., 2005). Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass die durch Insulin gesteigerte Migration durch Blockade des Insulin-Rezeptors nur in ausdifferenzierten VSMC inhibiert werden konnte, während in weniger differenzierten Zellen in der Wachstumsphase Insulin und IGF-1 bezüglich der Migration ihre Rezeptor-Spezifität verlieren.

Im Gegensatz hierzu unterscheidet sich die durch Insulin induzierte Proliferation nicht von dem durch IGF induzierten Wachstum. Aus diesem Grund könnte man Insulin vergleichbar mit IGF-1 als Wachstumsfaktor für die glatten Muskelzellen bezeichnen (Ruiz-Torres, et al., 2005).

Im Zusammenhang der Pathogenese der Atherosklerose erwarteten wir somit eine HA-steigernde Wirkung durch Stimulation mit Insulin.

In der Literatur sind bereits ähnliche Versuche zur Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen mit Insulin und den Effekten auf das HA-System beschrieben. Hierin wird eine Absenkung der HA nach Insulinzugabe zu glatten Muskelzellen geschildert (Erikstrup, et al., 2001).

In den von uns durchgeführten Experimenten zeigen sich jedoch keine Veränderungen des HA-Systems der glatten Muskelzellen. Selbst durch eine Dosiserhöhung von 100 auf 1000 ng/ml weichen weder die HAS-Expression, noch die Menge der ins Medium sezernierten HA im Vergleich zur Kontrolle ab. Auch die HA-Färbung nach Zugabe von 1000 ng/ml Insulin zeigt im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle quantitativ keine Unterschiede oder besondere HA-Strukturen.

Diese im Vergleich zur Literatur variierenden Ergebnisse können auf unterschiedlichen Versuchsabläufen und Insulin-Dosierungen beruhen. Einen weiteren Faktor stellt möglicherweise die Tatsache dar, dass die VSMC in den aktuellen Versuchen dauerhaft in Medium mit hoher Glukosekonzentration kultiviert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich Insulin und der Insulin-like-growth-factor-1 trotz vieler paralleler Effekte der beiden Hormone in Bezug auf die Effekte auf die HA-Matrix unterscheiden. Als Gründe hierfür sind möglicherweise die unterschiedlichen Affinitäten zu den Rezeptoren zu nennen. Im Gegensatz zu dem ihm sehr ähnlichen IGF-1, scheint Insulin keinen Einfluss auf das HA-System VSMC zu nehmen.

4.5. Angiotensin II zeigt keinen Einfluss auf das Hyaluronsäure - System der VSMC

Die den Blutdruck regulierende Substanz Angiotensin II gehört zu den Adipokinen, die während inflammatorischer Prozesse im Rahmen des Metabolischen Syndroms vom Fettgewebe vermehrt produziert werden. In Adipozyten fettleibiger Patienten liegt eine erhöhte mRNA des Angiontensinogens vor, das nach Umwandlung durch das ACE (Angitensinogen-Converting-Enzyme) mit gesteigerten Ang II-Serumspiegeln einhergeht (Van Harmelen, et al., 2000). Für Ang II sind bisher pro-proliferative und auch migrationsfördernde Effekte an glatten Muskelzellen nachgewiesen (Kohno, et al., 2000). Aus diesen Gründen heraus vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen dem Ang II-Spiegel im Blut und der Atherosklerose-Diese könnte nach unseren theoretischen Überlegungen Entstehung. möglicherweise mit einer Erhöhung des HA-Gehalts im Kultur-Medium der mit Ang II stimulierten glatten Muskelzellen einhergehen. Die Menge der sezernierten HA ändert sich jedoch entgegen unserer Erwartungen auch durch eine Dosiserhöhung nicht.

Dies lässt sich in Korrelation setzen zu der mRNA-Expression der Hyaluronsäure-Synthasen. Diese verändert sich nicht, abgesehen vom Expressionsniveau der HAS 1 nach 6 Stunden. Die Herabregulation hat jedoch aufgrund der geringen sekretorischen Aktivität der HAS 1 auf die Gesamt-HA-Menge keine Auswirkung (siehe Abbildung 3-1).

Diese Ergebnisse werden auch in der Fluoreszenzfärbung bestätigt: Man erkennt weder eine quantitative Veränderung der HA, noch sind die extrazellulären HA-Strukturen differenziert im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Ang II in anderen als den von uns eingesetzten Konzentrationen oder noch längeren Stimulationszeiten eine Auswirkung auf das HA-System an glatten Muskelzellen hat.

65

4.6. Leptin verändert die Struktur der Hyaluronsäure

Auch die Stimulation der glatten Muskelzellen mit Leptin verändert den HA-Gehalt des Kulturmediums nicht signifikant. Das vom Fettgewebe sezernierte Proteohormon reguliert den Energiehaushalt und die Nahrungsaufnahme. Die Sekretionsrate des Leptin aus dem Fettgewebe korreliert positiv mit der Adipozytengröße und der Fettleibigkeit des Patienten. Somit liegen im Krankheitsgefüge des Metabolischen Syndroms erhöhte Leptinspiegel im Blut vor (Gustafson, et al., 2007). Parallel hierzu wird eine zentrale Leptinresistenz diskutiert (Enriori, et al., 2006). Verschiedene Studien konnten bisher eine proatherogene Wirkung des Leptin beschreiben. Diese zeigt sich unter anderem in der Induktion einer Endothel-Dysfunktion und der Auslösung von oxidativem Stress. Des Weiteren wurden in Zellkulturexperimenten fördernde Effekte des Leptin auf die Migration und auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen (Beltowski, 2006). Im Zusammenhang dieser proatherogenen Wirkungen erwarteten wir auch eine Erhöhung der HA-Menge. Bisherige Studien konnten nach Inkubation mit Leptin einen Anstieg der HA-Produktion in Fibroblasten verbunden mit einer Hochregulation der HAS 2 zeigen (Ezure, et al., 2007). In der hier vorliegenden Arbeit stellt sich die HA-Sekretion der glatten Muskelzellen nach Stimulation jedoch nur leicht, nicht signifikant erhöht dar. Durch eine Konzentrationsänderung würde man möglicherweise auch in den Gefäßmuskelzellen statistisch relevante Effekte erzielen.

Bei Betrachtung der gefärbten HA fallen viele haarförmige HA-Stränge auf. Möglicherweise entsprechen diese den Vorstufen zu den bereits oben angesprochenen HA-Kabeln, die in inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Jokela, et al., 2008).

Leptin scheint als sogenanntes Adipokin in der von uns eingesetzten Konzentration keine quantitative Beeinflussung des HA-Systems zu bewirken, sondern könnte durch strukturelle Veränderungen der HA an der Entstehung der Atherosklerose durch Förderung inflammatorischer Prozesse beteiligt sein.

4.7. Adiponectin senkt die HAS 2-mRNA-Expression

Adiponectin gilt in Hinblick auf die Regulation der Nahrungsaufnahme als hormoneller Gegenspieler des Leptin. Im Gegensatz zu den übrigen Adipokinen sind Fettleibigkeit, Diabetes Mellitus Typ II, kardiovaskuläre Erkrankungen und das Metabolische Syndrom assoziiert mit erniedrigten Adiponectin-Serumspiegeln (Matsuzawa, et al., 2004).

Allgemein sind somit Stoffwechsel- und Gefäß-protektive Wirkungen des Adiponectin nachgewiesen.

Neben einem positiven Effekt auf die Insulin-Sensitivität (Yamauchi, et al., 2001) sind außerdem antiatherosklerotische Eigenschaften des Hormons erwiesen. Diese äußern sich unter anderem in einer Herabregulation der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, in einer Reduktion der inflammatorischen Antwort in Gefäßen (Goldstein, et al., 2004) und in einer Inhibition der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Arita, et al., 2002).

Ausgehend von diesen Überlegungen erwarteten wir bei erhöhten Adiponectin-Spiegeln auch eine negative Regulation des HA-Systems in den glatten Muskelzellen. Für die HA-Produktion in humanen Haut-Fibroblasten ist hingegen ein Anstieg durch Hochregulation der HAS 2 nach Stimulation mit Adiponectin nachgewiesen (Ezure, et al., 2007).

Die Versuchsergebnisse bestätigen die Erwartungen bezüglich einer Herabregulation des HA-Systems. Auffällig ist, dass es sich bei den ausgelösten Regulationen jedoch nur um kurzfristige Effekte zu handeln scheint. In beiden Konzentrationen wird die mRNA-Expression der HAS 2 nach 6-stündiger Stimulation mit Adiponectin signifikant abgesenkt. Diese Regulation ist nach 24 Stunden aufgehoben, weshalb sich vermutlich auch keine quantitativen Veränderungen der sezernierten HA messen lassen. Dieses Ergebnis findet man auch in der HA-Färbung wieder. Es sind keine quantitativen oder strukturellen Veränderungen der HA im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle sichtbar. Adiponectin als vom Fettgewebe produziertes Hormon scheint kurzfristige HAreduzierende Eigenschaften zu besitzen und hat daher bei vermehrter Produktion möglicherweise positive und damit hemmende Effekte auf die Atheroskleroseentstehung. Andererseits könnten bei verminderter Adiponectin-Produktion im Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms die protektiven Effekte wegfallen und so die Atherosklerose gefördert werden.

4.8. Thromboxan beeinflusst das Hyaluronsäure-System auf verschiedene Arten

Die Stimulation der VSMC mit TXA₂, einem Analogon des Thromboxan, simuliert ebenfalls einen Aspekt der diabetischen Stoffwechsellage im menschlichen Körper. Das atherothrombotische Risiko ist bei Typ 2-Diabetikern deutlich erhöht. Dies erklären verschiedene Autoren unter anderem mit einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren auf Thrombozytenoberflächen sowie durch die deutlich gesteigerte Produktion von Thromboxan und Thrombin, die beide die Aggregation der Blutplättchen fördern (Natarajan, et al., 2008).

Aus diesem Grund wurde nun überprüft, ob Thromboxan das HA-System der glatten Muskelzellen zu beeinflussen vermag.

Es zeigte sich, dass die nach 24 Stunden sezernierte HA-Menge nach Inkubation mit TXA₂ signifikant abfällt. Dies lässt sich in Bezug setzen zur deutlichen Reduktion der HAS 3v1 mRNA nach 6 Stunden. Die fehlende Veränderung der HAS 3v1 nach 24 Stunden lässt sich möglicherweise mit einer Gegenregulation der Genexpression zum zweiten Messzeitpunkt erklären, während das Protein in so kurzer Zeit noch nicht nachproduziert werden konnte. Zur Hochregulation der HAS 1-mRNA nach 24 Stunden findet sich in der HA-Quantifizierung aus dem Nährmedium kein Korrelat. Dies lässt sich möglicherweise durch die anteilsmäßig sehr geringe Expression der HAS 1 an der Gesamtexpression der Synthasen erklären (siehe Abbildung 3-1). Frühere Studien konnten zeigen, dass durch die Stimulation mit TXA₂ der Phänotyp der glatten Muskelzellen verändert werden kann. Es sind stimulierende Effekte auf Migration und Proliferation beschrieben worden (Pakala, et al., 1997). Entsprechend würden wir einen HA-steigernden Einfluss des TXA₂ erwarten, der sich in unseren Experimenten jedoch nicht bestätigte. Bei der Betrachtung der HA-Färbung ist auch keine quantitative Veränderung der HA ersichtlich. Auffällig sind jedoch auch nach Stimulation mit TXA₂ die vermehrten HA-Kabel. Diese erleichtern das Anheften von Monozyten und fördern so inflammatorische Prozesse. Es ist außerdem nachgewiesen, dass die Kabel-Bildung auch mit einer Reduktion der Gesamt-HA einhergehen kann (Jokela, et al., 2008). Die Theorie der HAS 3-Erhöhung oder -Überexpression bei Kabel-Bildung kann durch die hier vorliegende Herabregulation widerlegt

werden (Selbi, et al., 2006).

Die Reduzierung der sezernierten HA spricht zunächst nicht für eine proatherosklerotische Wirkung. Die von der HA gebildeten Kabel-Strukturen hingegen fördern vermutlich die Inflammation. Somit könnten erhöhte Thromboxanspiegel bei Diabetes Mellitus durch HA-Kabel-Bildung sowie durch die Induktion von Migration und Proliferation einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung haben.

4.9. Exendin-4 ohne Einfluss auf das Hyaluronsäure-System von VSMC

Exenatide (entspricht Exendin-4) wird seit 2007 als neuer Arzneistoff in der Therapie des Diabetes Mellitus eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein Analogon des GLP-1 und wirkt unter anderem über eine glukose-abhängige Insulinsekretion. Im Gegensatz zu anderen oralen Antidiabetika senkt es daher den Blutzuckerspiegel mit einer nur geringen Gefahr der Hypoglykämie (Barnett, 2007).

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war nun, ob durch Einsatz dieses neuen Medikaments die HA-Matrixsynthese und der Phänotyp von VSMC beeinflusst wird. Dies wurde einerseits auf Ebene des HA-Systems, andererseits durch Beobachtung des Migrations- und Proliferationsverhaltens der glatten Muskelzellen nach Stimulation mit Exendin-4 überprüft.

Nach Stimulation mit Exendin-4 änderte sich die HA-Konzentration im Kulturmedium im Vergleich zur Kontrolle nicht. Das nach 6 Stunden deutlich reduzierte Expressionsniveau der HAS 1 korreliert mit dem insgesamt sehr geringen Expressionslevel dieser Synthase (siehe Abbildung 3-1) und hat somit keine Auswirkungen.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der HA-Färbung wieder. Für die vesikelförmigen Strukturen findet sich im Gegensatz zur Stimulation mit IGF-1 und TNF α kein Korrelat.

Zusätzlich zur HA-Bestimmung im Medium und zur Messung des HAS-Expressionsniveaus wurden für den Arzneistoff Exendin-4 Migrations- und Proliferationsexperimente durchgeführt.

Diese ergaben keine messbaren Effekte durch die Stimulation. Da in atherosklerotisch veränderten Gefäßen die HA-Menge mit einer phänotypischen Veränderung der VSMC assoziiert ist (Turley, et al., 2002), war dieser Ausgang der Versuche zu erwarten.

Die Herabregulation der HAS 1-mRNA hat wie oben beschrieben keinen Einfluss auf die Gesamt-HA-Menge und somit wird dadurch auch das Migrations- und Proliferationsverhalten nicht maßgeblich reguliert.

Die von uns eingesetzte Konzentration des Arzneimittels Exendin-4 scheint keinen Einfluss auf das HA-System bzw. auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der glatten Muskelzellen zu nehmen.

Regulatorische Effekte auf die Atheroskleroseentstehung allgemein können an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden.

70

4.10. Zusammenfassung der regulatorischen Effekte auf das Hyaluronsäure-System der VSMC und deren Relevanz für die Atherosklerose

Das univakuoläre, weiße Fettgewebe wurde lange Zeit unterschätzt und auf seine Funktion als Energiereservoir reduziert. Als endokrines Organ ist es in der Lage, durch Produktion verschiedener Mediatoren Einfluss zu nehmen auf das HA-System der glatten Gefäßmuskelzellen und auf diese Weise an der Entstehung der Atherosklerose als pathogener Faktor mitzuwirken.

Die Versuche bestätigen die Vermutung, dass durch verschiedene Mediatoren des Metabolischen Syndroms, darunter vom entzündeten Fettgewebe produzierte Substanzen, aber auch Regulatoren der Blutgerinnung, das HA-System der glatten Muskelzellen beeinflussen.

Während für TNFα und IGF-1 HA-steigernde Effekte zu beobachten sind, ergibt sich nach Zugabe von TXA₂ eine deutliche Erniedrigung der sezernierten HA. Nach Stimulationen mit IL-6, Leptin und TXA₂ stehen hingegen keine quantitativen, sondern eher strukturelle Veränderungen der HA im Vordergrund. Die nachgewiesenen Kabelstrukturen sind möglicherweise ebenfalls in der Lage, inflammatorische Prozesse in der Atherosklerose zu fördern.

Der Arzneistoff Exenatide, die Hormone Adiponectin, Insulin und Angiotensin II scheinen in den von uns eingesetzten Konzentrationen keinen oder nur kurzfristigen Einfluss auf das HA-System der glatten Muskelzellen zu besitzen. Durch diese Arbeit wird ein weiterer Aspekt aufgeklärt, auf welchem Weg das Metabolische Syndrom als Risikofaktor der Atheroskleroseentstehung an Bedeutung gewinnt. Die Regulation des HA-Systems der glatten Muskelzellen stellt sicherlich einen wichtigen Anteil an der Gesamtpathogenese dar.

Die Versuche haben gezeigt, dass einzelne Substanzen allein bereits Effekte bewirken. Im Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms findet sich jedoch ein Zusammenspiel vieler Faktoren, die möglicherweise potenzierte Wirkungen erzielen. Eine kombinierte Stimulation der VSMC sollte daher sicherlich in einer der nächsten Experimentreihen folgen, um den wichtigen Einfluss des Metabolischen Syndroms auf das HA-System der glatten Muskelzellen und damit auf die Atheroskleroseentstehung im Zusammenspiel der Faktoren zu untersuchen.



Abbildung 4-2: Schema zur quantitativen Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems durch in der Arbeit besprochene Mediatoren.


Abbildung 4-3: Schema zur qualitativen Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems durch in der Arbeit besprochene Mediatoren mit Beispielbildern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hyaluronsäure (HA) als einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix ist an wichtigen Prozessen in der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt, wie zum Beispiel bei Entzündungen und phänotypischen Veränderungen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Produziert wird die HA durch drei membranständige HA-Synthasen HAS 1-3. Bisher sind jedoch die spezifischen Funktionen der HAS-Isoenzyme in der Atheroskleroseprogression nicht bekannt.

Einer der wichtigsten Risikofaktoren zur Entstehung der Atherosklerose ist das Metabolische Syndrom. Dieses ist assoziiert mit der Produktion verschiedener Mediatoren aus dem Fettgewebe, das hier gesteigerte endokrine Funktionen besitzt. Nach dem Nachweis von HA-Akkumulation im Fettgewebe diabetischer Mäuse war das Ziel dieser Arbeit. zu untersuchen. ob die Stoffwechselveränderungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms über eine Regulation des HA-Systems von VSMC an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind.

Unsere Versuche ergaben differenzielle Regulationen des HA-Systems durch Stimulation mit den verschiedenen Substanzen: Während für TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α) und IGF-1 (insulin-like-growth-factor-1) HA-steigernde Effekte zu beobachten sind, ergibt sich nach Zugabe von TXA₂ (Thromboxan A₂) eine deutliche Erniedrigung der sezernierten HA. Nach Stimulationen mit IL-6 (Interleukin-6), Leptin und TXA₂ stehen hingegen keine quantitativen, sondern strukturelle Veränderungen der HA im Vordergrund. Der Arzneistoff Exenatide und die Hormone Adiponectin, Insulin und Angiotensin II scheinen in den von uns eingesetzten Konzentrationen keinen oder nur kurzfristigen Einfluss auf das HA-System der glatten Muskelzellen zu besitzen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Fettgewebe als endokrines Organ in der Lage ist, Einfluss zu nehmen auf das HA-System von VSMC.

6. SUMMARY

Hyaluronan (HA) as one of the main components of the extracellular matrix is thought to be involved in key aspects of atherogenesis such as inflammation and phenotypic control of vascular smooth muscle cells (VSMC). HA is synthesized by three HA-synthases (HAS 1-3), which likely have different functions during the progression of atherosclerosis.

One of the most important atherosclerotic risk factors is the Metabolic Syndrom. It is associated with the production of several mediators from the adipose tissue which have systemic effects and contribute to insulin resistance. After detection of HA accumulated in adipose tissue from diabetic mice, our intention was to investigate whether these endocrine factors that are dysregulated in the Metabolic Syndrom are able to affect the HA-system of VSMC which could have an impact on the progression of atherosclerosis.

We could show different effects after stimulation: Whereas TNF α and IGF-1 increase HA-secretion in VSMC, addition of TXA₂ lowered HA. In contrast to that, after stimulation with IL-6, Leptin and TXA₂ structural changes of HA were detected. The drug exenatide and the hormons adiponectin, insulin and angiotensin II have no or only a transient effect on the HA-system of VSMC.

Taken together, the present results suggest that the adipose tissue release factors that quantitatively and qualitatively affect the HA-system of VSMC, which will likely affect the function of this matrix with regard to support of inflammation and proliferation.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensinogen-Converting-Enzyme
Ang II	Angiotensin II
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium,
	standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
cpm	counts per minute, radioaktive Ereignisse pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS (auch FCS)	fetal bovine serum, fötales Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GLP 1	Glucagon-like-peptide 1
GLP 1-Rezeptor	Glucagon-like-peptide 1-Rezeptor
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
IGF	insulin-like-growth-factor
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
LDL	Low density lipoprotein
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
n.d.	nicht detektierbar
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte
	Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Rattensarkom
Raf	Fibrosarkom
RNA, RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean, Standartfehler
SMC	smooth muscle cells, glatte Muskelzellen
ΤΝFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	Units, Einheit der Enzymaktivität
VSMC	vascular smooth muscle cells, glatte
	Gefäßmuskelzellen

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Arita, Kihara, Ouchi, Maeda, Kuriyama, Okamoto, Kumada, Hotta, Nishida, Takahashi, Nakamura, Shimomura, Muraguchi, Ohmoto, Funahashi and Matsuzawa (2002): Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factorbb-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. Circulation. <u>105</u>, 2893-2898.
- 2. Barnett (2007): Exenatide. Expert Opin Pharmacother. 8, 2593-2608.
- 3. Bayes-Genis, Conover and Schwartz (2000): The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. Circ Res. <u>86</u>, 125-130.
- 4. Beltowski (2006): Leptin and atherosclerosis. Atherosclerosis. <u>189</u>, 47-60.
- 5. Bornfeldt, Raines, Nakano, Graves, Krebs and Ross (1994): Insulin-like growth factor-i and platelet-derived growth factor-bb induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. J Clin Invest. <u>93</u>, 1266-1274.
- 6. Butler, Vitti, Leizer and Hamilton (1988): Stimulation of the hyaluronic acid levels of human synovial fibroblasts by recombinant human tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta (lymphotoxin), interleukin-1 alpha, and interleukin-1 beta. Arthritis Rheum. <u>31</u>, 1281-1289.
- 7. Camenisch, Spicer, Brehm-Gibson, Biesterfeldt, Augustine, Calabro, Kubalak, Klewer and McDonald (2000): Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. <u>106</u>, 349-360.
- Conley, Koleva, Smith, Kacer, Zhang, Bernabeu and Vary (2004): Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: Function of the cytosolic domain. J Biol Chem. <u>279</u>, 27440-27449.
- 9. Csoka, Frost and Stern (2001): The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol. <u>20</u>, 499-508.
- 10. Davies and Thomas (1985): Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J. <u>53</u>, 363-373.
- 11. De Meyts and Whittaker (2002): Structural biology of insulin and igf1 receptors: Implications for drug design. Nat Rev Drug Discov. <u>1</u>, 769-783.
- 12. Enriori, Evans, Sinnayah and Cowley (2006): Leptin resistance and obesity. Obesity (Silver Spring). <u>14 Suppl 5</u>, 254S-258S.
- 13. Erikstrup, Pedersen, Heickendorff, Ledet and Rasmussen (2001): Production of hyaluronan and chondroitin sulphate proteoglycans from human arterial smooth muscle--the effect of glucose, insulin, igf-i or growth hormone. Eur J Endocrinol. <u>145</u>, 193-198.
- 14. Evanko, Angello and Wight (1999): Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. <u>19</u>, 1004-1013.

- 15. Ezure and Amano (2007): Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. Biofactors. <u>31</u>, 229-236.
- 16. Fischer-Posovszky, Wabitsch and Hochberg (2007): Endocrinology of adipose tissue an update. Horm Metab Res. <u>39</u>, 314-321.
- 17. Fraser, Laurent and Laurent (1997): Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med. <u>242</u>, 27-33.
- 18. Goldstein and Scalia (2004): Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. J Clin Endocrinol Metab. <u>89</u>, 2563-2568.
- 19. Gustafson, Hammarstedt, Andersson and Smith (2007): Inflamed adipose tissue: A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. <u>27</u>, 2276-2283.
- 20. Han, Subramanian, Chan, Omer, Chiba, Wight and Chait (2007): Adipocyte-derived serum amyloid a3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. Diabetes. <u>56</u>, 2260-2273.
- Itano, Sawai, Yoshida, Lenas, Yamada, Imagawa, Shinomura, Hamaguchi, Yoshida, Ohnuki, Miyauchi, Spicer, McDonald and Kimata (1999): Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. J Biol Chem. <u>274</u>, 25085-25092.
- Jokela, Lindgren, Rilla, Maytin, Hascall, Tammi and Tammi (2008): Induction of hyaluronan cables and monocyte adherence in epidermal keratinocytes. Connect Tissue Res. <u>49</u>, 115-119.
- Jovinge, Hultgardh-Nilsson, Regnstrom and Nilsson (1997): Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. Arterioscler Thromb Vasc Biol. <u>17</u>, 490-497.
- 24. Katsuda and Kaji (2003): Atherosclerosis and extracellular matrix. J Atheroscler Thromb. <u>10</u>, 267-274.
- Kern, Ranganathan, Li, Wood and Ranganathan (2001): Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. <u>280</u>, E745-751.
- Kohno, Ohmori, Nozaki, Mizushige, Yasunari, Kano, Minami and Yoshikawa (2000): Effects of valsartan on angiotensin ii-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. Hypertens Res. <u>23</u>, 677-681.
- Kolodgie, Burke, Wight and Virmani (2004): The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: A role in coronary thrombosis in the absence of rupture. Curr Opin Lipidol. <u>15</u>, 575-582.
- 28. Lee and Spicer (2000): Hyaluronan: A multifunctional, megadalton, stealth molecule. Curr Opin Cell Biol. <u>12</u>, 581-586.
- 29. Lesley, Hyman and Kincade (1993): Cd44 and its interaction with extracellular matrix. Adv Immunol. <u>54</u>, 271-335.
- Li, Asteriou, Bernert, Heldin and Heldin (2007): Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: Importance of hyaluronan for the mitogenic response of pdgf-bb. Biochem J. <u>404</u>, 327-336.

- Loppnow, Werdan and Buerke (2008): Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. Innate Immun. <u>14</u>, 63-87.
- 32. Matsuzawa, Funahashi, Kihara and Shimomura (2004): Adiponectin and metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol. <u>24</u>, 29-33.
- 33. Monslow, Williams, Norton, Guy, Price, Coleman, Williams, Buckland, Spicer, Topley, Davies and Bowen (2003): The human hyaluronan synthase genes: Genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers. Int J Biochem Cell Biol. <u>35</u>, 1272-1283.
- Nam, Lee, Kim, Cha, Song, Lim, Lee and Huh (1997): Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (igf)-1, and their relationship to igf-binding protein (bp)-1, igfbp-2, igfbp-3, insulin, and growth hormone. Int J Obes Relat Metab Disord. <u>21</u>, 355-359.
- 35. Natarajan, Zaman and Marshall (2008): Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: Role of antiplatelet agents. Diab Vasc Dis Res. <u>5</u>, 138-144.
- Pakala, Willerson and Benedict (1997): Effect of serotonin, thromboxane a2, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. Circulation. <u>96</u>, 2280-2286.
- 37. Paoletti, Bolego, Poli and Cignarella (2006): Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. Vasc Health Risk Manag. <u>2</u>, 145-152.
- 38. Peter, Winterhalter, Boni-Schnetzler, Froesch and Zapf (1993): Regulation of insulin-like growth factor-i (igf-i) and igf-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. Endocrinology. <u>133</u>, 2624-2631.
- 39. Prehm (1984): Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochem J. <u>220</u>, 597-600.
- 40. Rabausch, Berit (2008): Aktivierung von humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch Hyaluronsäure-Synthase 3: Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose. Inauguraldissertation.
- 41. Ross (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 340, 115-126.
- 42. Ruiz-Torres, Lozano, Melon and Carraro (2005): On how insulin may influence ageing and become atherogenic throughout the insulin-like growth factor-1 receptor pathway: In vitro studies with human vascular smooth muscle cells. Gerontology. <u>51</u>, 225-230.
- 43. Selbi, de la Motte, Hascall, Day, Bowen and Phillips (2006): Characterization of hyaluronan cable structure and function in renal proximal tubular epithelial cells. Kidney Int. <u>70</u>, 1287-1295.
- 44. Slevin, Kumar and Gaffney (2002): Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. J Biol Chem. <u>277</u>, 41046-41059.
- 45. Statistisches Bundesamt Deutschland: http://www.destatis.de, letzter Zugriff: Dezember 2011

- 46. Stern, Asari and Sugahara (2006): Hyaluronan fragments: An information-rich system. Eur J Cell Biol. <u>85</u>, 699-715.
- Sussmann, Sarbia, Meyer-Kirchrath, Nusing, Schror and Fischer (2004): Induction of hyaluronic acid synthase 2 (has2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. Circ Res. <u>94</u>, 592-600.
- 48. Thalmann and Meier (2007): Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. Cardiovasc Res. <u>75</u>, 690-701.
- 49. Toole (2004): Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. Nat Rev Cancer. <u>4</u>, 528-539.
- 50. Toole and Hascall (2002): Hyaluronan and tumor growth. Am J Pathol. 161, 745-747.
- 51. Turley, Noble and Bourguignon (2002): Signaling properties of hyaluronan receptors. J Biol Chem. <u>277</u>, 4589-4592.
- 52. Twarock, Rock, Sarbia, Weber, Janicke and Fischer (2009): Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-camp pathway. Br J Pharmacol. <u>157</u>, 234-243.
- 53. Van Harmelen, Ariapart, Hoffstedt, Lundkvist, Bringman and Arner (2000): Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. Obes Res. <u>8</u>, 337-341.
- 54. Wabitsch, Heinze, Debatin and Blum (2000): Igf-i- and igfbp-3-expression in cultured human preadipocytes and adipocytes. Horm Metab Res. <u>32</u>, 555-559.
- 55. Wang and Newman (2003): Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. J Surg Res. <u>111</u>, 261-266.
- 56. Weidmann, de Courten and Bohlen (1993): Insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertension. J Hypertens Suppl. <u>11</u>, S27-38.
- 57. Yamauchi, Kamon, Waki, Terauchi, Kubota, Hara, Mori, Ide, Murakami, Tsuboyama-Kasaoka, Ezaki, Akanuma, Gavrilova, Vinson, Reitman, Kagechika, Shudo, Yoda, Nakano, Tobe, Nagai, Kimura, Tomita, Froguel and Kadowaki (2001): The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med. <u>7</u>, 941-946.
- 58. Zou and Shao (2008): Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. J Nutr Biochem. <u>19</u>, 277-286.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf im Juni 2012

Martina Rosen

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens Fischer danke ich herzlich für Vergabe des äußerst interessanten Themas und für die engagierte und allzeit motivierende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör, als ehemaligem Institutsleiter, danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die Organisation des Institutslebens.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für das nette Laborklima und die immer währende Hilfsbereitschaft bedanken, alle haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Besonderer Dank gilt Katharina Röck für die umfassende Hilfe und freundschaftliche Betreuung von der Versuchsplanung bis zum Schreiben der Arbeit.

Ich danke Peggy Marra-Mann für die großzügige Unterstützung in der Zellkultur und Annika Zimmermann für die Organisation des Laboralltags.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Marlene, die mich immer unterstützt haben.

Besonders danke ich meinem lieben Freund Thomas Kunze für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine Geduld, sowie für zahlreiche tröstende und so manches aufmunternde Wort zur richtigen Zeit. Danke!

11. Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name:	Martina Rosen
Geburtsdaten:	25.06.1986 in Mönchengladbach
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung	
1992-1996:	Gemeinschaftsgrundschule Jüchen
1996-2005:	Städtisches Gymnasium Odenkirchen, Abitur
<u>Studium</u>	
2005 bis 2010:	Medizinstudium an der HHU Düsseldorf
2010 bis 2011	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Grevenbroich,
	Lehrkrankenhaus der RWTH Aachen
September 2007:	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2011:	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Berufliche Tätigkeit	
seit Januar 2012	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik des
	Kreiskrankenhauses Grevenbroich
Promotion	
Februar-November 2008	Wissenschaftliche Tätigkeit im Institut für Pharmakologie
	und Klinische Pharmakologie der Heinrich- Heine-
	Universität Düsseldorf

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Rosen M; Roeck K; Fischer J.W. (2009): Insulin like growth factor and tumor necrosis factor alpha induce hyaluronan synthesis in human vascular smooth muscle cells. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. <u>379</u>, 57.

Düsseldorf, Juni 2012