

**Untersuchungen zur Regulation und Funktion der
Hyaluronsäuresynthase-2 an humanen glatten Gefäßmuskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Melanie Sussmann

aus Dinslaken

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. W. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 25.1.2005

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Extrazelluläre Matrix (EZM).....	8
1.2 Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan der EZM	9
1.3 Bedeutung der Hyaluronsäure in der Tumorprogression	12
1.4 Atherosklerose und pro-atherosklerotische Wirkungen der Hyaluronsäure	13
1.5 Prostaglandinwirkungen und Atherosklerose	15
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Chemikalien und Lösungen.....	20
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen	21
2.2.2 Stimulationsversuche	21
2.3 Transfektion glatter Muskelzellen mit siRNA	22
2.4 Bestimmung der mRNA-Expression	24
2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen	24
2.4.2 Quantifizierung der Gesamt-RNA	24
2.4.3 Semiquantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	24
2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	26
2.4.5 <i>Real-Time</i> RT-PCR	26
2.4.5.1 cDNA-Synthese	26
2.4.5.2 <i>Real-Time</i> RT-PCR	27
2.5 DNA-Mikroarray.....	28
2.5.1 Übersicht.....	28
2.5.2 Ethanol-Präzipitation.....	29
2.5.3 cDNA-Synthese	29
2.5.4 Aufreinigung der RNA mittels Genechip Sample Cleanup-Module (Affymetrix 900371)	30
2.5.5 Synthese von Biotin-markierter cRNA (in-vitro Transkription)	30
2.5.6 cRNA-Fragmentierung	31
2.5.7 Hybridisierung, Waschen und Scannen der Arrays	31
2.5.8 Expressionsanalyse	31

2.6 Quantifizierungen der sezernierten Hyaluronsäure	32
2.6.1 Bestimmung der Hyaluronsäure im Zellkulturüberstand	32
2.6.2 Nachweis der perizellulären Hyaluronsäure	32
2.7 Morphometrische Analyse humaner glatter Muskelzellen.....	33
2.8 Immunfluoreszenz.....	33
2.9 Western-Blot-Analyse.....	34
2.9.1 Lyse der hVSMC	34
2.9.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	34
2.9.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot-Analyse.	34
2. 9. 4 Proteinbestimmung	36
2.10 Radioimmunologische Bestimmung von 6-Keto-PGF _{1α}	36
2.11 Bestimmung der Migration mittels einer modifizierten Boyden-Kammer	36
2.12 Messung der DNA-Neusynthese mittels [³ H]-Thymidin-Inkorporation.....	37
2.13 Ermittlung der Zellproliferation.....	37
2.14 Immunhistologische Untersuchungen humaner atherosklerotischer	38
Läsionen.....	38
2.15 Statistik	39
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Regulation der HAS2-mRNA durch Iloprost	40
3.2 Induktionen der Hyaluronsäuresynthese in humanen glatten Muskelzellen.....	43
3.2.1 Perizelluläre Akkumulation der Hyaluronsäure	43
3.2.2 Quantifizierung der Hyaluronsäure	44
3.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion der HAS2-/HA-Induktion	46
3.3.1 Identifizierung der verantwortlichen Rezeptoren.....	46
3.3.2 Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion.....	49
3.4 Regulation von HAS2 durch endogene Prostaglandine	50
3.5 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen atherosklerotischen Läsionen.....	52
3.6 Reduktion der HA-Synthese in humanen glatten Muskelzellen mittels RNA- Interferenz (RNAi).....	54
3.7 Untersuchungen zur Funktion von HAS2 in humanen VSMCs.....	55
3.7.1 Einfluss auf die Zellmorphologie	55
3.7.2 Veränderungen im Zytoskelett	57

3.7.3 Auswirkungen auf die Zellmigration.....	58
3.7.4 Analyse der Zellproliferation	60
3.8 Untersuchungen zu möglichen Mechanismen des HAS2-vermittelten Phänotyps von hVSMC	63
3.8.1 Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK).....	64
3.8.2 P_{b} -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion.....	65
3.8.3 HAS2-abhängige Veränderung der Genexpression.....	67
4 Diskussion	73
4.1 Regulation der HA-Synthese durch vasodilatierende Prostaglan- dine in hVSMC	73
4.2 Die Bedeutung von HAS2 für die Regulation des glattmuskulären Phänotyps	78
4.2.1 Morphologie.....	78
4.2.2 Migration	79
4.2.3 Zellproliferation.....	81
4.2.4 P_{b} -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion.....	83
4.2.5 Genexpression.....	84
4.3 Die Bedeutung der Prostaglandin-vermittelten HA-Induktion für die Atherosklerose	88
5 Zusammenfassung	92
6 Literaturverzeichnis.....	94

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylat-Zyklase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
CREM	cAMP-resonsive element modulator
Ct	cycle threshold
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Fokaler Adhäsionskomplex
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-Ethansulfonsäure
hVSMC	humane vaskuläre glatte Muskelzellen
αI	Inter-α-Trypsin-Inhibitor
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
kDa	kilo Dalton

mM	Millimolar (mmol/l)
μM	Mikromolar (μmol/l)
mRNA	messenger RNA
nM	Nanomolar (nmol/l)
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF-BB	Platelet derived growth factor, B-Kettenhomodimer
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostazyklin
PI ₃ -Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RHAMM	receptor of HA-mediated motility
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvenylidene Difluoride Membran
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Na ⁺ -Dodecylsulfat
S	Seite
siRNA	small-interfering RNA
TE	Trypsin-/EDTA
TEMED	N,N,N', N' -Tetramethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tsg-6	tumor necrosis factor α -stimulated gene 6
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

Abbildungsverzeichnis

- 1) Schematische Darstellung der HA-Synthese, der Proteininteraktionen und der Aktivierung der Rezeptoren CD44 und RHAMM (S. 10).
- 2) Schematische Darstellung der Signaltransduktion des transmembranären PGI₂-Rezeptors (IP) und der transmembranären PGE₂-Rezeptoren (EP₁-EP₄) (S. 17).
- 3) Schematische Darstellung der DNA-Microarray-Analyse (S. 28).
- 4) Induktion der HAS2-mRNA durch Iloprost in hVSMC (S. 40).
- 5) Originalaufzeichnung der Produktamplifizierung von *HAS2* in hVSMC mittels *Real-Time* RT-PCR (S. 41).
- 6) Konzentrationsabhängigkeit der HAS2-Induktion (S. 42).
- 7) Induktion der perizellulären HA durch Iloprost in VSMC (S. 44).
- 8) Induktion der HA-Akkumulation in VSMC (S. 45).
- 9) Die Iloprost-abhängige HAS2-Induktion wird über den IP -Rezeptor vermittelt (S. 46).
- 10) PGE₂-abhängige Induktion von HAS2 über den EP₂-Rezeptor (S. 48).
- 11) cAMP-abhängige Regulation von HA in VSMC (S. 49).
- 12) Die basale HAS2-Expression ist abhängig von endogenen Prostaglandinen (S. 51).
- 13) Kollokalisierung von HA und COX2 in humanen atherosklerotischen Läsionen (S. 52).
- 14) Verteilung von HA, dem EP₂-Rezeptor und hVSMC in atherosklerotischen Läsionen (S. 53).
- 15) Inhibierung der Iloprost-induzierten HAS2-Expression und HA-Synthese (S. 55).
- 16) HAS2-siRNA verstärkt die Zellausbreitung in hVSMC (S. 56).
- 17) Effekt von HAS2-siRNA auf FA und die Ausbildung von Aktin-Stressfasern (S. 58).
- 18) HAS2-siRNA-vermittelte Reduktion der Migration in hVSMC (S. 59).
- 19) HAS2-siRNA bewirkt eine Verminderung der Zellzahl in hVSMC (S. 61).
- 20) Reduktion der DNA-Neusynthese durch HAS2-siRNA in hVSMC (S. 62).
- 21) Reduktion der Cyclin D₁-Proteinkonzentration durch HAS2-siRNA (S. 63).
- 22) Induktion einer FAK-Dephosphorylierung durch HAS2-siRNA (S. 64).
- 23) Inhibierung der P_lK/Akt-abhängigen Signaltransduktion durch HAS2-siRNA (S. 66).

-
- 24) Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Abhängigkeit von HAS2-siRNA (S. 67).
- 25) cAMP-/PKA-/CREB-abhängige Induktion der HAS2-mRNA (S. 75).
- 26) Schematische Darstellung der HAS2-siRNA-medierten Veränderungen auf den glattmuskulären Phänotyp (S. 87).

1 Einleitung

1.1 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix (EZM) repräsentiert ein komplex angeordnetes Geflecht verschiedener Makromoleküle, die entweder Komponenten der perizellulären Matrix oder der Basalmembranen sind, oder im Interstitium lokalisiert sind. Ein wesentlicher Bestandteil sind die Kollagenfibrillen, die aus unterschiedlichen Kollagentypen (z.B. Typ I, Typ III, Typ V, Typ VI) zusammengesetzt sind. Die Kollagene können über Bindung an Integrine, eine intrazelluläre Signaltransduktion über den „Fokalen Adhäsionskomplex“ (FA) auslösen und eine Interaktion der EZM mit dem Aktin-Zytoskelett vermitteln und so die Zellmigration und –proliferation sowie das Überleben der Zellen beeinflussen (Aplin et al., 1998). Die EZM enthält weiterhin Elastinfasern (Fibrillin, Elastin und Emilin), die der EZM Elastizität verleihen.

Ferner enthält die EZM eine heterogene Gruppe aus Glykoproteinen, die verschiedene Funktionen ausüben können. Fibronectin oder Tenascin z.B. können als Adhäsionsproteine fungieren und den Zell-Matrix- bzw. den Matrix-Matrix-Kontakt vermitteln. Andere Glykoproteine wie z.B. Laminin sind Komponenten der Basalmembranen und ebenfalls Liganden an Integrinrezeptoren. Eine weitere Gruppe der EZM-Moleküle bilden eine stark hydratisierte, gelartige „Grundsubstanz“, in der die Kollagenfibrillen und die Elastinfasern eingebettet sind. Diese Gruppe wird aus Glykosaminoglykanen (GAGs) und Proteoglykanen gebildet. GAGs werden je nach Zucker, Art ihrer Verbindung und der Zahl und Position der Sulfatgruppen in 4 verschiedene Klassen unterteilt (1. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, 2. Heparansulfat und Heparin, 3. Keratansulfat und 4. Hyaluronsäure). Im Gegensatz zu den anderen GAGs, die zunächst immer gebunden an Kernproteine und somit als Proteoglykane vorliegen, besteht die Hyaluronsäure lediglich aus einer unsulfatierten Polysaccharidkette. Proteoglykane, wie Versikan, Decorin oder Biglykan enthalten stark sulfatierte GAGs.

EZM-Moleküle erfüllen aufgrund ihrer komplexen Struktur und Anordnung verschiedene Aufgaben. Zahlreiche Wechselwirkungen im Extrazellulärraum führen zu Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur und tragen somit zur Modulation von diversen Zellfunktionen bei. Zusätzlich zu den oben genannten Mechanismen können EZM-Moleküle mit verschiedenen Wachstumsfaktoren interagieren sowie

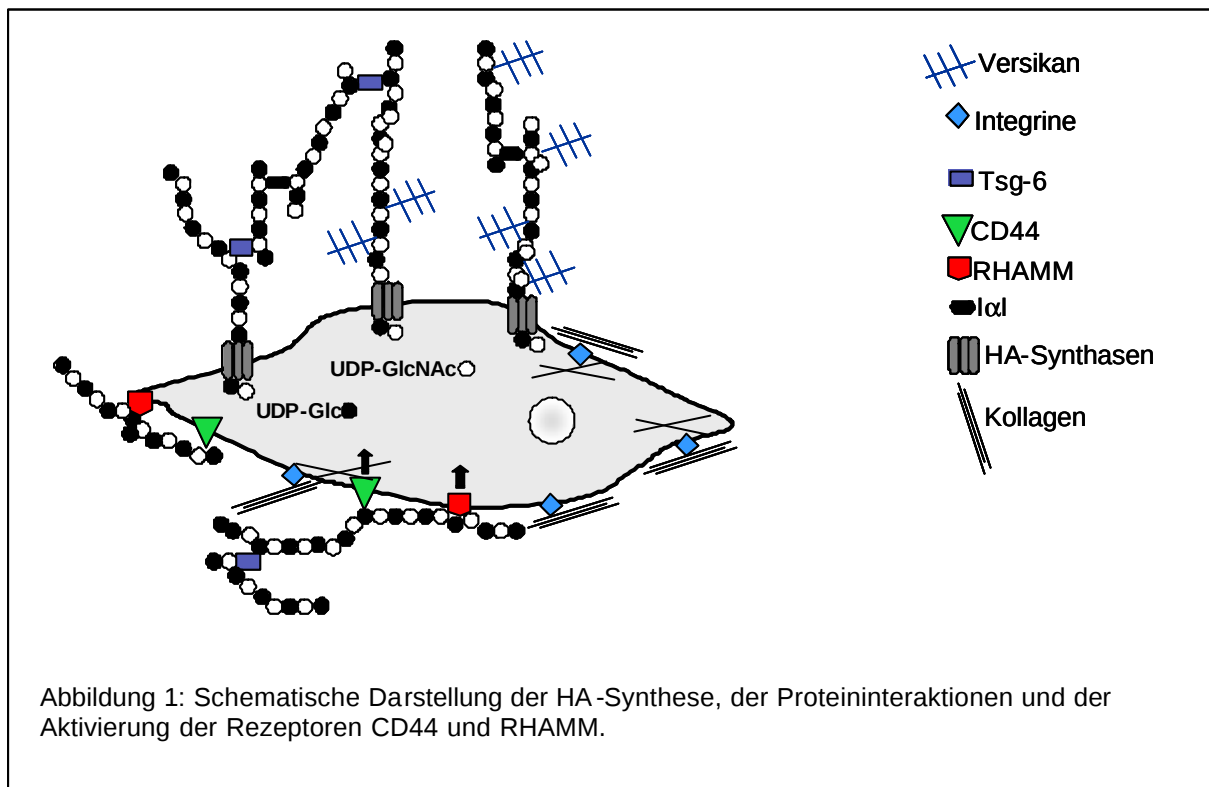
durch proteolytische Spaltung in Fragmente mit neuen biologischen Funktionen umgesetzt werden.

1.2 Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan der EZM

Die Hyaluronsäure (HA), ein GAG der EZM, ist ein hochmolekulares Polysaccharid aus β -1,3-verknüpfter D-Glukuronsäure und β -1,4-verknüpften N-Acetylglukosamin. Die Synthese erfolgt durch drei membranständige HA-Synthasen (HAS1, HAS2, HAS3), die auf der Membranninnenseite die Verknüpfung aktivierter Zuckermoleküle katalysieren und anschließend das Polysaccharid in die EZM extrudieren (Philipson and Schwartz 1984). Die HAS-Isoformen weisen unterschiedliche enzymatische Aktivitäten und Funktionen auf (Spicer and McDonald, 1998). HAS1 und HAS2 synthetisieren hochmolekulare HA, mit einem Molekulargewicht von ca. 2×10^6 Da. Dabei hat HAS2 im Vergleich zu HAS1 eine höhere enzymatische Aktivität. HAS3, die eine sehr hohe intrinsische Aktivität besitzt, synthetisiert niedermolekulare HA, mit einem Molekulargewicht von ca. 1×10^5 - 1×10^6 Da (Itano et al., 1999b). HA kann in Abhängigkeit vom Molekulargewicht verschiedene Funktionen erfüllen. Niedermolekulare HA, fördert die Zellproliferation, die Angiogenese und inflammatorische Reaktionen. Dagegen zeigt hochmolekulare HA anti-proliferative Eigenschaften (West and Kumar, 1989).

Untersuchungen der Organogenese von HAS^{-/-}-Mäusen zeigten unterschiedliche Funktionen der einzelnen Isoformen. Dabei wiesen HAS2-defiziente Mäuse während der Embryogenese eine Fehlentwicklung der Gefäße und eine Hemmung der Herzmorphogenese auf. Diese kardiale Fehlentwicklung führte zum Absterben der Embryonen. Im Gegensatz dazu, ist die HAS1- bzw. die HAS3-Defizienz nicht embryonal letal (Camenisch et al., 2000). Neben funktionellen Unterschieden konnte auch eine differentielle Genexpression der einzelnen HA-Synthasen gezeigt werden. In Mesothelzellen induzierte PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB) die Expression von HAS2 während TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) die HAS2-mRNA herunterregulierte. Die Expression von HAS1 und HAS3 hingegen wurde nur marginal reguliert (Jacobson et al., 2000). In Keratinozyten bewirkte EGF (epidermal growth factor) eine Transkripterhöhung von HAS2 im Vergleich zu HAS1 und HAS3 (Pienemäki et al., 2001).

HA bindet sich überwiegend an die membranständigen Rezeptoren CD44 und RHAMM (receptor of HA mediated motility) und aktiviert so verschiedene intrazelluläre Signalwege (Abbildung 1). Die Interaktion von HA mit dem Transmembranrezeptor CD44 kann die Zell-Matrix-Adhäsion regulieren und ist involviert in der Proliferation, Migration und Angiogenese verschiedener Zelltypen (Bourguignon et al., 1992; Bourguignon et al., 1998; Lesley et al., 1993).



Durch die Interaktion von HA mit CD44 kann die Tyrosinkinase c-Src an die Membran rekrutiert werden und durch Phosphorylierung Cortactin, ein Protein des Zytoskeletts aktivieren (Bourguignon et al., 1999). Desweiteren können durch die Bindung von HA an CD44 die GTPasen RhoA und Rac1 aktiviert werden, die ihrerseits den Aufbau des Zytoskeletts und dessen Funktion steuern (Bretscher, 1999; Oliferenko et al., 2000).

Zusätzlich bindet CD44 an Ankyrin, ein Verbindungsprotein des Zytoskeletts (Lokeshwar et al., 1996) und an Proteine der ERM-Familie (ezrin/radixin/moesin) (Bourguignon et al., 2000), wodurch eine direkte Signalvermittlung von HA im Extrazellulärraum zum Zytoskelett entsteht. Dieser CD44-medierte Mechanismus ist

vergleichbar mit der Integrin-medierte Signalübermittlung von Kollagenfasern zum Zytoskelett und dem FA.

Die Interaktion von HA mit CD44 kann weiterhin den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) /Akt-abhängigen Signalweg aktivieren (Kamikura et al., 2000) und dadurch zelluläre Prozesse wie die Zellbewegung, Proliferation oder die Apoptose regulieren.

RHAMM, der wie CD44 als Zelloberflächenrezeptor HA binden kann, ist nicht nur in der Zellmembran verankert, sondern ist auch im Zytoplasma lokalisiert und kann im Nukleus nachgewiesen werden. Die Interaktion von HA mit RHAMM kann z.B. die Signaltransduktion der Tyrosinkinase c-Src (Hall et al., 1996) und die der Serin/Threonin-Kinasen-Erk1/2 (Lokeshwar and Selzer, 2000) modulieren. Die Aktivierung von RHAMM reguliert außerdem die Bildung und den Abbau von fokalen Adhäsionspunkten, vermittelt durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Hall et al., 1994). Zusätzlich erfolgt abhängig von der RHAMM-HA-Interaktion eine Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Paxillin, einem Protein des FA (Lokeshwar and Selzer, 2000). Weiterhin ist RHAMM an der Ras-abhängigen Zelltransformation und Zellzyklus-Progression beteiligt (Mohapatra et al., 1996). Darin ist hauptsächlich membranständiger und zytoplasmatischer RHAMM involviert (Turley et al., 2002). Untersuchungen des Aktinzytoskeletts und der Mikrotubuli der mitotischen Spindel, zeigten eine Kollokalisierung mit intrazellulärem RHAMM (Assmann et al., 1999).

Neben der HA-abhängigen Rezeptoraktivierung werden die Funktionen von HA auch durch die Interaktion mit EZM-Proteinen, den Hyaladhärienen vermittelt (Abbildung 1). Zu dieser Gruppe gehören Versikan, Inter- α -Trypsin-Inhibitor ($\alpha 1$ I) und Tsg-6 (tumor necrosis factor stimulated gene 6) (Day and Prestwich, 2002). Die HA-bindenden Proteine Tsg-6 und $\alpha 1$ I fungieren als Adaptoren, die die einzelnen HA-Stränge kovalent miteinander verknüpfen. Das Proteoglykan Versikan bindet sich über das „Link Protein“ an die HA-Stränge und ermöglicht die Ausbildung eines vernetzten perizellulären HA-„Mantels“, der die Zelle wie eine Hülle umschließt. Die perizelluläre HA-abhängige Matrix besitzt anti-adhäsive Eigenschaften, wodurch die Abrundung der mitotischen Zelle während der Teilung und die Zellbewegung gefördert werden, sowie die Zellgestalt beeinflusst wird.

1.3 Bedeutung der Hyaluronsäure in der Tumorprogression

Die Entstehung eines Tumors kann durch unterschiedliche Faktoren bewirkt werden. Einhergehend mit dem Verlust der genomischen Stabilität und der Zellzykluskontrolle, verlieren die Zellen die Eigenschaft zur Differenzierung. Die Fehlregulation der Proliferation kann zu einer unkontrollierten Zellteilung führen, mit anschließender invasiver und infiltrierender Migration der Tumorzellen in abgegrenzte Gefäße oder Organe. Metastasierende Zellen, die diese Eigenschaften aufweisen, induzieren gleichzeitig die Apoptose der angrenzenden „gesunden“ Zellen. Gleichzeitig kann die molekulare Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren eine irreversible Aktivierung von Signalwegen bewirken, die das Zellwachstum enthemmen (Felsner et al., 2004).

HA ist auch in die Prozesse, die zur Tumorprogression führen, involviert (Knudson and Hino, 1997). HA-Akkumulation wird mit verschiedenen Tumorarten, wie z.B. Darmkrebs (Ropponen et al., 1997), Lungenkrebs (Horai et al., 1991), Brustkrebs oder mit der Gliomentwicklung (Delpech et al., 1993) assoziiert. In unterschiedlichen Tumorzelllinien führt eine verstärkte HA-Synthese, vermittelt durch die Überexpression der verschiedenen HA-Synthasen, zu verstärktem Tumorwachstum (Kosaki et al., 1999), verstärkter Invasivität (Zoltan-Jones et al., 2003) und einer Aktivierung der Metastasierung (Itano et al., 1999a). Die Überexpression von HAS2 kann in Krebszellen eine Zunahme der Zellteilung, des invasiven Wachstums und die Transformation der Zellen herbeiführen (Itano et al., 1999a; Zoltan-Jones et al., 2003). Untersuchungen von Brust- bzw. Darmkrebszelllinien zeigten, dass durch die Inhibierung der Interaktion von HA und CD44 die Proliferation, sowie das diffuse und invasive Zellwachstum reduziert werden konnte (Merzak et al., 1994; Toole, 2002). Die Unterbrechung der CD44-Aktivierung führt *in vivo* und *in vitro* (Toole, 2002) durch Zellzyklusarrest zur Inhibierung des Tumorzellwachstums, oder zur Induktion der Apoptose. Die Inhibierung der P_{β} -Kinase/Akt-abhängigen Signaltransduktion vermittelt die Inhibierung des malignen Phänotyps, der durch die Interaktion von HA mit CD44 entsteht (Kamikura et al., 2000; Sohara et al., 2001). Die Aktivierung der Rho-Kinase durch HA-CD44-Interaktion, bewirkt über eine Aktivierung der P_{β} -Kinase/Akt-abhängigen Signaltransduktion (Bourguignon et al., 2003), die Stimulation des invasiven Wachstums, die unkontrollierte Zellteilung, sowie durch

eine verstärkte Produktion des Zytokins M-CSF (makrophage-colony-stimulating factor), die Progression von Brustkrebs.

Zusätzlich kann HA durch die Bindung an RHAMM Ras-abhängiges Tumorwachstum, die Migration von Tumorzellen und die Invasivität induzieren.

HA kann demnach durch Interaktion mit CD44 oder RHAMM zelluläre Signalwege aktivieren, die zur Entstehung eines malignen Phänotyps führen.

1.4 Atherosklerose und pro-atherosklerotische Wirkungen der Hyaluronsäure

Die Atherosklerose, eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwand, ist ähnlich wie die Tumorprogression, mit einer Differenzierung verschiedener Zelltypen verbunden, sowie mit Proliferation und Migration von VSMC (vaskuläre glatte Muskelzellen). HA ist durch die Förderung der Proliferation und Migration von VSMC auch mit der Atherosklerose assoziiert.

Lokale Risikofaktoren, wie turbulente Flussbedingungen an Gefäßverzweigungen, oder systemische Risikofaktoren (Ross, 1999), wie ein erhöhter Cholesterolspiegel im Plasma, Diabetes, Übergewicht oder ein erhöhter Blutdruck (Lefkowitz and Willerson, 2001) fördern die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion, welche den ersten Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose darstellt und die Entwicklung der Erkrankungen des arteriellen Systems wie z.B. Angina pectoris, Myokardinfarkte, Schlaganfälle und die periphere Verschlusskrankheit initiiert. Die gesunde arterielle Gefäßwand besteht aus 3 verschiedenen Zellschichten. Die äußere Schicht wird durch die Adventitia, die aus Fibroblasten besteht, gebildet. Darauf folgt die Media aus mehreren Schichten VSMC und die innen liegende Schicht aus Endothelzellen. Die innen liegende Gefäßschicht, das Endothel reguliert den Gefäßtonus durch die Produktion von vasoprotektiven Molekülen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂). NO und PGI₂ hemmen außerdem die Plättchenadhäsion und -aggregation. Ein gesundes Endothel hemmt weiterhin die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand. VSMC der Media weisen einen ruhenden, kontraktilen Phänotyp auf, mit einer sehr geringen Proliferation- und Migrationsneigung. Durch die endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer erhöhten Endothelpermeabilität, zur Abnahme der NO- und PGI₂-Produktion und zur Expression von

Adhäsionsmolekülen, die die Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand vermitteln. Die Leukozyten und Monozyten, welche das Endothel durchdringen, differenzieren zu Makrophagen und wandeln sich anschließend durch Akkumulation von „low density lipoprotein“ (LDL) und oxidiertem LDL zu Schaumzellen um, die große Mengen an Zytokinen und Chemokinen produzieren. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen induziert eine Dedifferenzierung der VSMC in der Media in einen „synthetischen“ Phänotyp, mit hoher proliferativer und migratorischer Aktivität, sowie einer verstärkten Synthese von EZM (Campbell et al., 1988; Owens et al., 1995). Während der Gefäßveränderung erfolgt die Synthese neuer EZM-Moleküle (z.B. Proteoglykane und HA) und Integrin-Rezeptoren ($\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine). Infolge der veränderten EZM entstehen neue Ligand-EZM-Rezeptor Interaktionen, die die Migration und Proliferation induzieren, sowie die Wirkungen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen verstärken. Die VSMCs migrieren aus der Media in die darüber gelegene Intima, der, durch die gesteigerte Matrix-Synthese und der induzierten Proliferation weitere Gefäßschichten, die Neointima, aufgelagert werden. Die Bildung der Neointima im Gefäßinneren kann zu einer Stenose (Gefäßverengung) führen. Weiterhin können atherosklerotische Läsionen thrombotische Gefäßverschlüsse auslösen. Gefäßstenosen können mit der Angioplastie beseitigt werden, in der die verengten Gefäße durch einen Ballonkatheter dilatiert werden. Infolge dieser Dilatation kann es zu einer Überdehnung und Verletzung im jeweiligen Bereich kommen, mit anschließender Adhäsion von Thrombozyten. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kann erneut die Proliferation und Migration von VSMCs fördern, die Bildung einer Neointima induzieren und den Wiederverschluss des Gefäßes bewirken (Restenose).

In atherosklerotischen Läsionen nach Gefäßschädigung, oder in restenotischen Gefäßen konnte eine starke HA-Akkumulation im Bereich der Neointima nachgewiesen werden (Papakonstantinou et al., 1998). Während der Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion findet sich HA, assoziiert mit aktiv proliferierenden und migrierenden VSMC (Riessen et al., 1996). PDGF-BB, ein pro-atherogener Wachstumsfaktor und Interleukine, die in atherosklerotischen Läsionen von Makrophagen und später von Schaumzellen sezerniert werden, induzieren in VSMC die HA-Synthese (Evanko et al., 1999). Zusätzlich wird die Expression von Versikan,

CD44 und Tsg-6, die direkte Interaktionsproteine von HA darstellen, bei der Proliferation von VSMC induziert. Während der Stimulation der Migration und Proliferation akkumuliert Versikan in der perizellulären Matrix von VSMC. HA-Oligosaccharide können hochmolekulare HA von CD44 und RHAMM verdrängen und auf diese Weise die Bildung der perizellulären Matrix sowie die PDGF-BB-induzierte Proliferation von VSMC hemmen (Evanko et al., 1999). Desweiteren wurde eine starke Akkumulation von HA, Versikan und CD44 in humanen Koronararterien im Grenzbereich der Neointima atherosklerotischer Plaques und Thromben nachgewiesen (Kolodgie et al., 2002). Diese Befunde legen eine pro-thrombotische Wirkung der HA- und Versikan-reichen Matrix nahe.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass der HA-Rezeptor CD44 auch von Thrombozyten exprimiert wird und möglicherweise die Adhäsion von Thrombozyten an HA-reiche EZM fördert. (Matrosova et al., 2004). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass CD44 die Adhäsion von T-Lymphozyten an das Endothel und an VSMC (Lazaar et al., 1994) über HA-Strukturen der EZM vermittelt. Untersuchungen atherosklerotischer Läsionen zeigten, dass CD44 verstärkt exprimiert war, wohingegen eine Reduktion der Atherosklerose in CD44-defizienten Mäusen erreicht werden konnte (Cuff et al., 2001). Zusätzlich wurde von Cuff und Mitarbeitern gezeigt, dass CD44 die Migration von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen ApoE-defizienter Mäuse vermittelt (Cuff et al., 2001). Eine Infektion durch Viren oder die Stimulation mit PolyI:C (polyinosinic acid:polycytidylic acid) bewirkt die CD44-vermittelte Adhäsion von Makrophagen an „kabelartige“ HA-Strukturen der EZM von SMC (de La Motte et al., 1999; de la Motte et al., 2003).

Die verschiedenen pro-atherosklerotischen Wirkungen der HA umfassen die Förderung von Migration und Proliferation von VSMC sowie möglicherweise die Adhäsion von Thrombozyten und die Adhäsion und Retention inflammatorischer Zellen, wie Makrophagen und Lymphozyten.

1.5 Prostaglandinwirkungen und Atherosklerose

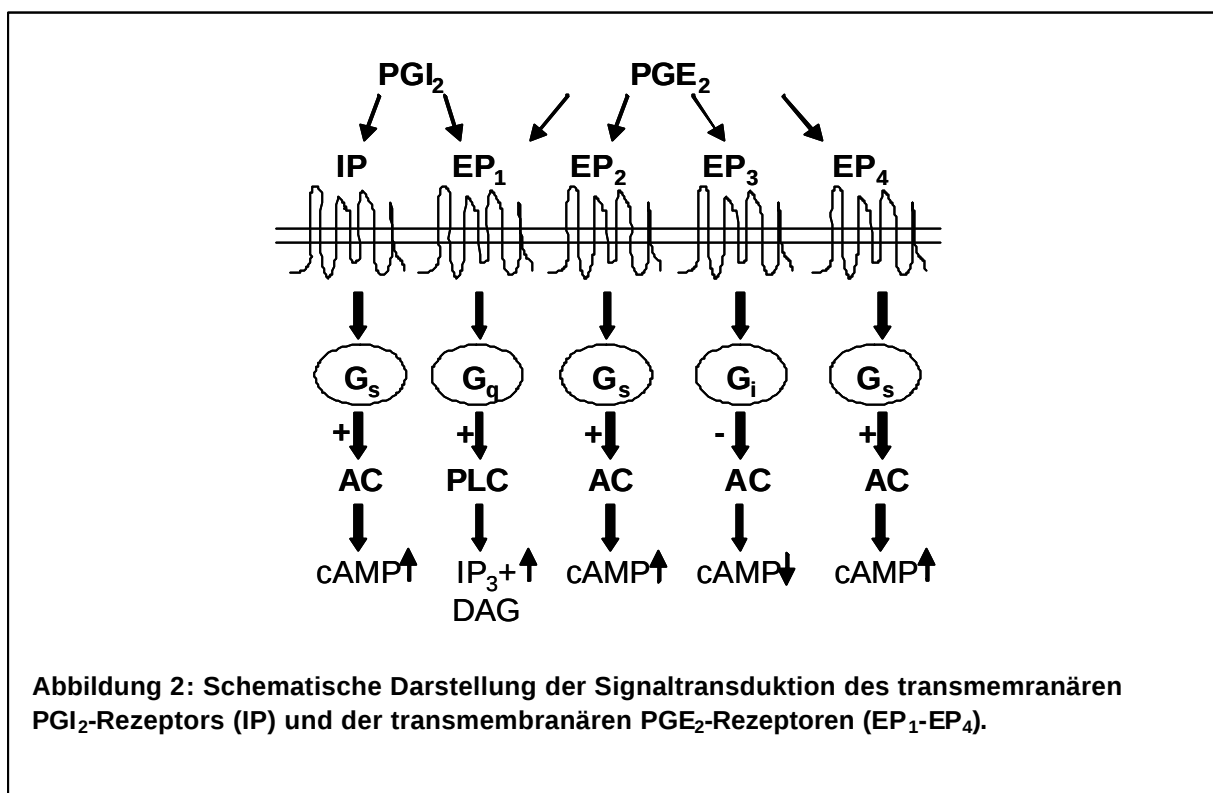
Prostaglandine, wie das Prostazyklin (PGI_2) und das Prostaglandin E_2 (PGE_2), oder Thromboxan A_2 (TXA_2) sind Lipidmediatoren und Mitglieder der Eikosanoide

(Moncada et al., 1976). Die Generierung der Prostaglandine aus der Arachidonsäure, erfolgt sequentiell durch verschiedene Enzyme. Die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Prostaglandinsynthese sind die Cyclooxygenasen, die in 2 Isoformen vorkommen (COX1 und COX2). COX1 ist konstitutiv exprimiert und reguliert in den meisten Geweben die Prostaglandinsynthese unter physiologischen Bedingungen. Die von COX1 synthetisierten Prostaglandine fördern u. a. die Bildung des Magenschleims und die Magendurchblutung und wirken magenprotektiv. PGI_2 und PGE_2 wirken vasodilatierend. PGI_2 ist ein starker Hemmstoff der Thrombozytenaggregation und –adhäsion. Neuere Untersuchungen aus dem eigenen Labor zeigten, dass PGI_2 und in geringerem Maße auch PGE_2 die Proliferation und Migration von hVSMC durch eine Hemmung der Phosphorylierung von FAK hemmen (Bulin et al., 2004). Aufgrund der voranstehend beschriebenen Wirkungen wird besonders PGI_2 als gefäßprotektiver und anti-atherosklerotischer Faktor angesehen. COX2 ist die induzierbare COX-Isoform und wird während der Atherosklerose durch zahlreiche Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren in Endothelzellen, VSMC und Makrophagen atherosklerotischer Läsionen heraufreguliert (Schönbeck et al., 1999). Die Aktivität von COX1 und COX2 werden durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wie z.B. Aspirin gehemmt. Dagegen wurden auch die COX2-spezifische Inhibitoren, Etoricoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Lumiracoxib entwickelt.

PGI_2 wird überwiegend im Endothel und in VSMC von Blutgefäßen (Smith et al 1986) mittels der membranständigen Prostazyklin-Synthase (PGIS) (Pereira et al., 1994) aus Prostaglandin H_2 (PGH_2) synthetisiert. Die Wirkungen von PGI_2 umfassen die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation (Weiss and Turitto; 1979), die Dilatierung glatter Gefäße (Moncada et al., 1976), sowie die Inhibierung der Proliferation und Migration von VSMC (Weber et al., 1998; Bulin et al., 2004). Die physiologischen Wirkungen von PGI_2 werden über den PGI_2 -Rezeptor (IP-Rezeptor) vermittelt (Coleman et al., 1994), der auf Thrombozyten und VSMCs (Town et al., 1982) nachgewiesen werden konnte. Bei niedrigen, physiologischen PGI_2 -Konzentrationen koppelt der IP-Rezeptor an stimulatorische G-Proteine (G_s), wodurch die Adenylat-Zyklase (Abbildung 2) aktiviert und verstärkt intrazelluläres cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) generiert wird, wodurch die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird. Hohe PGI_2 -Konzentrationen hingegen (Schrör and Verheggen, 1988) können über Gq-gekoppelte Proteine eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) vermitteln

(Schwaner et al., 1992). PLC katalysiert durch Spaltung die Produktion von IP_3 (Inositol-1,4,5-Triphosphat) und DAG (Diacylglycerol). Anschließend aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) und IP_3 bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

PGE_2 besitzt wie PGI_2 vasodilatierende, anti-migratorische und –proliferative Eigenschaften (Wong et al., 2001) in VSMC. Zusätzlich ist PGE_2 in inflammatorische Prozesse involviert und fungiert als Schmerzmediator. Die Prostaglandin E-Synthase (PGES), die sowohl Membran-assoziiert als auch im Cytosol vorkommt (Ogorochi et al., 1987), katalysiert die Synthese von Prostaglandin H_2 zu PGE_2 .



Die Klassifizierung der unterschiedlichen PGE_2 -Rezeptoren erfolgt in 4 Subtypen (EP_1 - EP_4), die sich in ihrer Funktion und Ligandenspezifität unterscheiden. EP_2 und EP_4 koppeln an G_s -Proteine, mit nachfolgender Aktivierung der Adenylat-Zyklase und Zunahme des cAMP-Spiegel in der Zelle (Narumiya et al., 1999). EP_1 aktiviert durch G_q -Proteine PLC und induziert somit einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Bindung von PGE_2 an den G_i -gekoppelten EP_3 -Rezeptor bewirkt die Hemmung der Adenylat-Zyklase und führt zur Reduktion der cAMP-Konzentration.

Bei der Progression der Atherosklerose wird COX2 verstärkt exprimiert. In atherosklerotischen Läsionen generieren dann VSMC und Makrophagen große Mengen an PGE₂ und PGI₂ (Belton et al., 2000; Schönbeck et al., 1999). Außerdem können Prostaglandine den Verlauf der Atherosklerose, durch die Induktion von Matrixmetalloproteinasen (Cipollone et al., 2001), die Inhibierung der Proliferation und Migration von VSMC, sowie die Beeinflussung der Thrombozyten-Aktivität modulieren. Ob Prostaglandine die Expression von EZM-Molekülen in atherosklerotischen Läsionen steuern ist bisher unbekannt. Mittels Expressionsanalysen wurde in humanen VSMC eine verstärkte Heraufregulation der HAS2-mRNA 6 h nach Stimulation mit Iloprost, einem stabilen PGI₂-Mimetikum, gezeigt (Debey et al., 2003). Die Schlussfolgerung, dass PGI₂ möglicherweise die HA-Synthese humaner glatter Muskelzellen stimuliert, wurde durch Untersuchungen an Fibroblasten und Mesothelzellen unterstützt, die eine erhöhte HA-Sekretion in Antwort auf PGE₂ zeigten (Honda et al., 1993).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Dedifferenzierung der quieszenten VSMCs der Media, in einen „synthetischen“ Phänotyp, resultiert in einer gesteigerten Proliferation, Migration und einer Zunahme der EZM-Synthese. Diese Vorgänge sind verantwortlich für die Progression okklusiver Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose oder der Restenose nach Ballondilatation.

Die Bedeutung von HA, einem GAG der EZM, für die Kontrolle von Proliferation und Migration von Zellen, sind im Bereich der Tumorforschung vielseitig untersucht worden. HA, die durch HA-Synthasen gebildet wird, akkumuliert jedoch auch verstärkt in der Neointima atherosklerotischer Läsionen. Während der Atherosklerose wird die Prostaglandinsynthese durch COX2 verstärkt. Ob Prostaglandine die Synthese der HA modulieren ist derzeit unbekannt. Weiterhin ist die Funktion der HA für den Phänotyp von VSMC und die Atherosklerose bisher nur ansatzweise erforscht worden. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Regulation der HAS2-Expression und der HA-Synthese durch vasodilatierende Prostaglandine untersucht. Anschließend wurde eine mögliche Korrelation von HA mit COX2 in humanen atherosklerotischen Läsionen analysiert. Die Bedeutung der durch HAS2-synthetisierten HA für den Phänotyp VSMC, wurde mittels HAS2-spezifischer siRNA untersucht. Um die Gene zu identifizieren, die die Entstehung des HAS2-abhängigen Phänotyps vermitteln und in die pro-atherosklerotische Funktion von HA involviert sein könnten, wurde mittels Expressionsanalysen nach HAS2-abhängig regulierten Genen in VSMC gesucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: verwendete Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer 1 x PBS + 3 % Magermilchpulver oder 1 x TBS + 5 % Magermilchpulver + 0,1 % Tween 20	Blot-Puffer 1 x Laufpuffer ohne SDS 20 % Laufpuffer
2 x Färbe-Puffer 100 mM MES 1 M NaCl 0,05 % Tween 20 0,005 % Antifoam	10 x Laufpuffer 250 mM Tris7HCl 1,9 mM Glycin 0,1 % SDS
Hybridisierungspuffer 100 mM MES 1 M NaCl 20 mM EDTA 0,01 % Tween 20	4 x Laemmli-Puffer 250 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 8 % SDS 40 % Glycerin 20 % 2-Mercaptoethanol 0,001 % Bromphenolblau 100 mM Dithiothreitol (DTT)
PBS 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,3 mM Na_2HPO_4 pH 7,4	5 x RNA-Fragmentierungspuffer 200 mM Tris-Acetat, pH 8,1 500 mM K-Acetat 150 mM Mg-Acetat
10 x TAE 40 mM Tris/HCl 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA pH 7,8	10 x TBS 100 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
TBST 1 x TBS + 0,1 % Tween 20	siRNA-Puffer 100 mM K-Acetat 30 mM HEPES KOH 2 mM Mg-Acetat; pH 7,4
1 x Waschpuffer 0,5 % Magermilchpulver + PBS	

2.2 Zellkultur

Die Substanzen für die Nährmedien wurden von Gibco Life Technologies bezogen. Die Kulturgefäße, die 60-cm² Schalen, sowie die 6-Lochplatten wurden von der Firma Becton-Dickinson bezogen. Das FCS wurde von den Firmen Gibco Life Technologies (Lot-Nummer: 40Q1130K) und BioWhittaker (Lot-Nummer: 14801F) verwendet.

2.2.1 Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Humane glatte Gefäßmuskelzellen (hVSMC) wurden nach der Explant-Technik (Fallier-Becker et al., 1990) aus der Vena Saphena oder der Arteria Mammaria isoliert, bei Patienten nach einer Bypass-Operation. Die hVSMCs wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C unter Begasung mit 5 % CO₂ kultiviert. Für die Versuche wurden generell Zellen in den Passagen 4 bis 10 verwendet. Humane VSMCs aus Koronararterien (Promocell) wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS, Penicillin, Streptomycin, Glutamin und nicht-essentielle Aminosäuren bei 37°C unter Begasung mit 5 % CO₂ kultiviert.

Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,5 mM) abgelöst und in einer Dichte von 7000 - 10000 Zellen / cm² ausgesät. Für die Versuche wurden Zellen in den Passagen 4 bis 10 verwendet.

2.2.2 Stimulationsversuche

In allen Stimulationsversuchen wurden die Zellen zunächst 2 x mit PBS gewaschen, für 24 h in serumfreien DMEM unter Normalbedingungen kultiviert und anschließend mit den beschriebenen Reagenzien (Tabelle 2) für die angegebenen Inkubationszeiten stimuliert.

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien in den Zellkulturversuchen

Reagenz	Beschreibung	Quelle/Referenz
Iloprost	IP-/EP ₁ - Rezeptoragonist	Schering
Cicaprost	IP-Rezeptoragonist	Schering
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	EP ₁₋₄ - Rezeptoragonist	Sigma-Aldrich
PDGF-BB	Wachstumsfaktor	Promokine
Forskolin	Aktivator der Adenylatcyclase	Sigma-Aldrich
db-cAMP	cAMP-Analogon	Sigma-Aldrich
Butaprost	EP ₂ -Rezeptoragonist	Dr. P. Gardiner, Bayer (Middlesex, UK)
SC19220	EP ₁ - Rezeptorantagonist	Tocris
M&B 28.767	EP ₃ -Rezeptoragonist	Dr. L Caton, Rhône-Poulenc
ONO-AE1-321	EP ₄ -Rezeptoragonist	ONO Pharmaceutical
H89	PKA-Inhibitor	Sigma-Aldrich
GF109203X	PKC-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Calphostin C	PKC-Inhibitor	Calbiochem
Rottlerin	PKC-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Pertussis Toxin (PTX)	Inhibitor von G _i - gekoppelten Rezeptoren (z.B. EP ₃ -Rezeptor)	Sigma-Aldrich
Etoricoxib	selektiver COX2- Inhibitor	Laboratorien Berlin Aldersdorf GmbH
Interleukin-1 β	Zytokin	Sigma-Aldrich

2.3 Transfektion glatter Muskelzellen mit siRNA

Die einzelsträngigen siRNAs wurden ausgehend von der Sequenz der cDNA chemisch von Qiagen-Xeragon synthetisiert. Für die Transfektion wurden folgenden siRNA-Sequenzen ausgewählt, die spezifisch das *HAS2*-Gen erkennen und binden:

sense HAS2-siRNA: 5`-UUGGAACACACUCUUUGGd(-TT)-3`
antisense HAS2-siRNA: 5`-CCAAAGAGUGUGGUUCCUd(TT)-3`

Als Kontrolle diente eine doppelsträngige siRNA, die zu keinem humanen Gen homolog war:

sense Kontroll-siRNA: 5`-UUCUCCGAACGUGUCACGUd(TT)-3`
antisense Kontroll-siRNA: 5`-ACGUGACACGUUCGGAGAA(TT)-3`

Die einzelsträngigen siRNAs wurden in einem sterilen siRNA-Puffer (Qiagen-Xeragon) in einer Konzentration von 40 µM resuspendiert und mittels folgenden Temperaturprofils zu komplementären Basenpaarungen zusammengelagert:

90°C, 1 Min

37°C, 60 Min

Da jeweils gleiche Mengen sense- und antisense-siRNA zusammengelagert wurden, betrug die Endkonzentration der siRNA-Duplex 20 µM. Humane VSMCs wurden 1 x mit PBS gewaschen, mit 1 x TE abgelöst und in einer Zelldichte von 10000 Zellen/cm² (~50 % - 70 % Konfluenz) in verschiedenen Zellkulturgefäßen ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung unter Normalbedingungen wurden die Zellen in serumfreien DMEM mit 1,6 µg HAS2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA pro 45000 Zellen mittels einer auf Liposomen basierenden Transfektionsmethode (Transmessenger Transfection Reagent; Qiagen) nach Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurde pro 12-Loch-Platte folgender Transfektionsansatz gewählt:

84,72 µl Puffer

+ 1,6 µl Enhancer

+ 5,68 µl HAS2- / Kontroll-siRNA

+ 8 µl Transfektionsreagenz

Der Puffer, der Enhancer und die siRNA wurden vermischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe des Transfektionsreagenz und eine weitere 10-minütige Inkubation der Liposomen-

Komplexe bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde mit 600 µl serumfreien DMEM vermischt und anschließend auf die mit PBS gewaschenen VSMC gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation mit den Liposomen-Komplexen über Nacht und anschließend wurden die Zellen für die nachfolgenden Versuche stimuliert.

2.4 Bestimmung der mRNA-Expression

2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen erfolgte mittels peqGOLD Trifast (PeqLab) nach Herstellerangaben. Nach der Abnahme des Mediums wurden die Zellen durch die Zugabe von 1ml / 10 cm² Trifast lysiert, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit Chloroform versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde die RNA aus dem Überstand durch die Zugabe von Isopropanol ausgefällt und anschließend mit Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und mit 25 µl DEPC - Wasser resuspendiert.

2.4.2 Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Quantifizierung der präparierten RNA erfolgte spektrometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einem Genequant II DNA / RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech). Der Quotient aus den Absorptionswerten 260 nm / 280 nm gibt den Reinheitsgrad der präparierten RNA an. Für Micro-DNA-Arrays wurde die präparierte RNA in einem Bioanalyzer analysiert.

2.4.3 Semiquantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Untersuchungen zur HAS2-Expression erfolgte durch semiquantitative RT-PCR mittels Qiagen® One-Step RT-PCR-Kit (Qiagen). Bei jeder Reaktion wurde *GAPDH* als interner Standard koamplifiziert.

RT-PCR-Ansatz:

- 2,5 µl Gesamt-RNA (250 ng)
- 5 µl 5-fach Puffer
- 5 µl Q-Lösung
- 1 µl dNTPs
- je 0,75 µl *HAS2* forward + reverse (15 µM)
- je 0,75 µl *GAPDH* forward + reverse (20 µM)
- 1µl Enzymmix
- 7,5 µl RNA-se freies Wasser

Gesamt-Volumen: 25 µl

RT-PCR-Temperaturprofil:

- 30 Minuten; 50°C
- 15 Minuten; 95°C
- 1 Minute; 95°C
- 1 Minute; 51°C
- 1 Minute; 72°C
- 10 Minuten; 72°C
- 8 ; 4°C

} 28 Zyklen

Tabelle 3: Verwendete Primer in der RT-PCR

Gen	Primer-Sequenz (5' → 3')	Größe des PCR-Produktes (bp)
<i>HAS2-forward</i>	GTCTCAAATTCATCTGATCTC	419
<i>HAS2-reverse</i>	ACATTTCTTAAGTAGTCTGG	
<i>GAPDH-forward</i>	TGATGACATCAAGAAGGTGGTTGAA	219
<i>GAPDH-reverse</i>	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die densitrometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCRs wurden die PCR-Produkte zunächst in 2 %-igen Agarosegelen bei 100 V aufgetrennt (Agarose, in 1 x TAE mit ¼ Volumen Ethidiumbromid (Stocklösung 10 mg/ml; Sigma). Zuvor wurden die DNA-Fragmente mit 1/5 Volumen Blaumarker (1 % Bromphenolblau, 87 % Glycerol) versetzt. Eine 100 bp-DNA-Leiter (Invitrogen) diene als Größenstandard. Die Quantifizierung der Pixelintensität der einzelnen Banden und damit der Expressionsstärke erfolgte mit einer Software (Quantity One 4.1-1; Biorad). Die HAS2-Expression wurde mittels des Quotienten der HAS2- zu der GAPDH-Bandenintensität bestimmt und auf die unstimulierte Kontrolle normalisiert.

2.4.5 Real-Time RT-PCR

2.4.5.1 cDNA-Synthese

Die Erzeugung von cDNA aus der präparierten Gesamt-RNA erfolgte mittels eines cDNA-Synthese Kits (Invitrogen). Es wurden zunächst jeweils 3 µg Gesamt-RNA für 5 Minuten bei 70°C erhitzt. Danach erfolgte die Zugabe des Reaktionsgemisches:

0,4 µl DTT
1 µl RNAsin
1,7 µl BSA (2,9 mg/ml)
2,5 µl dNTPs (jeweils 25 nM)
3 µl (N)₆-Polymerase (1,5 µg/µl)
10 µl 5 x H-RT-Puffer

Anschließend wurde der cDNA-Syntheseansatz für 50 Minuten bei 42°C und danach für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde in der nachfolgenden *Real-Time* RT-PCR als Matrize eingesetzt.

2.4.5.2 *Real-Time* RT-PCR

Die *Real-Time* RT-PCR basiert auf einer normalen PCR-Reaktion und wurde mit einem „qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I“ (Eurogentec) durchgeführt. Während der Reaktion interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA, dessen Einbau jeweils am Zyklus-Ende gemessen wird. Diese Messung ermöglicht eine Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit.

<u><i>Real-Time</i> RT-PCR-Ansatz:</u>	2 µl 10-fach Puffer
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	2 µl dNTPs (2,5 mM)
	0,125 µl Hot GoldStar Taq Polymerase
	0,75 µl SYBR Green
	5 µl cDNA (1:50 verdünnt)
	4,5 µl <i>HAS2</i> forward (10 µM)
	1,5 µl <i>HAS2</i> reverse (10 µM)
	1,125 µl deionisiertes Wasser
	Gesamtvolumen: 20 µl

<u><i>Real-Time</i> RT-PCR-Temperaturprofil:</u>	10 Minuten; 95°C	
	15 Sekunden; 95°C	} 40 Zyklen
	60 Sekunden; 60°C	

Die *HAS2*-Expression wurde auf ein Referenzgen (*ARF1*; ADP Ribosylierungsfaktor 1) normalisiert, welches in den zu vergleichenden cDNA-Proben keine Expressionsunterschiede zeigte.

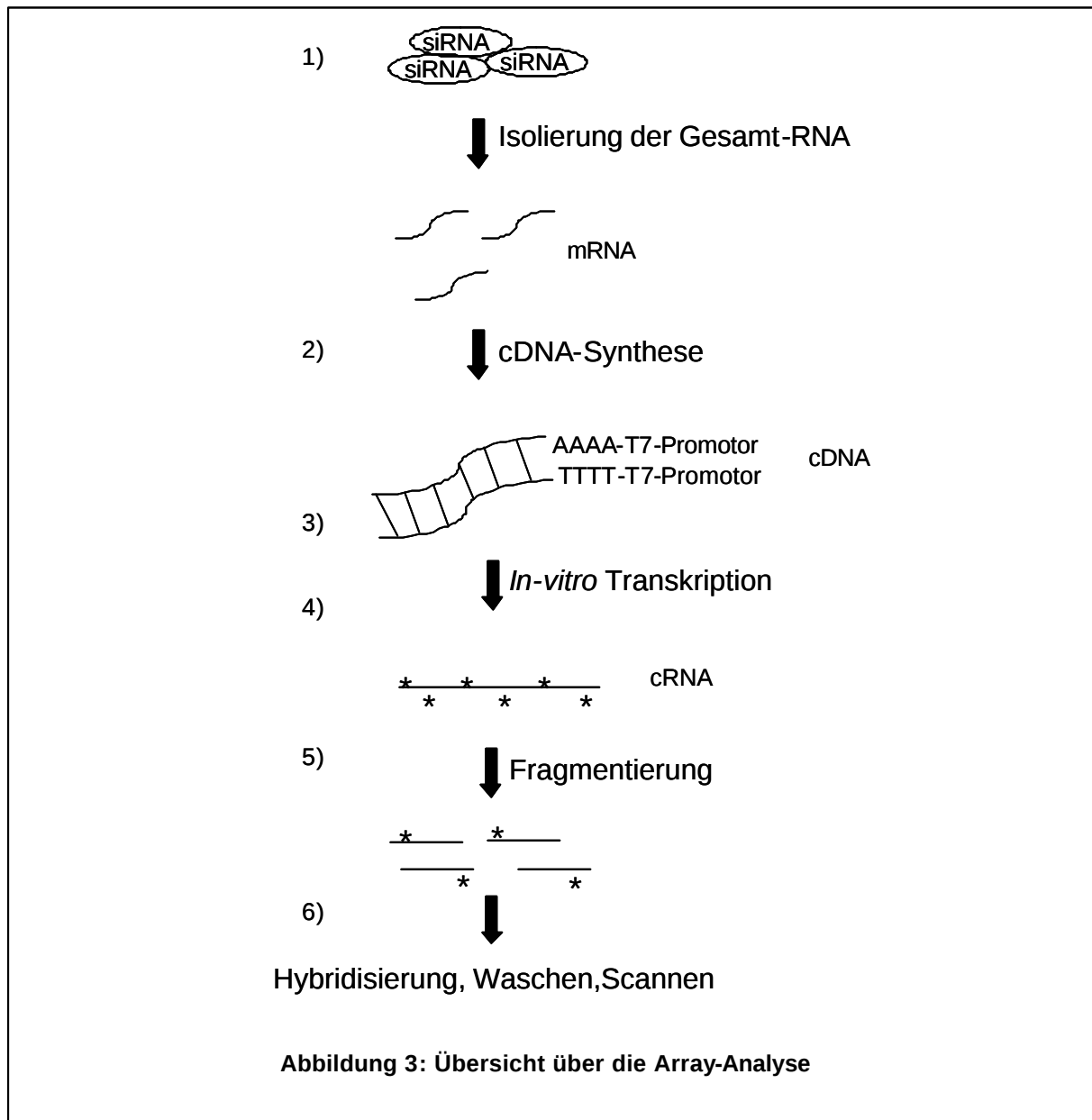
Tabelle 4 : Verwendete Primer in der *Real-Time* RT-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	PCR-Produktlänge
<i>ARF1</i> forward	GACCACGATCCTCTACAAGC	111bp
<i>ARF1</i> reverse	TCCCACACAGTGAAGCTGATG	
<i>HAS2</i> forward	GTGTGGATTATGTACAGGTTTGTG	114 bp
<i>HAS2</i> reverse	GAGATCCAGGAATCGTACTTG	

Die *Real-Time* RT-PCR Reaktionen erfolgten im 96-well Format in einem *Real-Time* PCR-Thermocycler (GeneAmp 5700 SDS; Applied Biosystems).

2.5 DNA-Mikroarray

2.5.1 Übersicht



Für die Mikroarray-Analyse wurden hVSMC zunächst mit Kontroll- und HAS2-siRNA transfiziert (Abbildung 3) und 24 h nach Transfektion für 12 h mit PDGF-BB (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend erfolgten die Präparation der Gesamt-RNA (Abbildung 3), die Quantifizierung der RNA und die cDNA-Synthese unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers (Abbildung 3). Nach der Aufreinigung der cDNA wurde diese mittels *in-vitro* Transkription in cRNA umgeschrieben und mit biotinylierten CTP und UTP markiert (Abbildung 3). Nach der Fragmentierung der

cRNA (Abbildung 3) wurde je ein HG_U95Av2-Array (Affymetrix Inc., USA) mit der jeweiligen Probe hybridisiert, gewaschen und gescannt (Abbildung 3).

2.5.2 Ethanol-Präzipitation

Für die Array-Analyse wurde die RNA zunächst wie in 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben isoliert und quantifiziert. Anschließend wurde die isolierte RNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und mit 2,5-fachem Volumen absoluten Ethanol für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert und anschließend für 20 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wurde 2 x mit 80 % Ethanol gewaschen und dann in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.5.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem „Superscript double stranded cDNA synthese kit“ (Invitrogen) und einem T₇-(dT)₂₄-Primer durchgeführt (MWG Biotech A):

5`-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub>-3`

Es wurden von jeder Probe 6 µg RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

Erststrang-Synthese:

- 1) 10 µl RNA (6 µg)
1µl Kontroll-RNA
1µl T₇-(dT)₂₄-Primer
70°C, 10 min
- 2) 4 µl 5x Erststrang-Synthese Puffer
2 µl DTT (0,1M)
1 µl dNTP-Mix (10mM)
42°C, 2 min
- 3) + 2 µl Superscript II RT
42°C, 1 h

Danach erfolgte die Zugabe der Reagenzien für den Zweitstrang-Synthese Ansatz.

Zweitstrang-Synthese: 1) 91 µl H₂O
30 µl 5x Zweitstrang-Synthese Puffer
3 µl 10 mM dNTP
1 µl E.coli DNA-Ligase (10 U/µl)
4 µl DNA-Polymerase (10 U/µl)
1 µl RNase H (2 U/µl)
2 h; 16°C

2) + 2 µl T4-DNA-Polymerase
5 min, 16°C
+ 10 µl 0,5 M EDTA

2.5.4 Aufreinigung der RNA mittels Genechip Sample Cleanup-Module (Affymetrix 900371)

Die Aufreinigung erfolgte mittels des Cleanup-Modules nach Herstellerangaben. Nach der Zugabe des Bindepuffers zu der in 2.5.3 synthetisierten cDNA wurde die Lösung auf die Säule gegeben und 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen, trocken zentrifugiert und die cDNA mit Elutionspuffer bei 50°C von der Säule eluiert.

2.5.5 Synthese von Biotin-markierter cRNA (in-vitro Transkription)

Für jede Probe wurde die Hälfte der in 2.5.4 aufgereinigten cDNA für die *in-vitro* Transkription eingesetzt, die mit dem BioArrayTM HighYieldTM RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Biochem, Inc., Farmingdale, USA) durchgeführt wurde.

in-vitro Transkriptions-Ansatz: 11 µl dsDNA-Probe
2 µl HY-Reaction Buffer 10 x
2 µl Biotin labeled Ribonucleotides 10 x
2 µl DTT 10 x
2 µl RNase Inhibitor-Mix 10 x
1 µl T7-Enzym-Mix 20 x
5 h, 37°C

Anschließend wurde die cRNA wie in 2.5.4 beschrieben, aufgereinigt und wie in 2.4.2 quantifiziert.

2.5.6 cRNA-Fragmentierung

Für die Fragmentierung der cRNA wurden jeweils 5 µg cRNA mit 6 µl eines 5 x Fragmentierungspuffer (Affymetrix Inc., USA) versetzt (Gesamtvolumen 30 µl) und bei 94°C für 35 min inkubiert.

2.5.7 Hybridisierung, Waschen und Scannen der Arrays

Die Hybridisierung, das Waschen und das Scannen der Affymetrix-Arrays erfolgte im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf nach Herstellerangaben.

2.5.8 Expressionsanalyse

Der Vergleich der beiden Arrayexperimente wurde durch eine vergleichende Expressionsanalyse anhand der Affymetrix Microarray Suite Version 5.0 durchgeführt. Da die Signalintensitäten der verschiedenen Chips, hinsichtlich der Menge und Qualität der cRNA oder der Färbung der Chips, Schwankungen aufweisen könnten, wurde vor der Expressionsanalyse eine Normalisierung beider Chips durchgeführt und ein gemeinsamer „Faktor“ als Maßstab festgelegt. Um differentiell exprimierte Gene in Abhängigkeit der HAS2-siRNA identifizieren zu können, wurde das Kontrollexperiment (Transfektion mit Kontroll-siRNA) als Basis definiert. Der Vergleich aller „durchschnittlichen“ Unterschiede (Average-Difference-Werte; AD-Werte) mit der Basis ergab eine „unterschiedliche Signalintensität“ (DC)

von entweder „Zunahme“ (I), „Abnahme“ (D), „marginaler Unterschied“ oder „kein Unterschied“.

2.6 Quantifizierungen der sezernierten Hyaluronsäure

2.6.1 Bestimmung der Hyaluronsäure im Zellkulturüberstand

Die Menge an Hyaluronsäure im Zellkulturüberstand wurde mittels eines Radioaktivitätstests (Pharmacia HA-Test, Pharmacia-Diagnostics) nach Herstellerangaben bestimmt. Dieser Test beruht auf der spezifischen Interaktion der Hyaluronsäure mit einem [125]-markierten Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP-[125]). Es wurden jeweils in Doppelbestimmung 100 μ l Medium sowie 100 μ l Standard (0, 10, 25, 75, 200, 500 und 1000 μ g / l Hyaluronsäure) mit HABP-[125] für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Hyaluronsäure-gebundener Sepharose, der sich eine weitere Inkubation für 60 Minuten bei 4°C anschloss. Daraufhin wurde die Suspension dekantiert und die γ -Strahlung im Sepharosepellet mittels eines Szintillationszählers (LS Beckmann 500) ermittelt. Die gemessene Radioaktivität verhielt sich dabei umgekehrt proportional zur Hyaluronsäure-Konzentration (μ g / l) im Medium und wurde mittels der Standardkurve ausgewertet.

2.6.2 Nachweis der perizellulären Hyaluronsäure

Der perizelluläre HA-Mantel wurde mittels fixierter Erythrozyten lichtmikroskopisch (Knudson and Toole, 1985) dargestellt. Es wurden 750 μ l Erythrozyten, die zuvor in 1 % Paraformaldehyd fixiert und mit 1 x PBS gewaschen worden waren, in einer Dichte von 7×10^6 / 10 cm^2 auf die hVSMC gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation, während der die Erythrozyten sedimentierten, wurden die perizellulären HA-Mäntel sichtbar. Die Darstellung der perizellulären HA-Mäntel beruht darauf, dass Erythrozyten nicht in die perizelluläre Matrix eindringen können und sich daher am Rand ablagern.

2.7 Morphometrische Analyse humaner glatter Muskelzellen

Die Zellfläche in μm^2 wurde in 6-Lochplatten mittels der analySIS Software (Soft Imaging System) bestimmt. Transfizierte und stimulierte glatte Muskelzellen wurden mit 3,7 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 1 x PBS überschichtet. In jedem Versuchsansatz wurden 3 Bilder (100-fache Vergrößerung) pro Bedingung aufgenommen. Anschließend wurde die Zellfläche (40-60 Zellen /Versuchsbedingung) quantifiziert.

2.8 Immunfluoreszenz

Humane glatte Muskelzellen wurden auf speziellen Kulturschalen (Labaratory-Tek; Nunc; $0,8 \text{ cm}^2$ / well) unter Normalbedingungen kultiviert, unter Serumentzug mit siRNA transfiziert (2.3) und anschließend stimuliert. Dann wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und unter Zugabe von 3,7 % Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100. Durch die nachfolgende Inkubation mit 3 % BSA / PBS für 1 h wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Darauf schloss sich eine Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti-Paxillin; 1:200 in 1 % BSA / PBS verdünnt, Maus-IgG1, BD Biosciences) für 1 h bei Raumtemperatur an. Danach wurden die Zellen mit einem Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörper (Anti-Maus IgG; 1:600 in PBS verdünnt, Sigma) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von FITC-gekoppelten Phalloidin (Sigma (P5282), 1:1000 in PBS verdünnt) für 1 h unter Lichtausschluss, bevor die Zellen wiederum 3 x mit PBS gewaschen wurden. Abschließend wurden die Zellkerne mittels eines Kernfarbstoffs (Hoechst 33342; 1:1000 in PBS verdünnt; Sigma) angefärbt. Die Präparate wurden anschließend mit 1 x PBS gewaschen und eingedeckt (Vectashield mounting media; Vector Laboratories). Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus BX 50, Filter U-MWG für FITC-Phalloidin; U-MWU für Hoechst 33342 und U-MNIBA für Cy3-Paxillin). Die Überlagerung der einzelnen Bilder, die mit einer Colorview II-Kamera (Soft Imaging System) aufgenommen wurden, erfolgte mittels der analySIS Software (Soft Imaging System).

2.9 Western-Blot-Analyse

2.9.1 Lyse der hVSMC

Für die Untersuchungen der Proteinexpressionen mittels Western-Blot-Analyse wurden hVSMCs in 6-Lochplatten kultiviert und nach der Stimulation unter Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine bei 95°C für 10 Minuten.

2.9.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proteine wurden in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Sammelgel (3 % Acrylamid, Biorad) und ein Trenngel (10 % Acrylamid, Biorad) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einer Mini-Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean® 3 Cell; Biorad) in 1 x Laufpuffer + 0,1 % SDS bei 160 V. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein hochmolekularer Proteinstandard verwendet (Prestained Protein Ladder ~ 10-180 Kd; Fermentas). Generell wurden gleiche Mengen Proteinlysate aufgetragen.

2.9.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot-Analyse

Nach der Proteinauftrennung mittels SDS-Page wurden die Proteine auf eine Polyvinyliden Difluoride Membran (PVDF; Hybond-P PVDF-Transfer Membran; Amersham Pharmacia) transferiert. Die Übertragung der Proteine erfolgte in einem Mini-Transfer-Blot-System (Mini Transfer Blot® Cell; Biorad) in Blotpuffer bei 100 V für 1 h. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach dem Transfer mit Coomassie (7,5 % Essigsäure, 50 % Methanol, 0,1 % Coomassie-Brilliant Blue) angefärbt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran für mindestens 1 h in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-

Antikörper (in 0,5 % Trockenmilchpulver/PBS (Cyclin D1; p-FAK), 5 % BSA/TBST (phospho-(Ser/Thr)-Akt-Substrat) oder in 5 % Trockenmilchpulver/TBST verdünnt (Akt, P-Akt)) über Nacht bei 4°C hybridisiert. Danach wurde die Membran 3 x für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen, mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:5000 in 5 % Trockenmilchpulver/TBST (phospho-(Ser/Thr)-Akt-Substrat; Akt, p-Akt) oder 0,5 % Trockenmilchpulver/PBST (Cyclin D1; p-FAK) verdünnt) für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 3 x gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Zugabe eines Peroxidase-Substrats (ECL-plus Western Blotting Detection System; Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben und Auflegen eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECLTM; Amersham Pharmacia Biotech).

Tabelle5: Für die Western-Blots verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle/Referenz
Cyclin D1, human, polyklonal, Kaninchen	1:1000	Santa Cruz (sc753)
COX-2 (H62), human, polyklonal, Kaninchen	1:500	Santa Cruz (sc-7951)
Akt, human polyklonal, Maus	1:1000	Cell Signalling (9272)
phospho-Akt (Ser473), human polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signalling (9271)
phospho-FAK (Y397), human polyklonal, Kaninchen	1:500	Santa Cruz (sc 11765-R)
phospho-(Ser/Thr) Akt-Substrat, human, polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signalling (9611)

2.9.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mittels Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) mittels eines „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad). Die Eichkurve wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg / ml) erstellt. Die Proben wurden jeweils mit 800 µl dH₂O und 200 µl Bradfordreagenz für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm in einem ELISA-Reader Modell 550 (BioRad).

2.10 Radioimmunologische Bestimmung von 6-Keto-PGF_{1α}

Die Messung der PG₂-Freisetzung in humanen VSMC erfolgte durch die Bestimmung des stabilen Hydrolyseproduktes 6-Keto-PGF_{1α} in einem Radioimmunoassay (RIA) (Schrör and Seidel 1988). Humane VSMCs wurden unter Serumentzug für 24 h unter Normalbedingungen kultiviert und anschließend für 24 h mit Interleukin-1β stimuliert. Für die Ermittlung der 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentration wurde der Zellkulturüberstand jeweils in 4-fach Bestimmung vermessen.

2.11 Bestimmung der Migration mittels einer modifizierten Boyden-Kammer

Humane VSMCs wurden 2 x mit PBS gewaschen und mit 1 x TE von der Kulturschale abgelöst. Die unteren Vertiefungen der Boyden-Kammer (48-Lochmikrochemotaxis-Kammer, Neuro Probe) wurden mit je 25 µl DMEM + 10 % FCS als chemotaktischen Stimulus gefüllt. Eine, mit Kollagen (bovines Kollagen Typ I; PAA Laboratories GMBH) überschichtete Membran (Polycarbonat, Porengröße 10 µm; Neuro Probe Inc.) wurde luftblasenfrei zwischen den Kammern angeordnet. Die glatten Muskelzellen wurden mit einer Zelldichte von 5000 bzw. 15000 Zellen pro Loch (45 µl) in die oberen Vertiefungen ausgesät und für 6 bzw. 24 h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Während der Inkubationszeit migrierten die Zellen aus der oberen Kammer durch die Poren auf die Unterseite der Membran. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Membran vorsichtig aus der Boyden-Kammer entfernt. Die migrierten Zellen auf der Membranunterseite wurden mit

Methanol fixiert. Die übrigen Zellen, die die Poren nicht passiert hatten, wurden von der Membran entfernt. Nach der Fixierung erfolgte die Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellkerne mittels Hemacolor (Merck) nach Herstellerangaben. Die angefärbten Zellen wurden lichtmikroskopisch (Olympus BX 50; 100-fache Vergrößerung) gezählt. Die Versuchsansätze wurden in 6-fach-Bestimmung durchgeführt.

2.12 Messung der DNA-Neusynthese mittels [^3H]-Thymidin-Inkorporation

Untersuchungen zum [^3H]-Thymidin-Einbau in die neusynthetisierte DNA erfolgte im 24-Loch Format in 4-fach-Bestimmung an hVSMC, die mit siRNA (2.3) transfiziert wurden. 24 h nach Transfektion erfolgte die Stimulation der Zellen unter Zugabe eines mitogenen Stimulus für weitere 24 h. [^3H]-markiertes Thymidin (Perkin Elmer) wurde für die letzten 8 h in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ in das Medium gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Durch Zugabe von 0,1 M Perchlorsäure für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen abgetötet und die DNA präzipitiert. Dann wurde die DNA mit 0,1 M Natronlauge für 30 Minuten bei 37°C lysiert und die Radioaktivität im Zelllysate, unter Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit, in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 6000 IC) bestimmt. Vor der Messung wurden jeweils 20 μl des Zelllysates für die Proteinbestimmung (siehe 2.9.4) entnommen.

2.13 Ermittlung der Zellproliferation

Humane VSMC wurden mit siRNA wie in 2.3 beschrieben transfiziert und für 48 h in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Nach Inkubation wurden die Zellen fixiert (37 % Formaldehyd, 2,5 g NaCl, 7,5 g Na_2SO_4 auf 1 Liter deionisiertes Wasser) fixiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellzahl wurde in jedem Versuch in 4-fach-Bestimmung bestimmt.

2.14 Immunhistologische Untersuchungen humaner atherosklerotischer Läsionen

Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten an atherosklerotischen Läsionen der Arteria Carotis von 19 Patienten (9 Frauen und 10 Männer) zwischen 52 und 83 Jahren. Die mit Formalin fixierten Präparate stammten aus der Gewebesammlung des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums, Düsseldorf (Prof. Dr. Mario Sarbia). Die Hyaluronsäure wurde mittels eines biotinylierten Bindeproteins (HABP; Calbiochem; 1:100 verdünnt) angefärbt. Immunhistologische Anfärbungen von COX1, COX2, IP-Rezeptor, EP₂-Rezeptor, glattmuskulären Aktin und CD68 wurden mit den in Tabelle 6 angegebenen Primär-Antikörpern und Verdünnungen durchgeführt. Für die Anfärbung von HA und einem anderen Antigen wurde zunächst HABP mit einem Streptavidin-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Sigma) und Diaminobenzidin (DAKO) als Substrat für die Peroxidase detektiert. Die Läsionen wurden anschließend 1 h mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 6) inkubiert und dann mit einem an die alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper und Fast Red (DAKO) als Substrat behandelt. Abschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun angefärbt.

Tabelle 6: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
COX-1, human	Maus, monoklonal; CXIII; 1:100	Cayman (Bestellnummer: 160110)
COX-2, human	Maus, monoklonal; 1:150	Cayman (Bestellnummer: 160112)
EP ₂ -Rezeptor, human	Kaninchen, polyklonal; 1:100	Prof. Dr. R.M. Nüsing; Phillips Universität, Marburg
IP-Rezeptor; human	Kaninchen, polyklonal; 1:100	Prof. Dr. R.M. Nüsing; Phillips Universität, Marburg
CD68; human	Maus, monoklonal; 1:500	DAKO (Klon PG-M1)
SM-Aktin; human	Maus, monoklonal; 1:100	DAKO (Klon HHF35)

2.15 Statistik

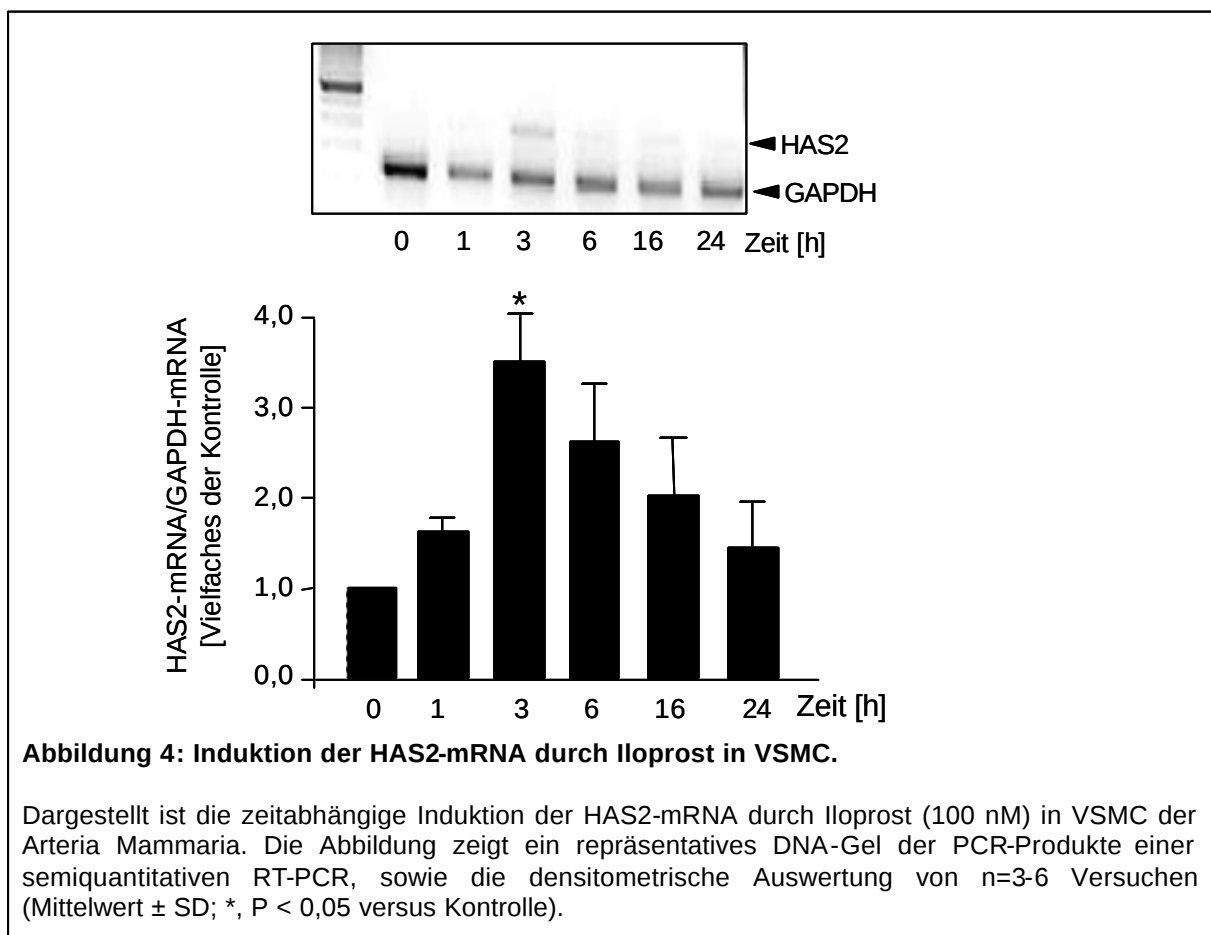
Die Ergebnisse der unterschiedlichen Experimente sind entweder als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Mittelwert $\pm$ SD) oder als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert $\pm$ SEM) angegeben. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde zunächst das ANOVA-Verfahren (One-Way Analysis of Variance) angewandt, gefolgt von Dunnett's oder Bonferoni-Test. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten von 2 Gruppen wurden mit dem Student's TTest hinsichtlich der Signifikanz geprüft. In den Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $*P < 0,05$ festgelegt. Die Analysen erfolgten mittels der GraphPad InStat.-Software (Version 3.01).

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der HAS2-mRNA durch Iloprost

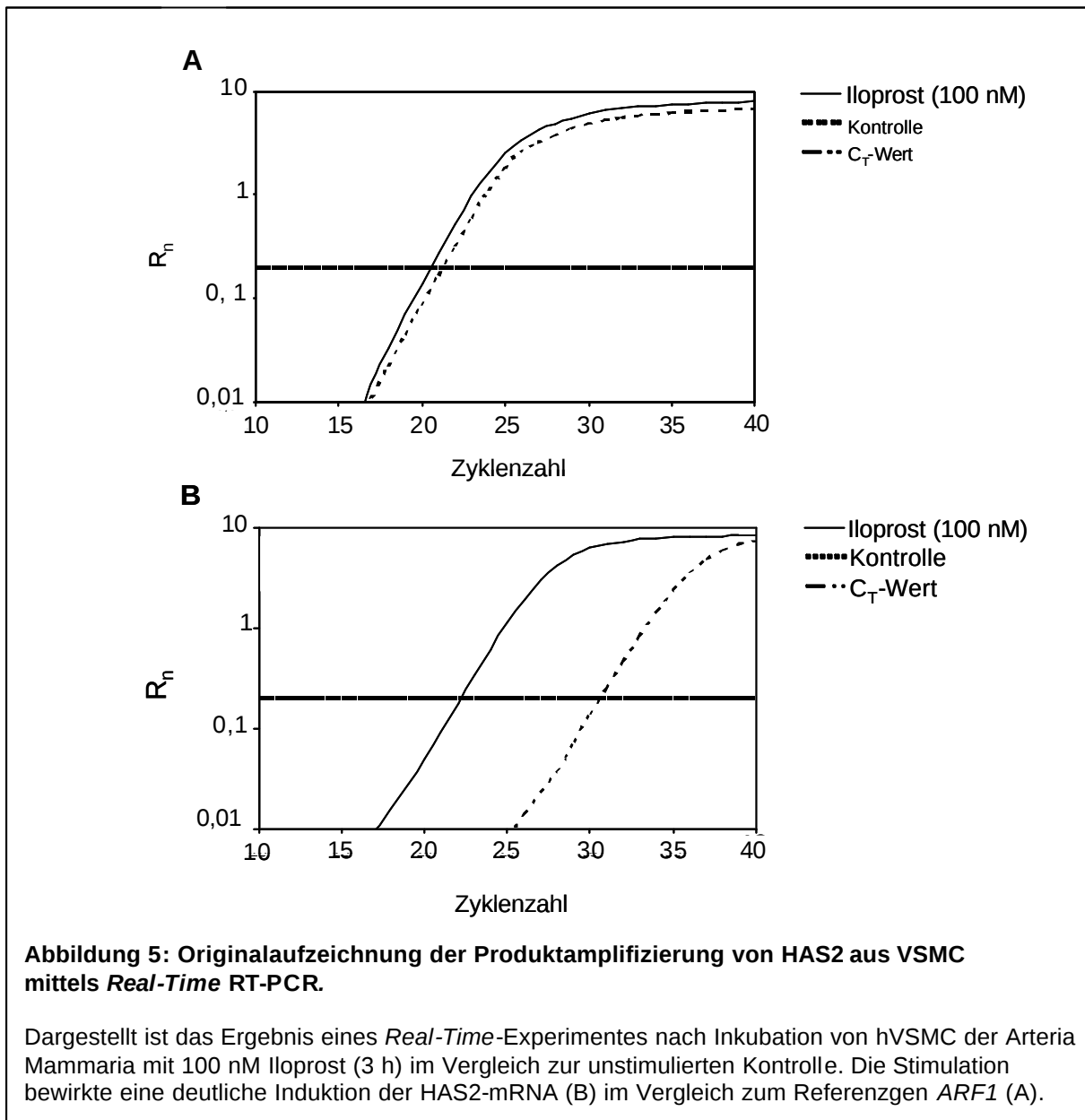
Proinflammatorische und mitogene Stimuli wie PDGF-BB, Interleukin-1 β oder Serum induzieren die Expression von HAS2 (Jacobson et al., 2000; Evanko et al., 2001). In Expressionsanalysen konnte kürzlich erstmals eine HAS2-Induktion unter dem Einfluss von Iloprost, einem stabilen PG $_I$ -Mimetikum, gezeigt werden (Debey et al., 2003).

Die Ergebnisse sollten zunächst in humanen VSMC der Arteria Mammaria bestätigt werden. Die humanen VSMC wurden 24 h unter Serumentzug kultiviert, dann für 1, 3, 6, 16 und 24 h mit Iloprost (100 nM) stimuliert. Anschließend wurde die HAS2-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt.



Die Expression von HAS2 verlief transient (Abbildung 4), mit einer maximalen Induktion nach 3-stündiger Inkubation mit Iloprost ($3,5 \pm 1,4$ - fach versus Kontrolle). Auch nach 24-stündiger Stimulation verlief die Expression noch oberhalb des

Basalwertes. Die Expression von GAPDH, als Referenzgen blieb annähernd konstant. Da eine maximale Stimulation nach 3-stündiger Inkubation gezeigt werden konnte, wurde dieser Zeitpunkt für alle weitergehenden Untersuchungen der HAS2-Expression gewählt.



Anschließend sollte die Induktion der HAS2-Expression durch Iloprost mittels der *Real-Time* RT-PCR bestätigt werden. Bei dieser Methode wird ein Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA interkaliert, welches die Messung der Fluoreszenzzunahme in jedem PCR-Zyklus ermöglicht. So wird die Zunahme des PCR-Produktes in Abhängigkeit der Zyklenzahl erfasst. Die Quantifizierung der

Expressionsunterschiede erfolgte durch Bezug auf das Referenzgen ARF-1 (ADP-Ribosylierungsfaktor 1).

Die Inkubation mit Iloprost bewirkte eine deutliche Linksverschiebung des HAS2-Signals zu einer geringeren Zyklenzahl. Diese Verschiebung ist die Folge einer Induktion. Die ermittelten Ct-Werte (*cycle threshold*: Schwellenwert) für die erhaltenen Kurven sind dabei umgekehrt proportional zur Menge des Transkriptes. Im Vergleich dazu zeigte ARF-1 keine Unterschiede zwischen unstimulierter und Iloprost-behandelter Probe (Abbildung 5).

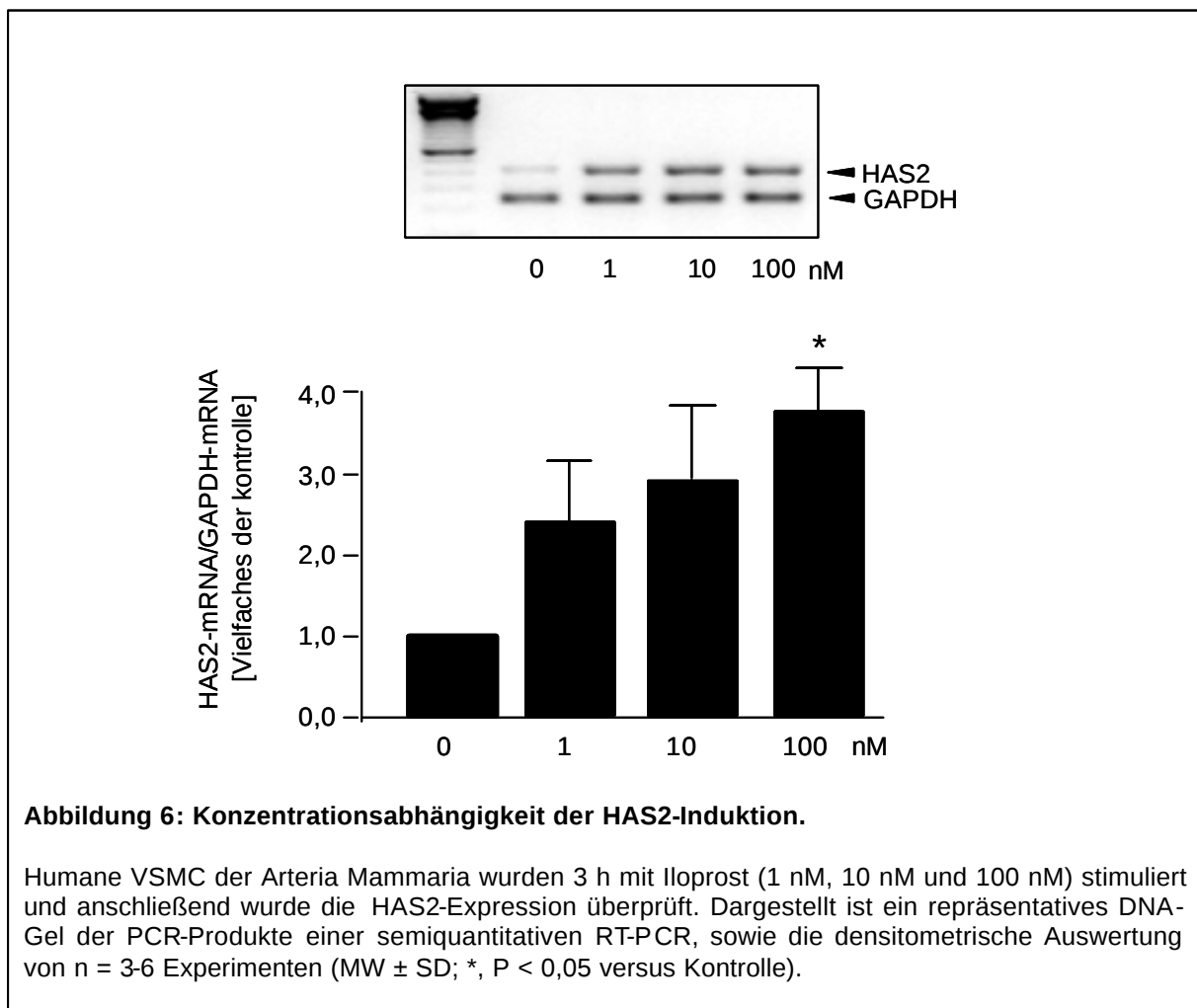


Abbildung 6 verdeutlicht, dass bereits geringe Iloprost-Konzentrationen (≥ 1 nM) die HAS2-Expression induzierten. Daher könnte die Induktion von HAS2-mRNA sowohl als Antwort auf pharmakodynamisch wirksame Iloprost-Konzentrationen als auch physiologisch in Antwort auf endogene PGI₂-Bildung und -Freisetzung erfolgen.

3.2 Induktionen der Hyaluronsäuresynthese in humanen glatten Muskelzellen

HA wird durch HA-Synthasen an der Innenseite der Plasmamembran synthetisiert und anschließend in die EZM extrudiert. Um zu überprüfen, ob die Induktion der HAS2-mRNA auch zu einer verstärkten Bildung von HAS2 und erhöhter HA-Synthese führt, wurden sowohl perizelluläre HA als auch die sezernierte HA untersucht.

3.2.1 Perizelluläre Akkumulation der Hyaluronsäure

Der Nachweis eines perizellulären HA-Mantels erfolgte lichtmikroskopisch durch Zugabe von fixierten Erythrozyten, die von den perizellulären HA-Mänteln ausgeschlossen werden (2.6.2). Die Stimulation mit Iloprost (100 nM) führte in VSMC zu einer verstärkten Ausbildung des perizellulären HA-Strukturen (weiße Pfeile). Im Vergleich dazu, konnten in den unstimulierten Kontroll-Zellen nur geringe Mengen perizellulärer HA nachgewiesen werden (Abbildung 7).

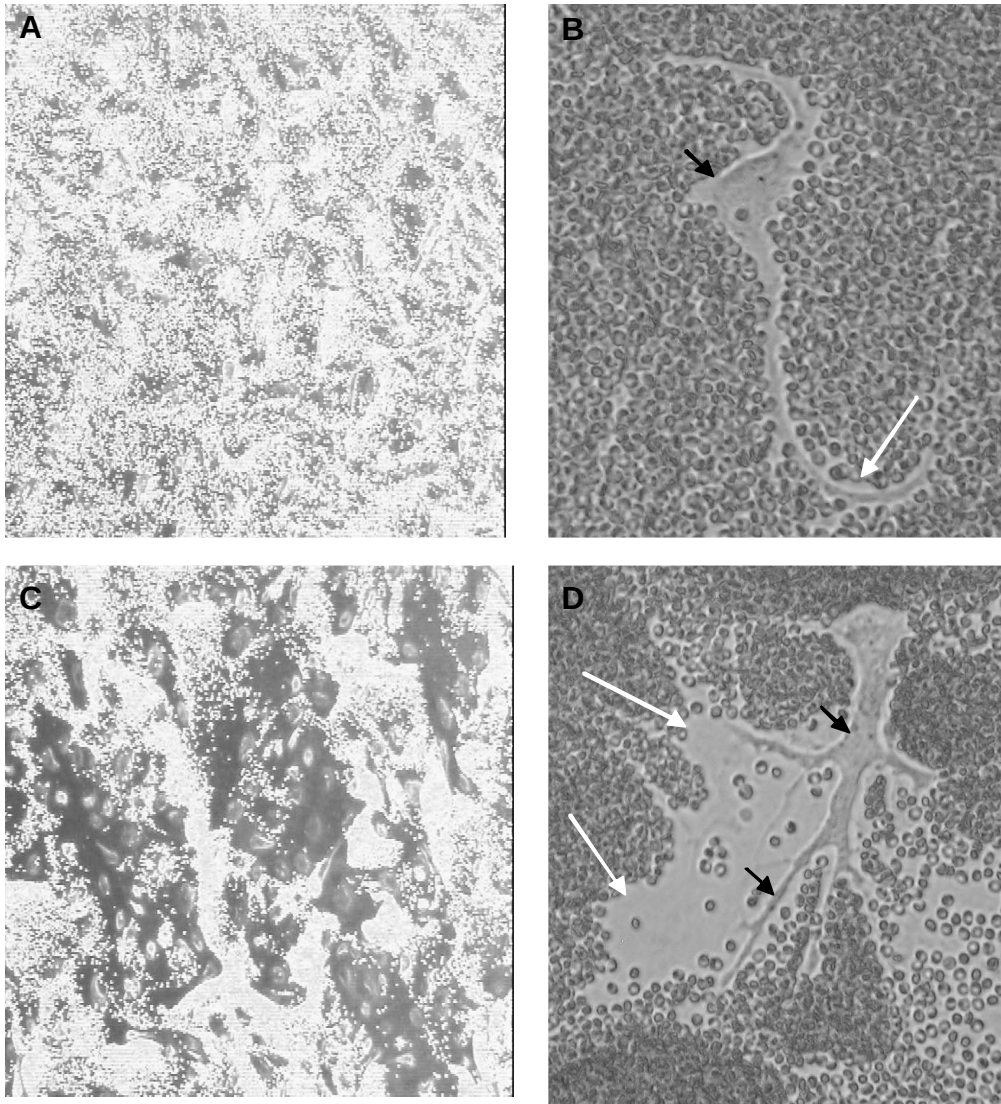


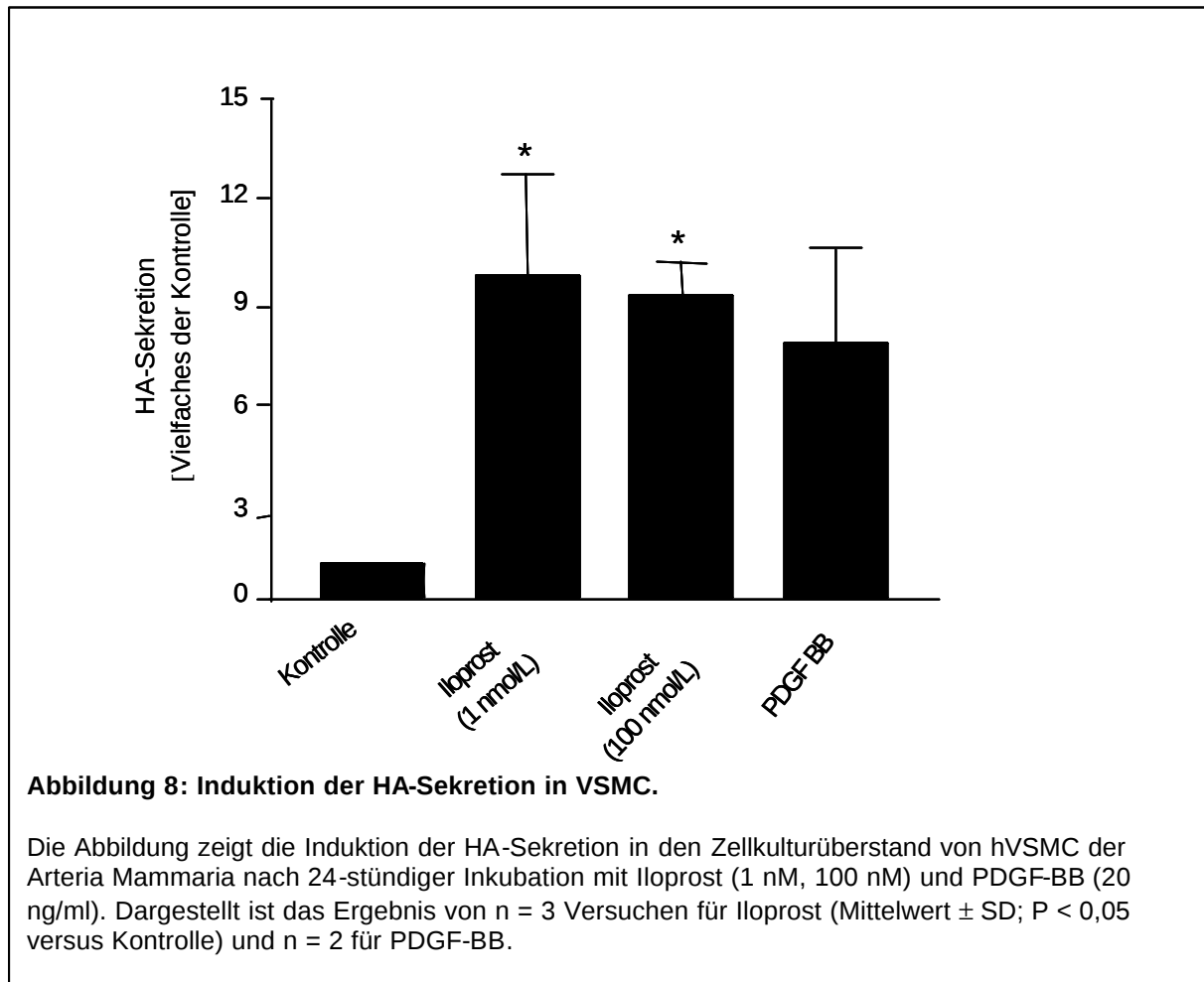
Abbildung 7: Induktion von perizellulären HA-Mänteln durch Iloprost in VSMC.

Dargestellt ist eine repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahme hVSMC der Arteria Mammaria, die 24 h mit Iloprost (100 nM) stimuliert wurden (C, D) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (A, B). Die Stimulation mit Iloprost führte zu einer verstärkten Ausbildung von perizellulären HA-Mänteln. In A und C ist jeweils eine 40 - fache und in B und D eine 200 - fache Vergrößerung dargestellt; weiße Pfeile, Grenze des perizellulären HA-Mantels; schwarze Pfeile, Grenze des Zytoplasmas.

3.2.2 Quantifizierung der Hyaluronsäure

Die Akkumulation der sezernierten Hyaluronsäure im Zellkulturüberstand wurde mittels eines [125]-markierten HA-Bindeproteins quantifiziert (2.6.1). Die Zellen wurden unter Serumentzug für 24 h inkubiert und anschließend für weitere 24 h mit Iloprost (1 nM bzw. 100 nM) stimuliert. Die Stimulation mit PDGF-BB (20 ng / ml) diente als Positiv-Kontrolle, da der Wachstumsfaktor als ein potenter Induktor der HA-Synthese beschrieben wurde (Papakonstantinou et al., 1995).

Während eines Zeitraums von 24 h wurden in den Kontrollzellen ca. 20 ng bis 70 ng HA in den Kulturüberstand abgegeben. Da die Menge der synthetisierten HA in den unterschiedlichen Versuchen je nach Zelllinie variierte, wurden die HA-Konzentrationen jeweils als ein Vielfaches der unstimulierten Kontrollzellen angegeben (Abbildung 8).

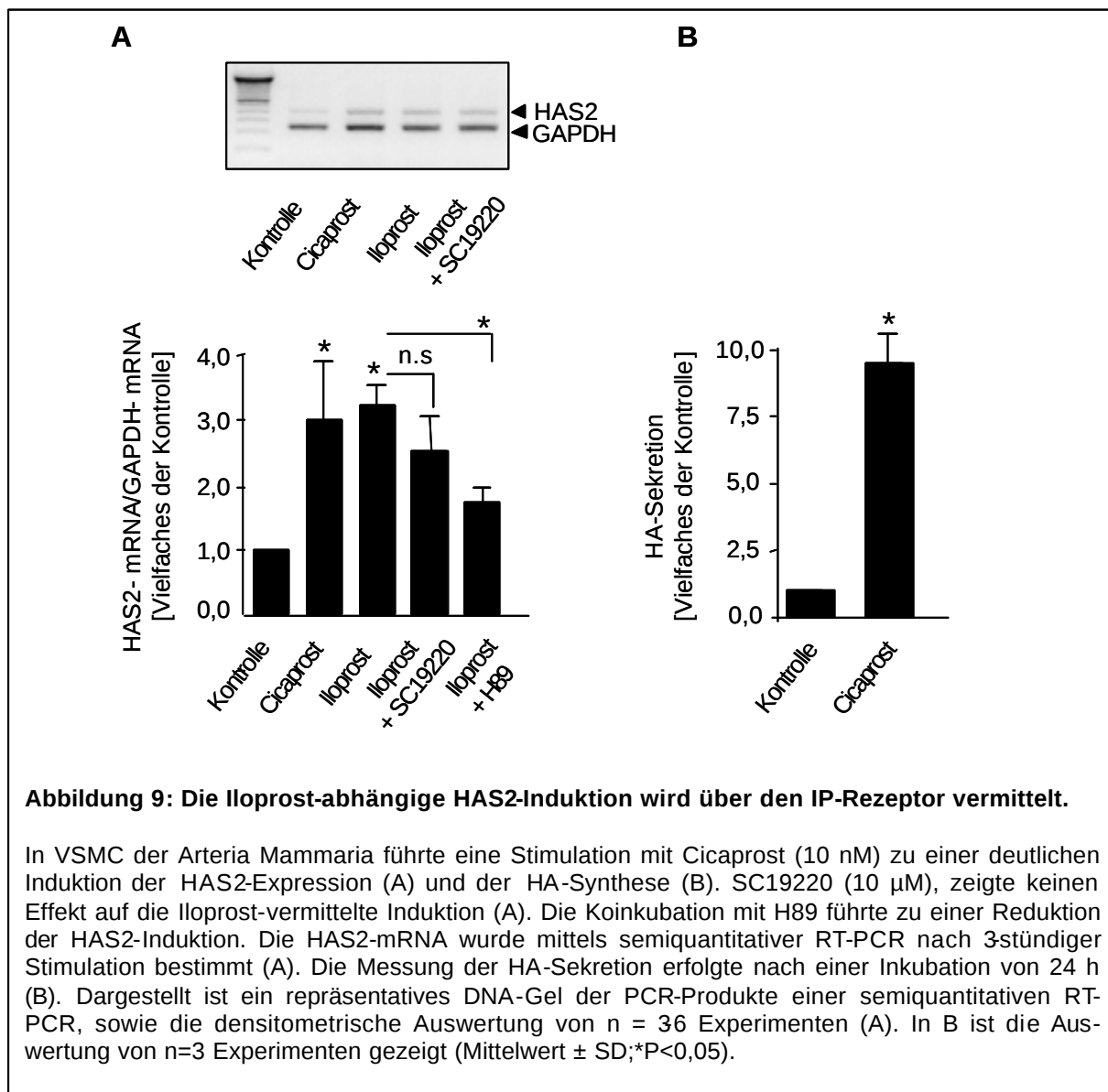


Iloprost (100 nM) induzierte die Abgabe von HA im Zellkulturüberstand um den Faktor $8,73 \pm 1,64$ – fach im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Diese Induktion der HA-Synthese konnte bereits mit geringen Iloprost-Konzentrationen (1 nM) erzielt werden ($9,32 \pm 5,07$ – fach versus Kontrolle). Der Wachstumsfaktor PDGF-BB bewirkte ebenfalls eine Zunahme der HA-Synthese ($6,6 \pm 3,8$ – fach versus Kontrolle) in der gleichen Größenordnung.

3.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion der HAS2-/HA-Induktion

3.3.1 Identifizierung der verantwortlichen Rezeptoren

Iloprost kann sowohl agonistisch den PGI_2 -Rezeptor (IP-Rezeptor), als auch den PGE_2 -Rezeptor 1 (EP_1 -Rezeptor) aktivieren (Casals-Stenzel et al., 1983). Die Expression beider Rezeptoren konnte mittels semiquantitativer RT-PCR in den kultivierten hVSMC nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten). In diesem Zusammenhang sollte nun analysiert werden, welcher Rezeptor die Induktion der HAS2-mRNA vermittelt.



Für die Identifizierung, wurden Cicaprost, ein selektiver Agonist am IP-Rezeptor (Coleman et al., 1994), und der selektive EP₁-Rezeptorantagonist, SC19220, verwendet (Reimer et al., 1992). Cicaprost (10 nM) induzierte sowohl HAS2-mRNA ($3,01 \pm 0,98$ – fach versus Kontrolle), als auch die HA-Synthese $9,49 \pm 1,90$ – fach versus Kontrolle (Abbildung 9). Die erzielten Effekte waren vergleichbar mit der Iloprost-vermittelten HAS2-Expression und der HA-Synthese (Abbildung 9). Der selektive EP₁-Rezeptorantagonist SC19220 (10 μ M) zeigte keinen Effekt auf die Iloprost-medierte HAS2-Expression (Abbildung 9 A).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Iloprost über den IP-Rezeptor die HAS2-Expression und die HA-Synthese induziert.

Anschließend sollten mögliche Effekte von PGE₂ auf die HAS2-Expression und HA-Synthese untersucht werden.

PGE₂ bewirkte wie Iloprost eine deutliche Induktion der HAS2-mRNA und der HA-Akkumulation im Zellkulturmedium. Die Induktion der HAS2-mRNA betrug das $8,53 \pm 1,25$ - fache der Kontrolle und die HA-Synthese wurde gegenüber der Kontrolle um das $7,25 \pm 4,64$ - fache erhöht (Abbildung 10 A und B). Weiterhin war der Effekt von PGE₂ auf die HAS2-Expression konzentrationsabhängig und konnte ab 1 nM PGE₂ nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

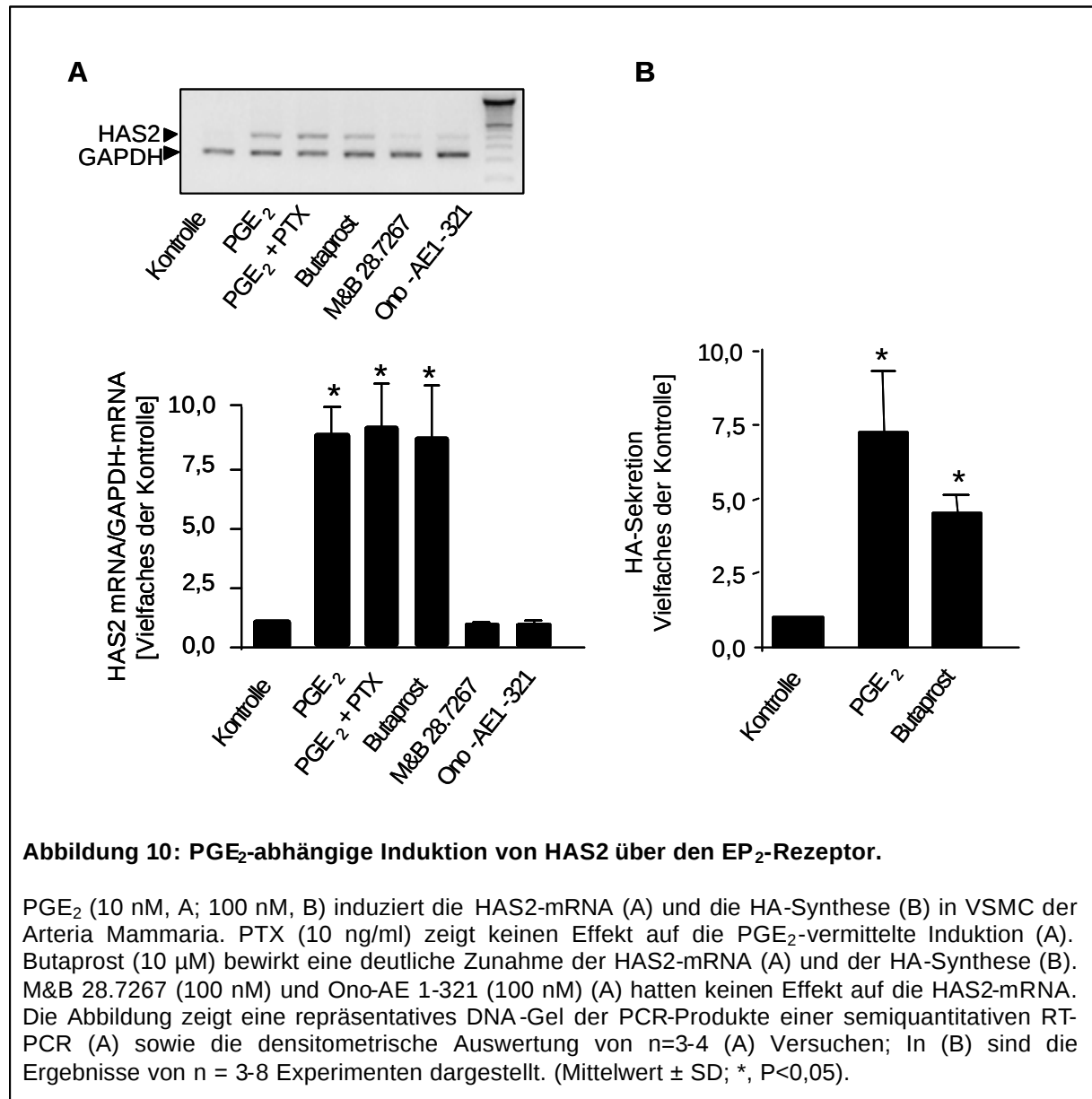
PGE₂ bindet sich als nicht-selektiver Ligand an alle 4 Prostaglandin E-Rezeptoren (EP₁₋₄) (Coleman et al., 1994). Anhand semiquantitativer RT-PCRs konnte die Expression aller 4 Prostaglandin E-Rezeptoren in hVSMC nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten), so dass anschließend der PGE₂-Rezeptor identifiziert werden sollte, der die HAS2-Induktion in hVSMC vermittelt.

Butaprost, ein selektiver EP₂-Rezeptoragonist (Gardiner, 1986) bewirkte einen Anstieg der HAS2-mRNA (Abbildung 10 A) und der HA-Synthese ($4,36 \pm 0,72$ – fach versus Kontrolle; Abbildung 10 B).

Analysen der HAS2-Expression in Anwesenheit von M&B28.767, einem EP₃-Rezeptoragonisten (Lawrence and Jones, 1992), führten zu keiner Veränderung in der HAS2-Expression. Pertussis Toxin (PTX) ein Inhibitor des G-gekoppelten EP₃-Rezeptors zeigte keine hemmende Wirkung auf die PGE₂-vermittelte HAS2-

Induktion, womit eine Bedeutung dieses Rezeptors für die Induktion ausgeschlossen werden konnte.

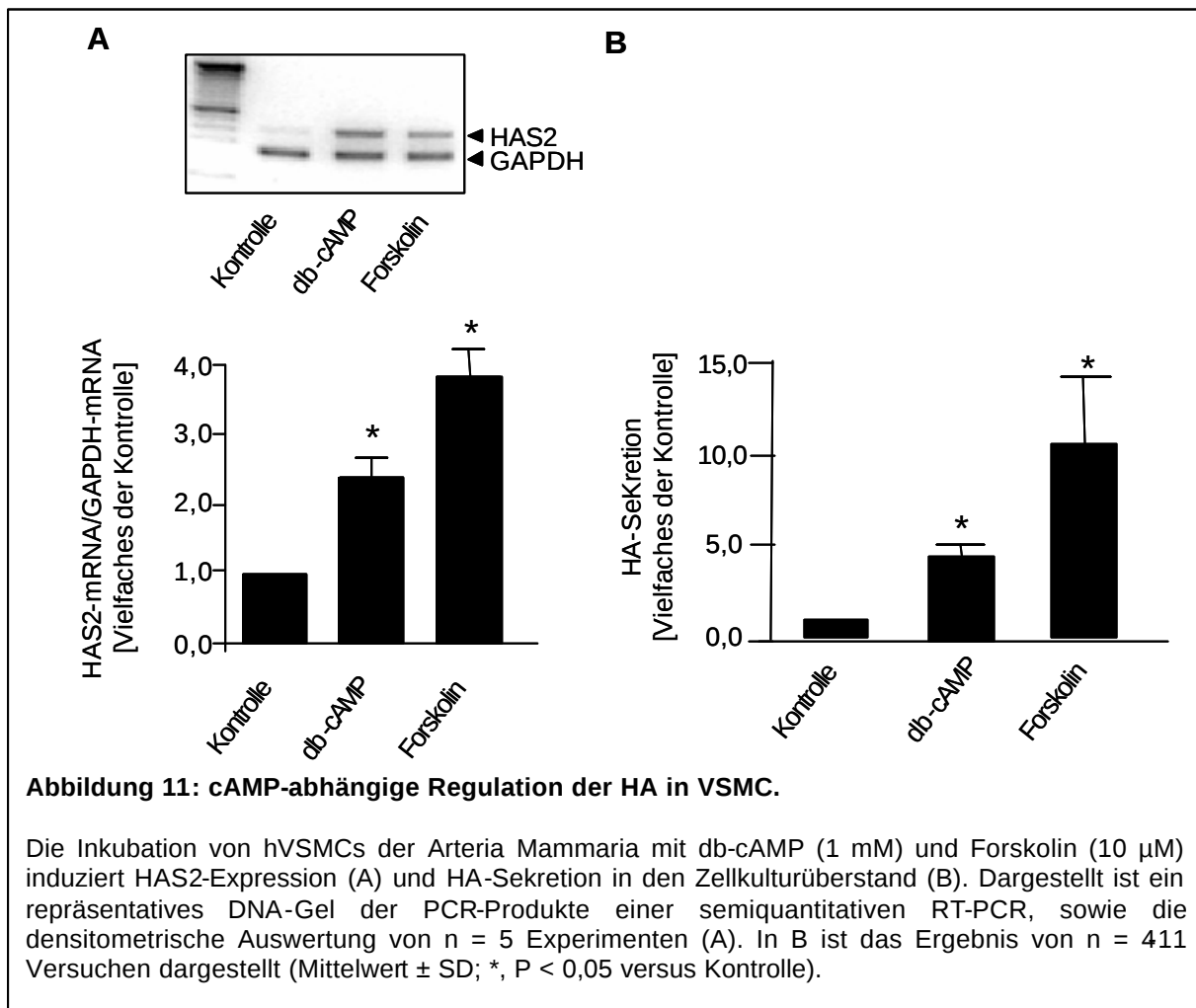
Die Stimulation des EP₄-Rezeptors mit dem Agonisten Ono-AE1-321 bewirkte ebenfalls keine Induktion der HAS2-Expression (Abbildung 10 A).



Die oben beschriebenen Stimulationsversuche mit spezifischen Prostanoidrezeptoragonisten und -antagonisten zeigten, dass Iloprost über den IP-Rezeptor und PGE₂ über den EP₂-Rezeptor die Induktion von HAS2 und der HA-Akkumulation vermitteln.

3.3.2 Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion

Die unter 3.3.1 identifizierten IP- und EP₂-Rezeptoren, die die HAS2-Induktion in Antwort auf Iloprost- bzw. PGE₂ vermitteln sind an stimulatorische GProteine (G_S) gekoppelt und bewirken über eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase, eine Erhöhung der cAMP-Konzentration und eine Aktivierung der PKA (Breyer and Breyer, 2001).



Dibutryl-cAMP (db-cAMP), ein zellpermeables cAMP-Analogon und Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylat-Zyklase wurden verwendet, um zu überprüfen ob cAMP als zweiter Botenstoff in die Regulation von HAS2 involviert ist. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation mit db-cAMP (1 mM) eine deutliche Zunahme der HAS2-mRNA und der HA-Akkumulation ($4,85 \pm 0,56$ – fach versus Kontrolle) bewirkte (Abbildung 11 A + B).

Die Inkubation mit Forskolin ergab eine Zunahme der HAS2-mRNA und auch die HA-Konzentration im Zellkulturüberstand erhöhte sich deutlich ($10,09 \pm 4,74$ – fach

versus Kontrolle). Die Effekte einer Forskolin-Stimulation (10 μ M) waren im Vergleich zu den db-cAMP-vermittelten Induktionen wesentlich stärker ausgeprägt.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der PKA in die erhöhte HAS2 Expression nach Stimulation der Gs-gekoppelten Prostanoid-Rezeptoren involviert war, wurde die Stimulation in Anwesenheit des PKA-Inhibitors, H89, durchgeführt. Die Koinkubation mit H89 (100 nM) reduzierte die Iloprost-induzierte HAS2-Expression (Abbildung 9 A) signifikant. Außerdem zeigten verschiedene Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) keinen Effekt auf die Iloprost-induzierte HAS2-Expression (nicht gezeigte Daten).

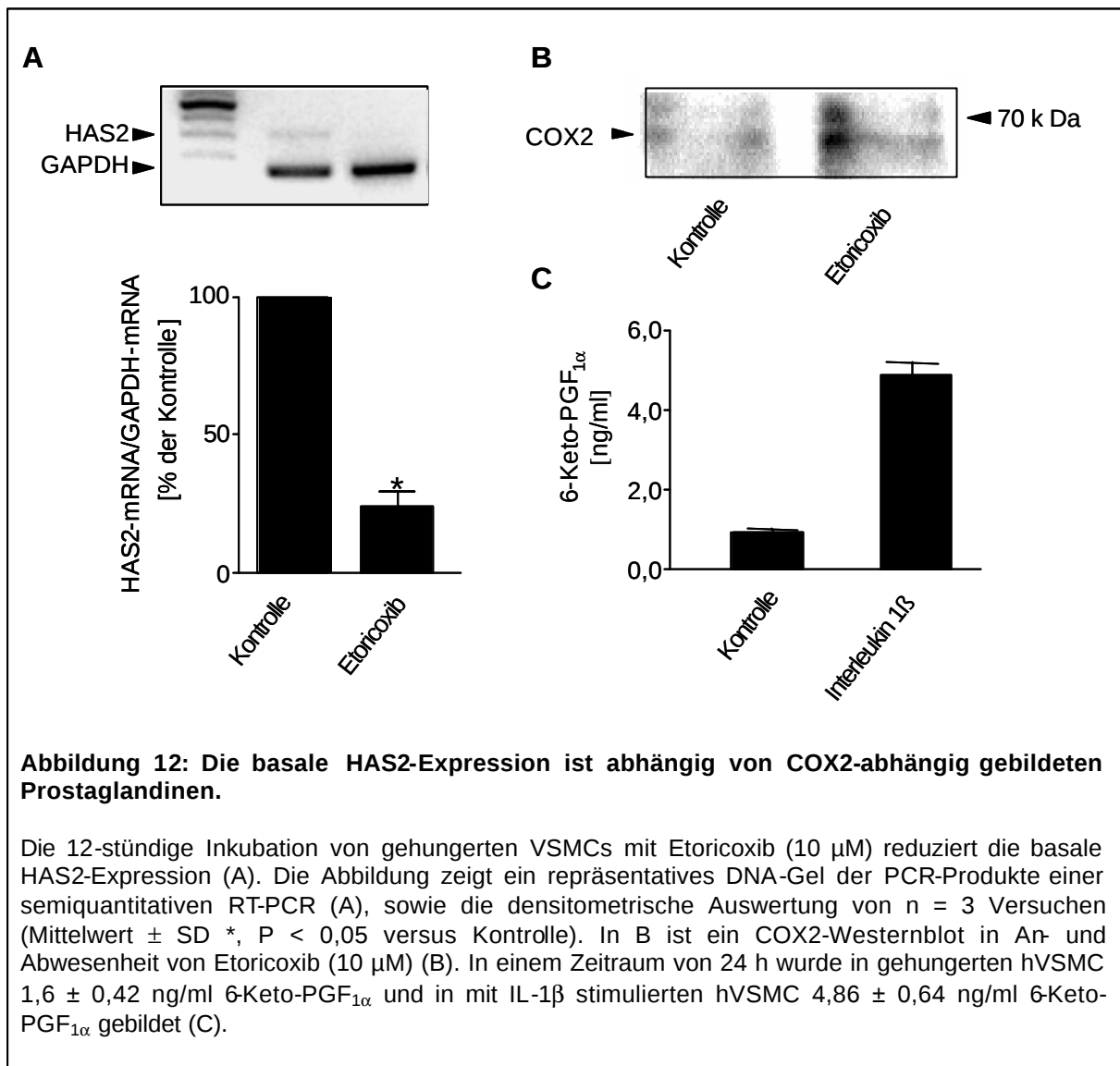
Die erzielten Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass die PGI_2 - und PGE_2 -medierte HA-Induktion durch cAMP als zweiten Botenstoff und nachfolgende Aktivierung der PKA vermittelt wird.

3.4 Regulation von HAS2 durch endogene Prostaglandine

Vasodilatierende Prostaglandine, wie PGI_2 und PGE_2 werden unter physiologischen Bedingungen durch COX1 synthetisiert und erfüllen vasoprotektive Funktionen, wie die Inhibierung der Proliferation und Migration von VSMCs. Während der Progression der Atherosklerose wird COX2 induziert, welche die Prostaglandin-Synthese in atherosklerotischen Gefäßen reguliert. Ein Effekt endogen synthetisierter Prostaglandine auf die HAS2-Expression, könnte daher auf eine mögliche physiologische Bedeutung hinweisen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in hVSMCs Iloprost und PGE_2 HAS2 induzieren und eine Zunahme der HA-Synthese erzeugten, sollte nachfolgend geprüft werden, ob endogen durch COX2 gebildete Prostaglandine ebenfalls die HAS2-Expression regulieren. Zu diesem Zweck wurde die HAS2-Expression in Abhängigkeit der COX2-Aktivität mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Etoricoxib, ein spezifischer COX2-Inhibitor, bewirkte nach 12-stündiger Inkubation eine starke Abnahme der basalen HAS2-Expression. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen konnte die HAS2-Expression (Abbildung 12 A) nicht mehr detektiert werden. Anschließend wurde die Proteinexpression von COX2 in An- und Abwesenheit von Etoricoxib mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 12 B). Es zeigte

sich keine Veränderung der COX2-Proteinkonzentration, bei gleichzeitiger Inkubation mit dem spezifischen COX2-Inhibitor.



Anschließend wurde die Konzentration von 6-Keto-PGF_{1α}, dem stabilen Metaboliten von PG_I₂, im Zellkulturüberstand gemessen (Abbildung 12 C). Die Messungen im Kulturüberstand unstimulierter VSMC zeigten, dass in einem Zeitraum von 24 h Konzentrationen von 1,6 ± 0,42 ng/ml 6-Keto-PGF_{1α} erreicht wurden. Durch Stimulation von hVSMC mit Interleukin 1β, einem potenten Induktor der COX2-Proteinexpression (Englesbe et al., 2004), stieg die Konzentration von 6-Keto-PGF_{1α} auf 4,86 ± 0,64 ng/ml 6-Keto-PGF_{1α}. Damit liegen die ermittelten Werte für 6-Keto-PGF_{1α} im Zellkulturmedium von unstimulierten und mit IL-1β-stimulierten Zellen

innerhalb des Konzentrationsbereichs, in dem eine Stimulation mit Iloprost bereits eine deutliche HAS2-Induktion vermittelt (siehe Abbildung 6).

3.5 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen atherosklerotischen Läsionen

In Zellkulturexperimenten mit humanen VSMCs wurde zunächst die Regulation der HA-Synthese durch PGI_2 und PGE_2 analysiert und die beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion identifiziert. Im Anschluss sollte nun überprüft werden, ob dieser Regulationsmechanismus auch während der Atherosklerose bedeutend sein könnte. Dazu wurden verschiedene immunhistochemische Untersuchungen an humanen atherosklerotischen Läsionen durchgeführt. Dabei wurde mittels des biotinylierten HA-Bindeproteins HA angefärbt, sowie die Expression von COX2 und dem EP_2 -Rezeptor nachgewiesen. Desweiteren wurden in den atherosklerotischen Plaques hVSMC mittels SM-Aktin und Makrophagen mittels des Makrophagenmarkers CD68 identifiziert.

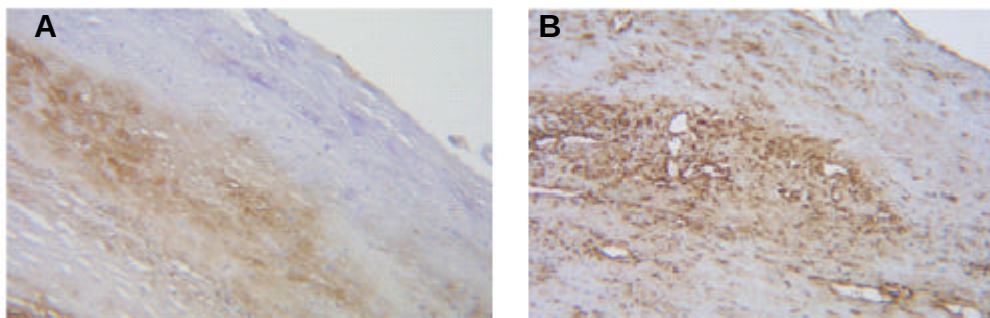


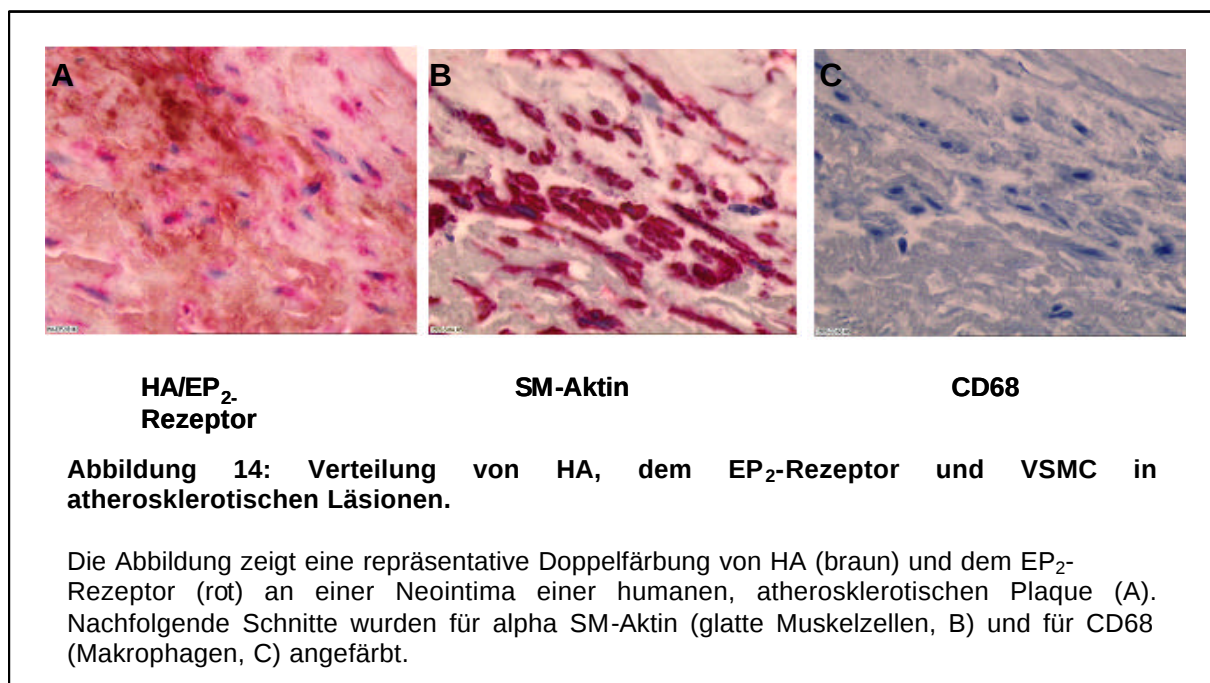
Abbildung 13: Kolokalisierung von HA und COX2 in humanen atherosklerotischen Läsionen der Arteria carotis.

Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von HA (A) und die immunhistochemische Darstellung von COX2 (B) an 2 konsekutiven Paraffinschnitten einer atherosklerotischen Plaque der Arteria carotis (40 - fache Vergrößerung). HA und COX2 sind mittels DAB braun angefärbt und die Zellkerne erscheinen mittels Hämalaun blau.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch 2 aufeinanderfolgende Schnitte einer der untersuchten Läsionen, in der sowohl HA angefärbt wurde (A) als auch COX2 (B). Im Bereich der Neointima zeigte sich eine starke HA-Akkumulation. Im Vergleich dazu, konnte an dem Folgeschnitt in diesen HA-positiven Bereichen eine verstärkte COX2-

Expression detektiert werden. Bei der Begutachtung aller untersuchten Plaque wurde die Kolokalisierung von HA und COX2 sehr häufig beobachtet. Allerdings gab es in jeder Plaque auch Areale, in denen entweder COX2 oder HA allein nachgewiesen wurden.

Anschließend wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Expression des EP₂-Rezeptors und HA bestand. Zunächst wurden Areale der Neointima, die reich an alpha-SM-positiven glatten Muskelzellen waren, mittels Doppelfärbung für HA (DAB) und für den EP₂-Rezeptor (Fast Red) angefärbt (Abbildung 14 A und B). Diese Areale enthielten keine Makrophagen, wie mittels der immunhistochemischen Anfärbung des Makrophagenantigens (CD68) gezeigt wurde (Abbildung 14 C).



Auch in Arealen, die reich an CD68-positiven Makrophagen waren, wurde eine starke COX2-Expression nachgewiesen. Auch hier zeigte sich häufig eine Kolokalisation von COX2, HA und dem EP₂-Rezeptor (Daten nicht gezeigt). Der IP-Rezeptor konnte nur auf Endothelzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die hVSMC der Neointima zeigten dagegen keine Expression des IP-Rezeptors (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigten die immunhistologischen Untersuchungen humaner atherosklerotischer Läsionen eine starke Expression von COX2, HA und EP₂-Rezeptoren im Bereich der Neointima, die sowohl glatte Muskelzellen als auch

Makrohagen enthielt. COX2 und HA waren häufig kolokalisiert und die hVSMC in HA-positiven Bereichen zeigten eine starke Expression des EP₂-Rezeptors.

3.6 Reduktion der HA-Synthese in humanen glatten Muskelzellen mittels RNA-Interferenz (RNAi)

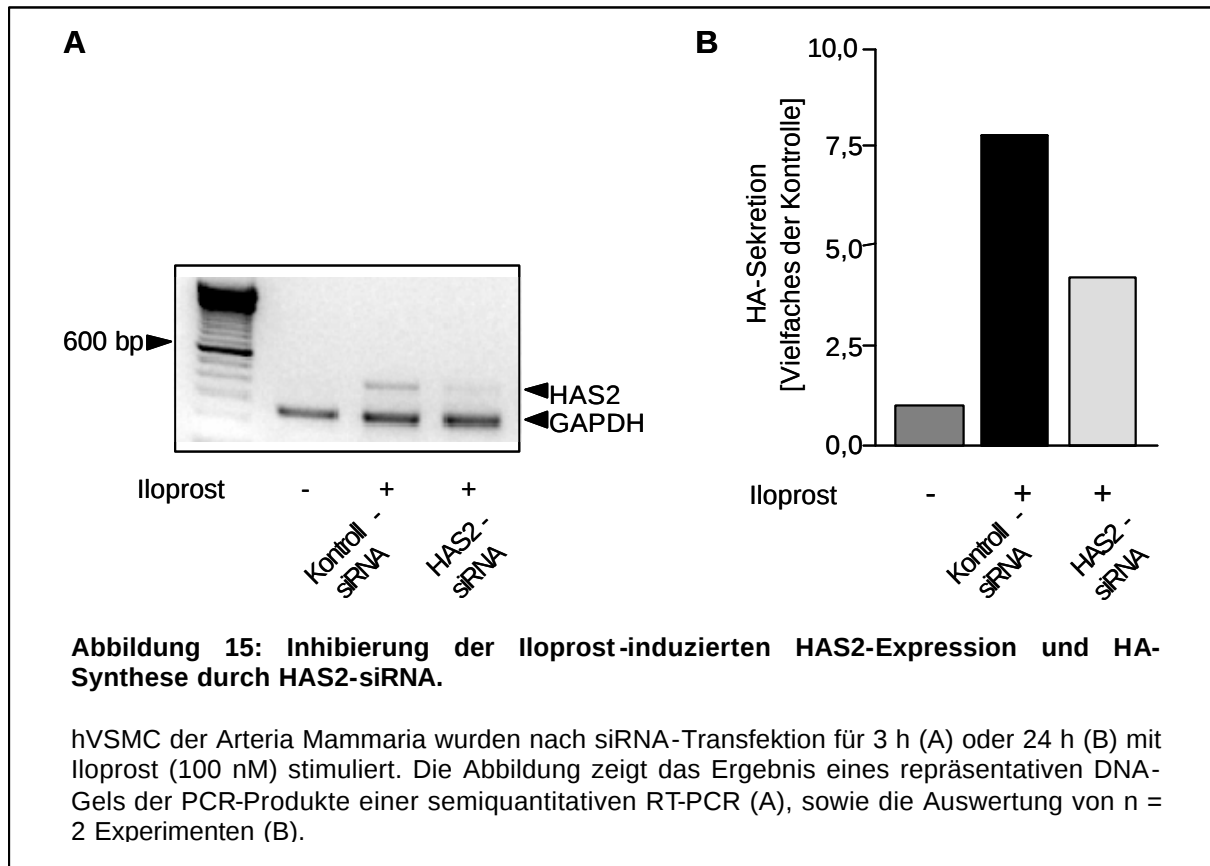
Wie in 3.1 und 3.2 beschrieben, bewirkte die Stimulation mit Iloprost (1-100 nM) in humanen VSMC sowohl eine Induktion der HAS2-Expression, als auch eine Zunahme der HA-Synthese.

In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte nun näher analysiert werden, ob die Iloprost-vermittelte Zunahme der HA-Sekretion tatsächlich durch HAS2 vermittelt wurde. Für diese Untersuchungen wurde die Methode der RNA-Interferenz in humanen VSMCs etabliert. Der Mechanismus der RNA-Interferenz beruht auf einer Degradierung der mRNA des Zielgens, wodurch ein genspezifischer „knock-down“ erzielt werden kann. Die Zellen wurden mit einer HAS2-spezifischen siRNA (small interfering RNA) und mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Überprüfung der HAS2-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR. Wie in Abbildung 15 A dargestellt, führte die Transfektion spezifischer HAS2-siRNA zu einer Reduktion der Iloprost-vermittelten HAS2-Induktion im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Die Kontroll-siRNA, verhinderte nicht den deutlichen Anstieg der HAS2-mRNA nach Stimulation mit Iloprost (100 nM).

Nachdem die Reduktion der HAS2-Expression mittels RNAi nachgewiesen wurde, sollte eine mögliche Reduktion der Proteinexpression untersucht werden. Da keine Antikörper gegen HAS2 zur Verfügung standen, wurde der Effekt von HAS2-siRNA auf die HA-Synthese betrachtet. Dafür wurden die Zellen wiederum mit HAS2- und Kontroll-siRNA transfiziert, nach 24 h für weitere 24 h mit Iloprost (100 nM) stimuliert und anschließend wurde die HA-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt.

Diese Untersuchungen ergaben eine Reduktion der HA-Menge um 48,06 % im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abbildung 15 B). In Zellen mit Kontroll-siRNA, konnte wiederum ein deutlicher Anstieg der HA-Synthese, nach Stimulation mit Iloprost gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die Transfektion spezifischer HAS2-siRNA die Iloprost-vermittelte HAS2-Induktion inhibiert und die

HA-Synthese reduziert werden konnte. Die Etablierung der RNA-Interferenz ermöglichte außerdem die nachfolgende Analyse der Funktion von HAS2 und der Bedeutung für den Phänotyp von hVSMCs.



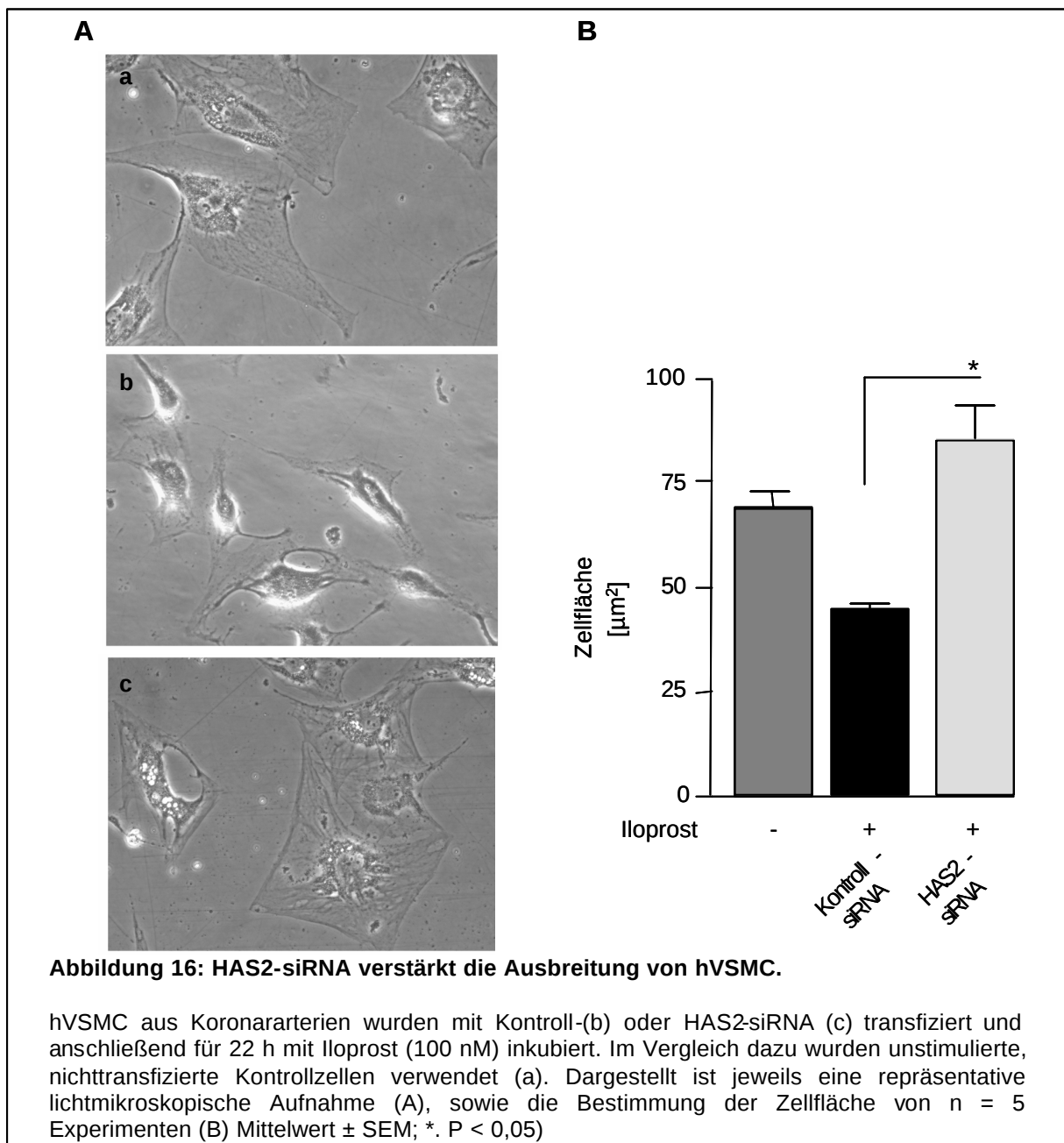
3.7 Untersuchungen zur Funktion von HAS2 in humanen VSMCs

Nachdem die Methode der RNA-Interferenz in hVSMC etabliert wurde, sollte nun die Funktion von HAS2 für den glattmuskulären Phänotyp näher analysiert werden. Dazu wurden Eigenschaften von hVSMC, die möglicherweise durch HA beeinflusst werden, untersucht.

3.7.1 Einfluss auf die Zellmorphologie

Perizelluläre HA-Mäntel könnten durch Interaktion mit den HA-Rezeptoren oder durch Interaktion mit Liganden von Integrinen die Zellgestalt und die Zelladhäsion beeinflussen. Die HAS2-siRNA-vermittelte Reduktion der HA-Synthese, könnte daher auch die Zellmorphologie verändern. Für die morphologischen Untersuchungen

wurden die Zellen mit Kontroll- und HAS2-siRNA transfiziert, nach 24 h für weitere 22 h mit Iloprost (100 nM) stimuliert und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.



Die Transfektion mit HAS2-siRNA erzeugte einen stark ausgebreiteten, hypertrophen Zellkörper. Das Zytoplasma erschien deutlich dünner und im direkten Kontakt mit der Zellkulturschale (Abbildung 16 c). Im Vergleich dazu, zeigten die Kontroll-siRNA-Zellen den charakteristischen Iloprost-vermittelten Phänotyp, mit abgerundetem Zytoplasma und einem vermindert ausgebildeten Zytoskelett (Abbildung 16 b).

Die Form der untransfizierten und unstimulierten Zellen zeigte Ähnlichkeiten zu den HAS2-siRNA transfizierten Zellen (Abbildung 16 a).

Ebenso wie die lichtmikroskopische Untersuchung, bestätigte die Quantifizierung der Zellfläche (μM^2) eine deutliche Zunahme der Zellausbreitung nach Transfektion mit HAS2-siRNA (Abbildung 16 B).

3.7.2 Veränderungen im Zytoskelett

Für die nachfolgenden Untersuchungen der HAS2-Funktion wurde nun der pro-atherogene Stimulus PDGF-BB verwendet, der vermehrt während der Atherosklerose gebildet wird, und der die HA-Synthese in ähnlichem Ausmaß wie Iloprost induziert (3.2.2).

Die in 3.7.1 identifizierten morphologischen Veränderungen unter dem Einfluss von Iloprost, konnten auch nach Stimulation mit PDGF-BB (20 ng / ml) nachgewiesen werden. Die Zellausbreitung wurde durch HAS2-siRNA deutlich verstärkt und das Zytoplasma erschien im direkten Kontakt mit dem Untergrund.

In weiteren Analysen wurden nun die Korrelation zwischen der veränderten Zellmorphologie und Veränderungen im Zytoskelett untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Aktin-Filamente, Bestandteile des Aktin-Zytoskeletts, mittels FITC-gekoppeltem Phalloidin dargestellt.

Weiterhin wurde Paxillin immunhistochemisch untersucht. Paxillin ist ein Protein des fokalen Adhäsionskomplexes (FA), welches nach Phosphorylierung durch FAK eine Interaktion zwischen der EZM und dem Zytoskelett vermittelt und essentiell für die Signaltransduktion der FA ist.

HAS2-siRNA induzierte eine starke Ausprägung definiert angeordneter Aktin-Stressfasern (grün) auf der Zelloberfläche (Abbildung 17 C, D). Im Vergleich dazu waren die Aktin-Filamente in den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, diffus im Zytoplasma verteilt und gering ausgeprägt. Paxillin (rot) war in den Zellen mit Kontroll-siRNA deutlich stärker exprimiert, als in den HAS2-siRNA-Zellen. In den Kontroll-Zellen konnten die fokalen Adhäsionspunkte verstärkt an den Ausgangspunkten der Aktin-Filamente, aber auch über den gesamten Zellkörper

verteilt nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigten sich nach Hemmung der HAS2-Expression durch HAS2-siRNA die Paxillin-positiven fokalen Adhäsionspunkte schwächer ausgeprägt.

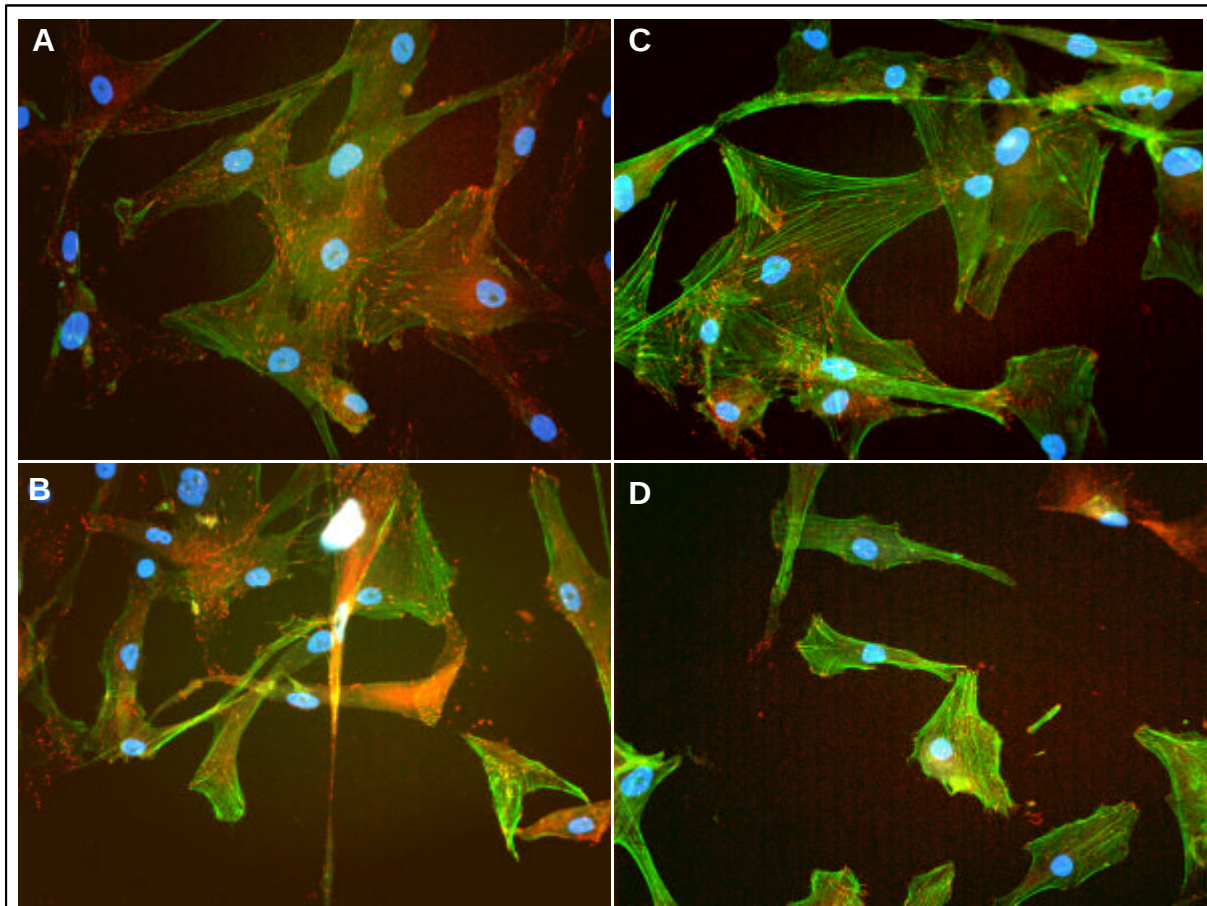


Abbildung 17: Effekt von HAS2-siRNA auf FA und die Ausbildung von Aktin-Stressfasern.

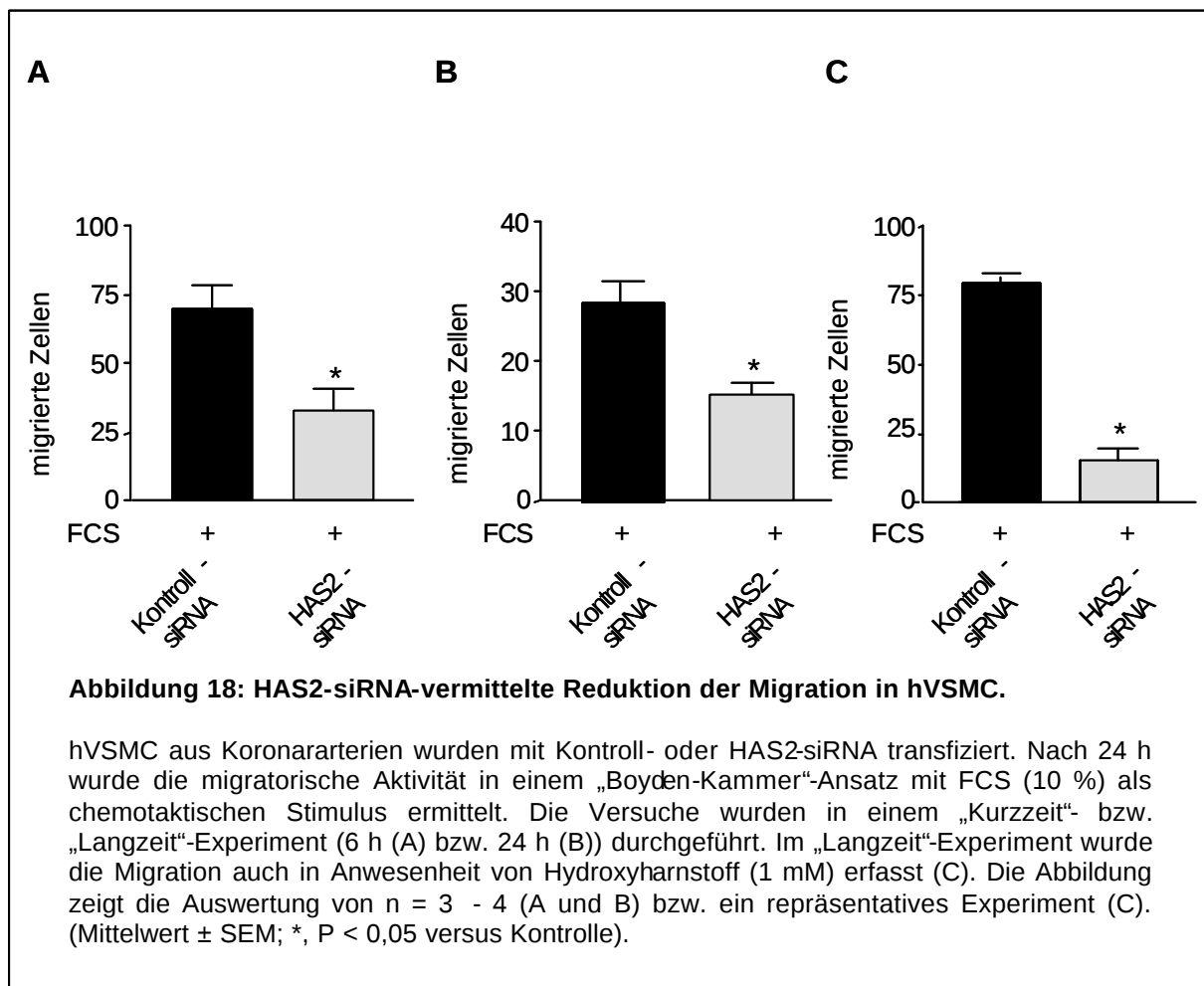
Nach der Transfektion mit Kontroll- (A, B) oder HAS2-siRNA (C, D) wurden hVSMC aus Koronararterien für 24 h mit PDGF-BB (20 ng / ml) stimuliert. In der Immunofluoreszenz ist Aktin grün, Paxillin rot und die Zellkerne blau dargestellt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Darstellung von n = 3 Versuchen.

3.7.3 Auswirkungen auf die Zellmigration

Das Zytoskelett und die FA befähigen die Zelle ihre Gestalt und Form zu variieren und sind essentiell für die gerichtete Bewegung der Zellen innerhalb der EZM. Da HAS2-siRNA starke Effekte auf die Morphologie und das Zytoskelett hatte, könnte auch die Migration der Zellen durch HAS2-siRNA beeinflusst werden.

Die Zellbewegung wurde zunächst mit der „Time-Laps“-Mikroskopie untersucht. Die Migration transfizierter und anschließend mit 10 % FCS stimulierter VSMCs, wurde über einen Zeitraum von 48 h mikroskopisch beobachtet und aufgenommen (nicht gezeigte Daten). Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen den Transfektionen mit Kontroll-siRNA und HAS2-siRNA festgestellt werden. Eine deutlich stärkere migratorische Aktivität zeigten die Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Um die Beobachtungen der „Time-Laps“-Mikroskopie zu bestätigen, wurde die Migration anschließend in einem „Boyden-Kammer“-Ansatz, mit FCS als chemotaktischen Stimulus weiter untersucht. Für diese Analysen wurde zum einen eine „Kurzzeit“-Inkubation (6 h), sowie eine „Langzeit“-Inkubation (24 h) ausgewählt, um auch eventuelle langfristige Auswirkungen auf die Migration erfassen zu können.



Eine Reduktion der Migration um $47,95 \% \pm 9,07$ konnte durch HAS2-siRNA nach 6-stündiger Inkubation gezeigt werden (Abbildung 18 A). Auch nach 24 Stunden

bewirkte HAS2-siRNA eine Abnahme der Migration um $51,63 \% \pm 1,43$ (Abbildung 18 B). In einem Zeitintervall von 24 h muss bei einem Teil der hVSMCs bereits mit Zellteilung gerechnet werden, wodurch die Zahl der Zellen auf der Unterseite der Membran unabhängig von der Migration ansteigen könnte. Daher wurde die Migration anschließend über 24 h bei gleichzeitiger Inkubation mit Hydroxyharnstoff, einem Proliferationsinhibitor analysiert. Die Abnahme der Migration war in Anwesenheit von Hydroxyharnstoff noch etwas stärker (Abbildung 18 C).

Die Ergebnisse belegen, dass durch den Verlust endogener HAS2 die migratorische Aktivität VSMCs verringert wird.

3.7.4 Analyse der Zellproliferation

HA fördert auch die Proliferation von hVSMC (Evanko et al., 1999). HA bildet durch die Interaktion mit zahlreichen EZM-Proteinen distinkte Strukturen aus, die sich als perizelluläre HA-Mäntel darstellen. Die perizellulären HA-Mäntel scheinen beispielsweise die Abrundung der Zelle während der Mitose zu erleichtern (Evanko et al., 1999). Möglicherweise wird HA sogar im Inneren der Zellen für die Mitose benötigt, da intrazelluläre und intranukleäre HA in mitotischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Evanko and Wight, 1999).

Die Proliferation ist ein wesentlicher Bestandteil des Phänotyps humaner VSMCs in atherosklerotischen Plaques. Im Rahmen der Untersuchungen zum Effekt von HAS2-siRNA auf die Zellteilung von hVSMC wurde die Zellzahl, die DNA-Neusynthese und die Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 betrachtet.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden VSMC mit Kontroll- und HAS2-siRNA transfiziert, über einen Zeitraum von 48 h unter Normalbedingungen kultiviert und anschließend mit PDGF-BB stimuliert.

Die verschiedenen Experimente zeigten Schwankungen in der gesamten Zellzahl, sodass die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle dargestellt wurden. Die Ermittlung der Zellzahl ergab eine deutliche Reduktion um $45,6 \% \pm 27,4$ durch HAS2-siRNA (Abbildung 19).

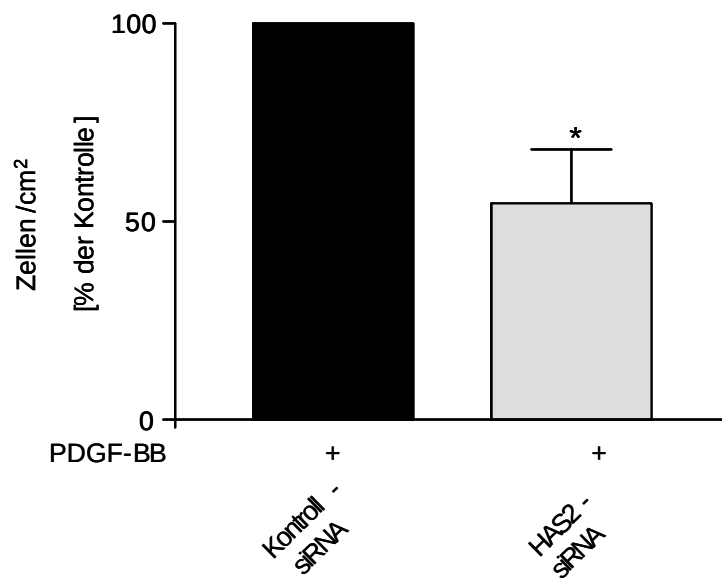
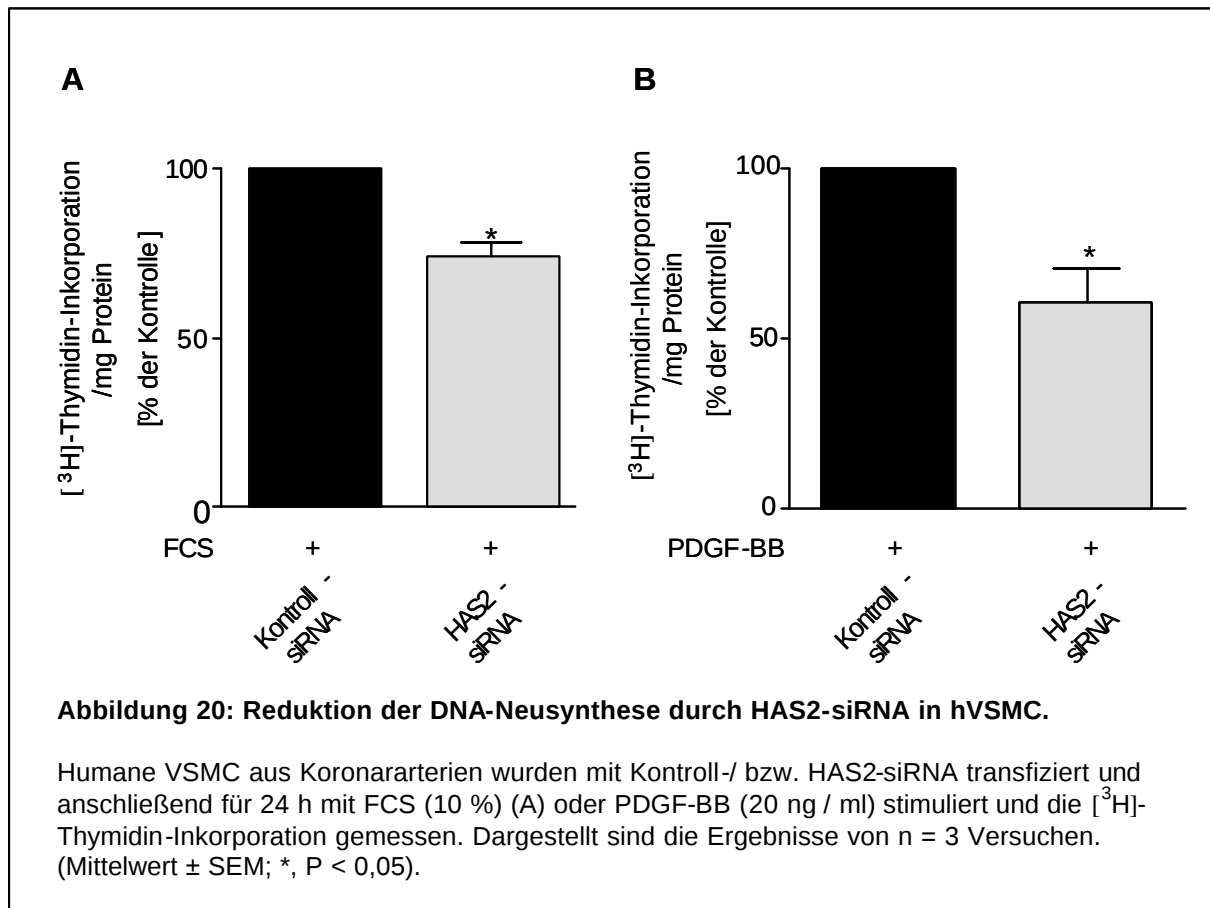


Abbildung 19: HAS2-siRNA bewirkt eine Verminderung der Zellzahl in hVSMC.

VSMC aus Koronararterien wurden 24 h nach der Transfektion mit Kontroll- oder HAS2-siRNA für 48 h mit PDGF-BB (20 ng / ml) stimuliert und anschließend wurde die Zellzahl ermittelt. Dargestellt ist das Ergebnis von n = 4 Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM; *, $P < 0.05$).

Zusätzlich wurde die Auswirkung der Transfektion mit HAS2-siRNA auf die DNA-Synthese, während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus untersucht. Zu diesem Zweck wurde [3 H]-markiertes Thymidin verwendet, dass in die neusynthetisierte DNA inkorporiert wird. Zunächst wurde die Inkorporation von [3 H]-Thymidin nach Stimulation mit 10 % FCS, einem sehr stark mitogenen Stimulus ermittelt. In nicht-transfizierten Zellen, bewirkte FCS eine ca. 8-fache Induktion der [3 H]-Thymidin-Inkorporation im Vergleich zu unstimulierten Zellen (nicht gezeigte Daten). Die Transfektion mit HAS2-siRNA verminderte die FCS-medierte [3 H]-Thymidin-Inkorporation um 26,21 % $\pm$ 7,18 im Vergleich zur Kontroll-siRNA. (Abbildung 20 A).

Anschließend sollte die DNA-Synthese unter dem Einfluss von PDGF-BB, einem pro-atherogenen Wachstumsfaktor, untersucht werden. HAS2-siRNA reduzierte die DNA-Synthese um 39,11 % $\pm$ 17 im Vergleich zur Kontroll-siRNA, (Abbildung 20 B), was auf eine Inhibierung der DNA-Synthese oder einen Zell-Zyklus-Arrest hindeutet.

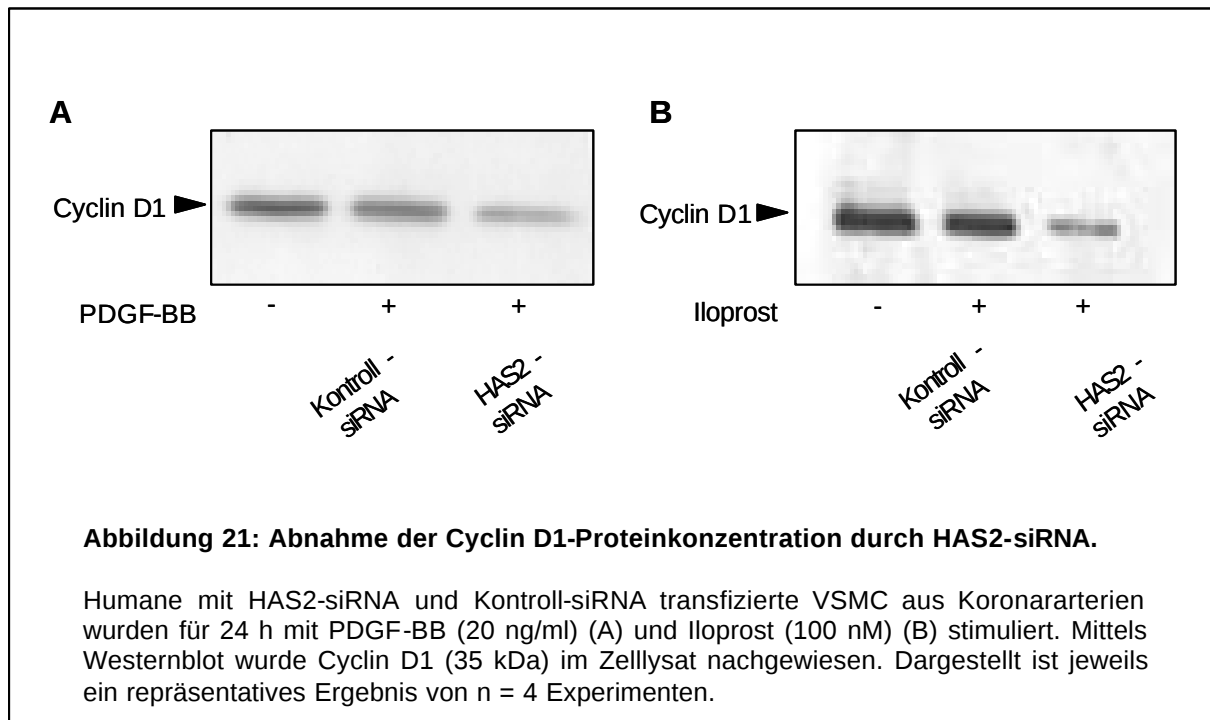


Der Zellzyklus, der den mehrstufigen Prozess der Proliferation steuert, besteht aus verschiedenen Phasen und wird mit der Mitose (Zellteilung) abgeschlossen. Die Progression des Zellzyklus wird gesteuert von Cyclinen und diversen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die über Bindung an die regulatorische Untereinheit der Cycline, diese aktivieren und den Übergang in die nächste Zyklusphase induzieren. Eine essentielle Komponente für die Zell-Zyklus-Progression ist das Cyclin D1. Dieses Protein reguliert durch die Bindung der regulatorischen Untereinheit an CDK 4 und 6 das Fortschreiten durch die G₁-Phase und den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus (Sherr et al., 1999; Bornfeldt, 2003).

Da die Effekte der HAS2-siRNA auf die Zellzahl und auf die DNA-Neusynthese einen Zell-Zyklus-Arrest andeuten, sollte nun die Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 mittels Westernblot-Analyse überprüft werden.

Die Reduktion endogener HAS2-Expression bewirkte eine verminderte Cyclin D1-Proteinexpression in PDGF-BB stimulierten hVSMCs im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abbildung 21 A). Diese verminderte Cyclin D1-Konzentration konnte auch nach Stimulation mit Iloprost beobachtet werden (Abbildung 21 B), welches auf einen

HAS2-spezifischen und Stimulus-unabhängigen Effekt hinweist. Die Beladung mit einer gleichmäßigen Proteinkonzentration wurde durch das Anfärben des SDS-Polyacrylamidgels (mit Coomassie-Blau) und durch den Nachweis von beta-Aktin als Referenzprotein (nicht gezeigte Daten) sichergestellt.



Die beschriebenen Experimente legen nahe, dass der Verlust endogener HAS2 in hVSMC eine deutliche Abnahme der Zellzahl, eine Reduktion der DNA-Synthese sowie eine verminderte Proteinkonzentration von Cyclin D1 nach sich zieht.

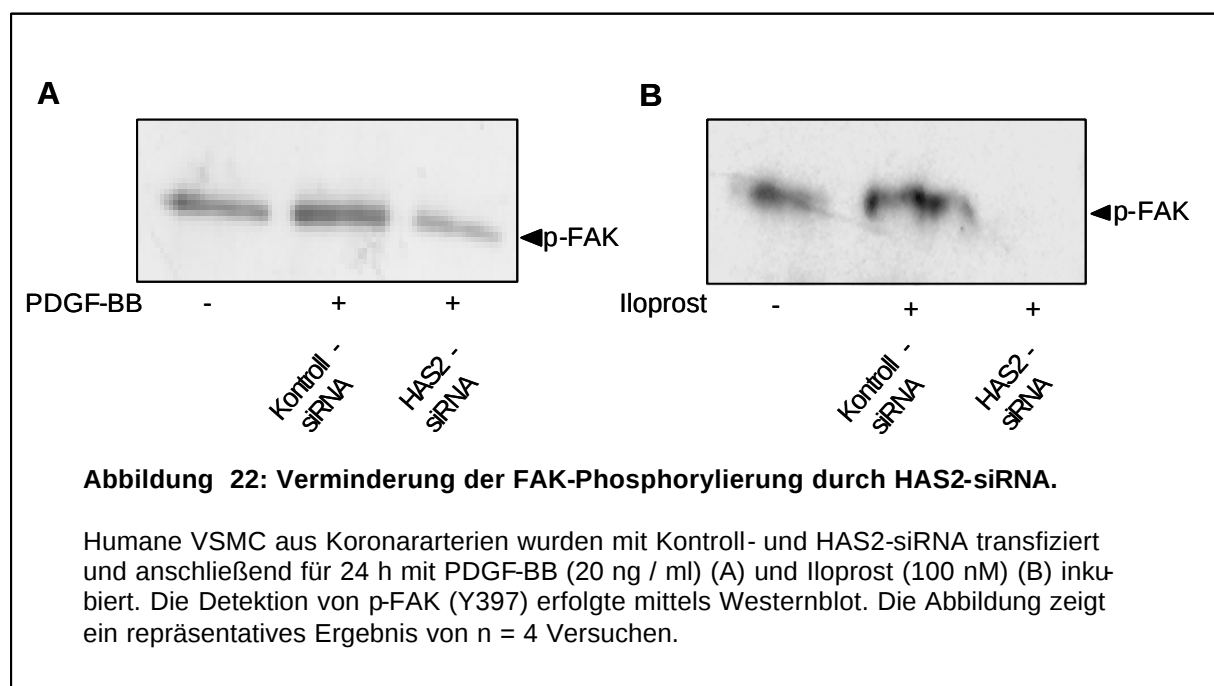
3.8 Untersuchungen zu möglichen Mechanismen des HAS2-vermittelten Phänotyps von hVSMC

Mit der Methode der RNA-Interferenz konnten verschiedene Funktionen von HAS2 hinsichtlich des Phänotyps von VSMC nahe gelegt werden. Die Transfektion spezifischer HAS2-siRNA bewirkte eine Zunahme der Zellausbreitung, sowie die verstärkte Ausbildung von Aktin-Stressfasern. Ferner reduzierte HAS2-siRNA die migratorische Aktivität und die Zellproliferation. Im Anschluss sollten nun mögliche Mechanismen identifiziert werden, die für die HAS2-vermittelten Veränderungen verantwortlich sein könnten.

3.8.1 Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK)

Ein möglicher Signaltransduktionsweg wird über die FA vermittelt. Die FA ermöglichen die Weiterleitung von Signalen, die durch Integrin-vermittelte Interaktion mit der EZM entstehen. FA sind essentiell für die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts, die Migration und die Proliferation (Mirza et al., 2004). Eine essentielle Komponente für die FA-vermittelte Signaltransduktion, stellt die FAK dar. FAK ist eine Tyrosinkinase, deren Aktivierung für die oben aufgezählten zellulären Prozesse essentiell ist. Die Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle von FAK am Tyrosin 397 (Y397) ist der initiale Prozess für die FAK-Aktivierung (Owen et al., 1999). Diese Y397-abhängige FAK-Aktivierung führt zur Rekrutierung der cSrc-Kinase und zur nachfolgenden Tyrosinphosphorylierung weiterer FAK-Phosphorylierungsstellen.

Der Phosphorylierungsgrad der Autophosphorylierungsstelle Y397, als Maß für die Aktivität von FAK, sollte nun nach Transfektion mit HAS2-siRNA mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht werden.



Die Analysen zeigten eine Dephosphorylierung von FAK nach Transfektion mit HAS2-siRNA, im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Die Dephosphorylierung trat unabhängig vom Stimulus auf und konnte sowohl nach Stimulation mit PDGF-BB als auch mit Iloprost nachgewiesen werden (Abbildung 22 A und B).

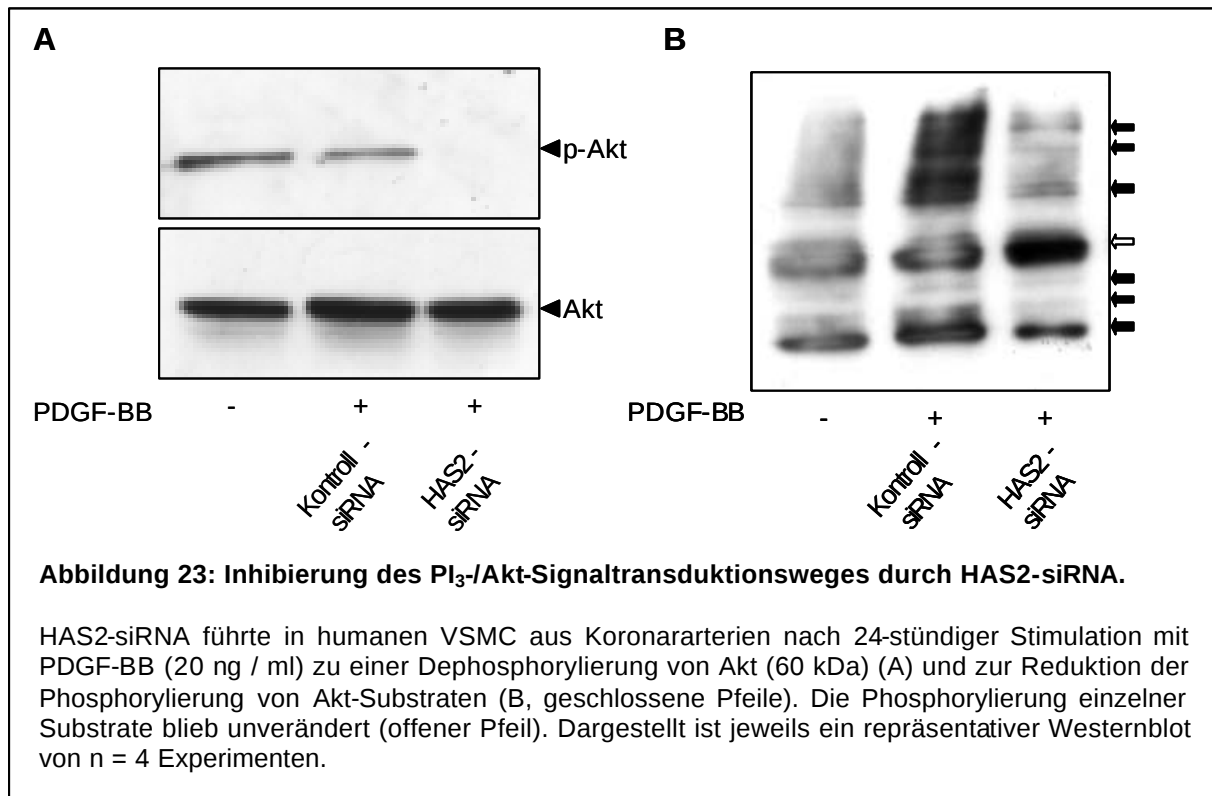
Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde in den Experimenten durch die Anfärbung des SDS-Polyacrylamidgels (Coomassie-Blau) und den Nachweis von beta-Aktin als Referenzprotein überprüft.

Die Transfektion mit HAS2-siRNA erzeugte in VSMC eine Dephosphorylierung von FAK an der Autophosphorylierungsstelle Y397. Die verminderte FAK-Phosphorylierung könnte die FA-medierte Signaltransduktion hemmen und so zu der beobachteten Hemmung der Migration und Proliferation (3.7.3 und 3.7.4) führen.

3.8.2 PI_3 -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion

Phosphorylierte Lipide werden an der Zellmembran während der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden gebildet und können so unterschiedliche zelluläre Prozesse regulieren. Eine wichtige Bedeutung haben diese Lipide in der Signaltransduktion, die von der Phosphoinositol-3-Kinase (PI_3 -Kinase) vermittelt wird. Die Rekrutierung zahlreicher Signalmoleküle an die Plasmamembran wird durch die PI_3 -katalysierte Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP_3) bzw. Phosphatidylinositol-3,4,-Bisphosphat (PIP_2), reguliert. PIP_3 induziert die Translokation von Akt (Protein-Kinase B) an die Membran, die dort durch Phosphorylierung aktiviert wird. Da die PI_3 -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion verschiedene zelluläre Prozesse in VSMC regulieren kann, wie die Migration, das Wachstum, die Zell-Zyklus-Progression oder die Apoptose, sollte ein möglicher Effekt von HAS2-siRNA auf diesen Signalweg untersucht werden.

Zunächst wurde der Phosphorylierungsgrad von Akt an der Phosphorylierungsstelle (Ser 473), als Maß für die Aktivität, mittels Westernblot-Analysen ermittelt. HAS2-siRNA bewirkte eine Dephosphorylierung von Akt im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Die Gesamtexpression von Akt blieb auch nach Transfektion mit HAS2-siRNA nahezu unverändert (Abbildung 23 A). Der verminderte Phosphorylierungsgrad von Akt, weist auf eine reduzierte Akt-Aktivität hin.



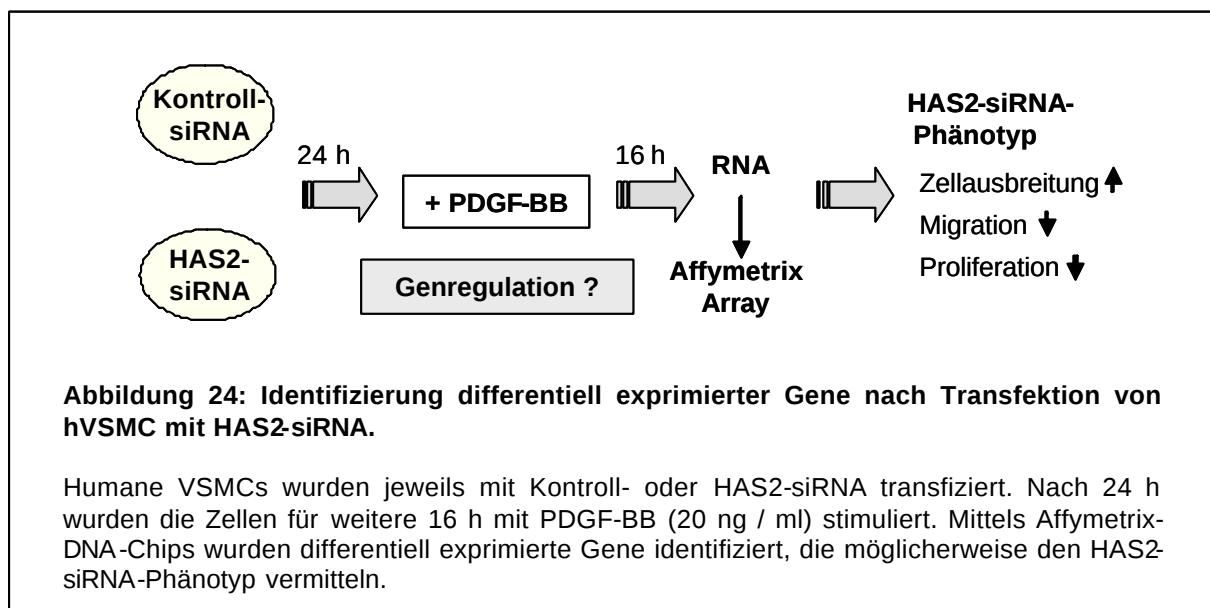
Ein weiteres Kriterium der Aktivität von Akt ist zusätzlich zum Akt-Phosphorylierungsgrad die Phosphorylierung der Akt-Substrate. Die phosphorylierten Akt-Substrate wurden daher mittels Westernblot-Analysen nach Transfektion mit HAS2-siRNA nachgewiesen. Die Transfektion mit HAS2-siRNA erzeugte eine verminderte Phosphorylierung zahlreicher Akt-Substrate (Abbildung 23 B; geschlossene Pfeile). Andererseits blieb der Phosphorylierungsgrad einzelner Substrate unbeeinflusst (offener Pfeil).

Die HAS2-siRNA-induzierte Dephosphorylierung von Akt ging somit auch mit einer Reduktion der Phosphorylierung einzelner Akt-Substrate einher.

Zusammengefasst führt HAS2-siRNA zu einer Hemmung der PI_3 -Akt-abhängigen Signaltransduktion, so dass dieser Signaltransduktionsweg für die verschiedenen, in 3.7 identifizierten, phänotypischen Veränderungen verantwortlich sein könnte.

3.8.3 HAS2-abhängige Veränderung der Genexpression

Mit der Methode der RNA-Interferenz wurde zunächst die Funktion von HAS2 für die Proliferation und Migration humaner VSMCs analysiert. Die Transfektion spezifischer HAS2-siRNA bewirkte in VSMCs im Vergleich zur Kontroll-siRNA eine starke Reduktion der FCS-vermittelten Migration sowie einen Zellzyklusarrest und Veränderungen in der Zellmorphologie. Anhand von DNA-Mikroarrayanalysen sollten nun neue Kandidatengene identifiziert werden, die unter Stimulation mit PDGF-BB durch HAS2-siRNA differentiell exprimiert werden. Für die Expressionsanalysen wurde ein Zeitpunkt von 36 h nach Transfektion ausgewählt. Da die phänotypischen Veränderungen 48 h nach Transfektion mit HAS2-siRNA beobachtet wurden, sollten so Gene identifiziert werden, welche möglicherweise die phänotypischen Veränderungen in VSMCs erzeugten.



Für die Expressionsanalysen, wurden humane VSMCs jeweils mit Kontroll- und HAS2-siRNA transfiziert und nach 24 h für weitere 16 h mit PDGF-BB stimuliert. Die präparierte RNA wurde wie in 2.5 beschrieben weiter verarbeitet und anschließend jeweils auf einem HG_U95Av2-Array hybridisiert.

In der Analyse der beiden Einzelexperimente wurden zunächst verschiedene Kontrollen zur Überprüfung der Qualität bestimmt (Tabelle 7). Eine dieser Kontrollen, waren die jeweiligen Hintergründe der Chips, die in beiden Experimente keine großen Differenzen zeigten. Die entstandenen Hintergrundsignale, die durch

Autofluoreszenz der Arrayoberfläche oder unspezifische Bindungen entstehen könnten, konnten daher vernachlässigt werden. Ein weiteres Kriterium für die Qualitätskontrolle der Hybridisierung war die durchschnittliche Signalintensität der Kontrollen bioB, bioC, bioD, creX, die in beiden Experimenten „vorhanden“ waren. Da die Kontroll-Gene in beiden Experimenten vorhanden waren, konnte von einer ausreichenden Hybridisierungsqualität beider Chips ausgegangen werden. Ferner gab der Quotient der „durchschnittlichen Unterschiede“ (AD-Werte) der „Referenz“-Kontrollen GAPDH und β -Actin Aufschluss über die Qualität der *in-vitro* Transkription und sollte im Bereich von 1 bis 2 liegen.

Tabelle 7 : Kontrollen in den Mikroarrayanalysen.

	Kontroll-siRNA	HAS2-siRNA
Hintergrund	59,57	60,08
„Spike“-Kontrollen	Absolute Signalintensität	Absolute Signalintensität
BioB	vorhanden	vorhanden
BioC	vorhanden	vorhanden
BioD	vorhanden	vorhanden
CreX	vorhanden	vorhanden
„Referenz“-Kontrollen	durchschnittliche	durchschnittliche
AD 3`/5`GAPDH	Unterschiede	unterschiede
AD 3`/5` β -Actin	0,95	0,99
	1,15	0,94

Nachdem die Qualitätskontrollen beider Einzelexperimente erfüllt wurden, konnte die Identifizierung differentiell exprimierter Gene erfolgen. Dazu wurden in einer vergleichenden Expressionsanalyse, die Signalintensitäten beider Einzelexperimente miteinander verglichen. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA diente als Kontrolle und die Signalintensitäten des HAS2-siRNA-Experiments wurden auf die Kontrolle normiert. Bei der Auswertung wurden nur die Gene berücksichtigt, die im Vergleich zur Kontrolle einen „unterschiedliche Signalintensität“ (DC) von Zunahme (I) oder Abnahme (D) aufwiesen, der $\geq$ oder $\leq$ 2 war. Gene die einen „marginalen Unterschied“ (MC) zeigten, wurden in die Auswertung nicht einbezogen.

Die verschiedenen identifizierten Gene, wurden in funktionelle Gruppen zusammengefasst, die in Abhängigkeit der HAS2-siRNA entweder eine höhere (Zunahme; I) oder geringere Signalintensität (Abnahme; D) aufwiesen (Tabelle 8).

Die Faktoren der Regulation wurden als Gesamtunterschied (FC) angegeben und berechneten sich aus $2^{\text{Signal Log Ratio}}$ bzw. $-2^{\text{Signal Log Ratio}}$.

Tabelle 8: Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene

Genklassifizierung	DC	Signal Log Ratio	FC
EZM	Zunahme (I); Abnahme (D)		
matrix-metalloproteinase 10	I	4,9	29,86
matrix-metalloproteinase 8	I	4,3	19,7
tenascin-C	I	1,4	2,64
tissue inhibitor of MMP-3	D	-1,3	2,46
tsg-6	I	1,5	2,64
versikan (V3)	D	-1,2	2,3
collagen alpha-2 type 1	D	-1,5	2,83
collagen VI alpha-2	D	-1,1	2,14
collagen alpha-1 type XV	D	-1,1	2,14
collagen type 1 alpha 1	D	-1	2
collagen VI alpha-1	D	-1	2
Rezeptoren			
NOT (steroid/thyroid hormone receptor)	I	4,1	17,15
N-formylpeptid-Rezeptor	D	-2,2	4,59
TR3-orphan-Rezeptor	I	1,5	2,83
major group rhinovirus receptor (HRV)	I	1,6	3,03
B2-Bradykinin-Rezeptor	I	1,8	3,48
Transferrin-Rezeptor	D	-1,2	2,3
Transkriptionsfaktoren			
Activating transcription factor 3 (ATF3)	I	2,1	4,29
cellular oncogene c-fos	I	2	4
musculin	I	1,4	2,64
Zellzyklus			
BRCA2	D	-3,4	10,56
retinoblastoma protein (RB protein)	D	-2,79	7,76
CDK8 protein kinase	D	-2,5	5,66
replication factor C	D	-1,7	3,25
proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	D	-1,5	2,83
cyclin G1	D	-1,3	2,46
Cdc 6 related protein (cell-division-cycle)	D	-1,2	2,3
cyclin G1-interactin protein	I	1,3	2,46
Wachstumsfaktoren			
gene for granulocyte colony-stimulating factor	I	7,1	137,2
amphiregulin (EGF-like growth factor)	I	4,1	17,15
melanoma growth stimulatory activity gene	I	3	8
bone morphogenetic protein 2A (BMP-2A)	I	2,6	6,06
transforming growth beta-induced factor (TGIF)	I	1,2	2,3
basic fibroblast growth factor 2	I	1,6	3,03
Cytoskelett			
epidermal keratin type I	D	-1,9	3,73
calmodulin (CALM1)	D	-1,2	2,3
plectin	D	-1,2	2,3
vascular smooth muscle alpha-actin	D	-1,1	2,14
microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2)	D	-1,1	2,14
microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	D	-1,1	2,14

caldesmon	D	-1,1	2,14
Apoptose			
melanoma differentiation-associated gene 7 (MDA-7)	I	5,3	39,4
DRAK2	D	-4,7	25,99
early growth response 2 protein (EGR2)	I	3,3	9,85
radiation-inducible immediate-early gene (IEX-1)	I	2,4	5,28
Bcl-2 related protein (BFI-1)	I	1,8	3,48
SOX-4	I	1,6	3,03
Proteinkinasen			
MAPKAPK-3	D	-1,7	3,25
thymidine kinase	D	-1,4	2,64
AMP-activated protein kinase alpha-1	D	-1,3	2,46
serine/threonine kinase (EPK2)	D	-1	2
GTP-/Ras-assoziiert			
ras inhibitor	D	-2,1	4,29
ras-related protein Rab5b	D	-2,1	4,29
GTP-binding protein Rap2 , ras-oncogene-related	D	-1,8	3,48
GTP-binding protein Ral , ras-oncogene-related	D	-1,1	2,14
PTPL1-associated RhoGAP	D	-1,3	2,46
GTP-binding protein Rab6	D	-1,1	2,14
GTPase Gem	I	1,4	2,64
Phosphatasen			
protein-tyrosine-phosphatase D1	D	-2,3	4,92
phosphatase 2A	D	-1	2
Lipidstoffwechsel-assoziierte Gene			
cyclooxygenase-2 (COX-2)	I	3,3	9,85
adipogenesis inhibitory factor	I	2,7	6,5
Transporter			
organic anion transporter OAT	I	3,9	14,93
monocarboxylate transporter homologue MCT6	I	2,3	4,92
glutamate transporter	D	-1,1	2,14
Zell-Oberflächen-Proteine			
annexin II	D	-1,3	2,46
cadherin-13	D	-1	2
BRAVO NrCAM-precursor	I	3,3	9,85
Membranproteine			
membrane glycoprotein gp130	D	-1,8	3,48
BENE	D	-1,8	3,48
membrane glycoprotein 4F2 antigen heavy chain	I	1,2	2,3
metabolische Enzyme			
oligo A synthase E	I	2,6	6,06
manganese superoxide dismutase	I	1,9	3,73
aldose reductase	I	1,2	2,3
inactive palmitoyl-protein thioesterase-2i (PPT 2)	D	-1,9	3,73
retinol dehydrogenase	D	-1,8	3,48
ATP synthase alpha	D	-1,4	2,64
GTP-specific succinyl-CoA synthase beta	D	-1,1	2,14
mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD)	D	-1,7	3,25
Immunsystem			
putative IL-16 protein precursor	D	-2,7	6,5
autoantigen DFS70	D	-2,1	4,29
cytokine (GRO-gamma)	I	4,6	24,25
cytokine (GRO-beta)	I	4	16
prointerleukin 1 beta	I	3,3	9,85

interleukin 1-beta (IL-1β)	I	3,2	9,19
monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3)	I	2,9	7,46
interleukin-1 receptor antagonist	I	2,5	5,66
chemokine alpha 3 (CKA-3)	I	2,2	4,59
interferon-beta-2	I	1,9	3,73
interferon-inducible peptide	I	1,5	2,83
interferon-inducible protein 9-27	I	1,3	2,46
Transferasen			
O-linked GlcNAc transferase	D	-1,4	2,64
beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II (MGAT2)	D	-1,3	2,46
beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (SIAT 4A)	I	1,5	2,83
Proteasen			
serine protease	D	-1,2	2,3
calpain-like protease	D	-1,2	2,3
Cytochrom-assoziierte Gene			
dioxin-inducible cytochrome P450 (CYP1B1)	I	2,4	5,28
nucleäre Gene			
nuclear cap binding protein	D	-3,6	12,13
nuclear factor NF-IL6	I	1,3	2,46
Andere			
apM1	I	4,3	19,7
human heat-shock protein HSP70B	I	2,6	6,06
plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)	I	1,4	2,64

HAS2-siRNA bewirkte in VSMCs eine Herauf- bzw. eine Herunterregulierung zahlreicher Gene. Die identifizierten Gene konnten anhand der Literatur verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet werden, wie z.B. der Regulierung der Zell-Zyklus-Progression (z. B. Cyclin G1; CDK 8), der Apoptose (z. B. MDA-7; EGR2) oder der Ras-abhängigen Signaltransduktion (z. B. Ras-Inhibitor; Rab 6). Weiterhin deutet die Regulation von diversen zytoskelettären Genen (z. B. Caldesmon; Calmodulin) auf eine Funktion von HAS2 für die Zusammensetzung des Zytoskeletts hin. Zusätzlich induzierte die Transfektion mit HAS2-siRNA die Regulation zahlreicher EZM-Gene, was auf einen Einfluss von HAS2 auf die Zusammensetzung der EZM hindeutet. HAS2-siRNA induzierte beispielsweise eine deutliche Heraufregulierung der Gene für die Matrix-Metalloproteinasen 8 und 19. Desweiteren, kam es zu einer Induktion von Tsg-6 und zu einer verminderten Expression von Versikan (V3). Beide Proteine sind direkte Interaktionspartner von HA im perizellulären Mantel und Extrazellulärraum.

Die Expression von COX2, wurde unter dem Einfluss von HAS2-siRNA induziert, welches möglicherweise einen „Rückkopplungs“-Mechanismus darstellen könnte, mit dem die Zellen der verminderten HAS2-Expression entgegenwirken.

Zusammenfassend führte die Hemmung der HAS2-Expression und der HA-Synthese zu zahlreichen phänotypischen Veränderungen der VSMCs. Die Transfektion mit HAS2-siRNA bewirkte eine Dephosphorylierung von FAK und eine Inhibierung des PI_3 -Kinase/Akt-abhängigen Signalweges. Zusätzlich wurden verschiedene morphologische Veränderungen, wie eine verstärkte Zellausbreitung oder zytoskelettäre Veränderungen, wie die verstärkte Ausprägung von Aktin-Stressfasern gezeigt. Anhand der Expressionsanalysen konnten differentiell regulierte Gene identifiziert werden, wie z. B. EZM- oder Zellzyklus- assoziierte Gene, welche an der Veränderung des Phänotyps der hVSMC nach HAS2-siRNA beteiligt sein könnte. Desweiteren, vermittelte HAS2-siRNA eine Reduktion der migratorischen Aktivität, induzierte ein Zellzyklus-Arrest und hemmte die Proliferation von hVSMC.

4 Diskussion

Das GAG HA wird durch 3 membranständige HA-Synthasen (HAS 1-3) synthetisiert, die aktivierte Zuckermoleküle zu einem Polysaccharid verknüpfen, bestehend aus β -1,4-verknüpften N-Acetylglukosaminen und β -1,3-verknüpfter D-Glucuronsäure. Das hochmolekulare Molekül wird in das Interstitium sezerniert, in dem es durch die Interaktion mit Tsg-6, Versikan und α 1, einen perizellulären HA-Mantel ausbilden kann. Zusätzlich kann HA als kettenförmiges EZM-Molekül die Rezeptoren CD44 und RHAMM aktivieren und so intrazelluläre Signalwege auslösen. HA kommt vermehrt im atherosklerotischen Plaque (Levesque et al., 1994), aber auch in restenotischen Gefäßen (Riessen et al., 1996) vor. Zusätzlich ist in atherosklerotischen Läsionen eine Assoziation von HA mit proliferierenden und migrierenden SMC beschrieben worden (Papakonstantinou et al., 1998). Migration und Proliferation von hVSMCs sind maßgeblich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt. Daher sind HA und die Regulationsmechanismen der HA-Synthese für die kardiovaskuläre Forschung von großem Interesse.

4.1 Regulation der HA-Synthese durch vasodilatierende Prostaglandine in hVSMC

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Regulation der HAS2-Expression und der damit verbundenen HA-Synthese durch vasodilatierende Prostaglandine (PG) in hVSMC. HAS2, die Hauptisoform in hVSMC (Evanko et al., 1999), und die HAS2-vermittelte HA-Synthese werden durch einige Wachstumsfaktoren und Zytokine wie PDGF-BB in VSMC (Evanko et al., 1999), $\text{IL-1}\beta$ in Fibroblasten (Kaback and Smith, 1999) oder EGF in Keratinozyten (Pienimäki et al., 2001) induziert. In einigen früheren Arbeiten konnte bereits eine PGE_2 -vermittelte, cAMP-abhängige Stimulation der HA-Synthese in Fibroblasten (Yaron et al., 1978) und Mesothelzellen (Honda et al., 1993) gezeigt werden.

Anhand von DNA-Mikroarrayanalysen wurde jedoch erstmals eine HAS2-Induktion unter dem Einfluss von Iloprost, einem stabilen PGI_2 -Mimetikum, in hVSMC nachgewiesen (Debey et al., 2003).

Die Zeitabhängigkeit der Induktion der HAS2-mRNA nach Stimulation mit Iloprost wurde durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Die Inkubation mit Iloprost bewirkte

eine transiente HAS2-Induktion, mit einem Maximum nach 3-stündiger Stimulation (Abbildung 4). Eine deutliche Zunahme der HAS2-mRNA konnte anschließend auch mittels *Real-Time* RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 5). Die Induktion der HAS2-Expression in Abhängigkeit von Iloprost führte zusätzlich zu einer verstärkten Ausbildung eines perizellulären HA-Mantels (Abbildung 7) und zu einer vermehrten HA-Synthese und Sekretion in den Zellkulturüberstand (Abbildung 8).

Ob Iloprost zu einer vermehrten HAS2-Proteinexpression führte, konnte nicht direkt untersucht werden, weil derzeit noch keine spezifischen HAS2-Antikörper zur Verfügung stehen. Da allerdings die HA-Synthese nach Stimulation mit Iloprost um das 8-fache anstieg, ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte HAS2-Transkription auch zu einer erhöhten HAS2-Translation führte. In zukünftigen Experimenten sollte untersucht werden, wo die HA lokalisiert ist, die nach Stimulation mit Prostaglandinen vermehrt sezerniert wird. Zusätzlich wäre es interessant, ob neben der extrazellulären, auch die intrazelluläre HA-Menge durch Prostaglandine reguliert wird.

Iloprost ist nicht nur Agonist am IP-Rezeptor sondern auch in höheren Konzentrationen am EP₁-Rezeptor (Schwaner et al., 1992). Die Identifizierung des für die Iloprost-mediierte HAS2-Induktion verantwortlichen Rezeptors erfolgte mit Cicaprost, einem selektiven IP-Rezeptoragonisten, und SC19220, einem EP₁-Rezeptorantagonisten. Die PG₂-abhängigen Effekte wurden über den IP-Rezeptor vermittelt, da Cicaprost ähnlich wie Iloprost, die HAS2-Expression und die HA-Synthese induzierte. Der EP₁-Rezeptorantagonist hatte keinen Effekt auf die Iloprost-induzierte HAS2-Expression (Abbildung 9).

Neben dem PG₂-Analog Iloprost, induzierte auch PGE₂ deutlich die HAS2-Expression und die HA-Synthese. Da die verwendeten hvSMCs alle 4 PGE₂-Rezeptoren (EP₁₋₄) exprimierten, musste der verantwortliche PGE₂-Rezeptor pharmakologisch, durch verschiedene Agonisten und Antagonisten identifiziert werden. Da Butaprost, ein Agonist am EP₂-Rezeptor die PGE₂-vermittelten Induktionen imitierte und die übrigen Rezeptoragonisten und -antagonisten keine Effekte zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass der EP₂-Rezeptor die PGE₂-medierte HAS2-Induktion vermittelt (Abbildung 10).

Der IP- und EP₂-Rezeptor koppeln an stimulatorische G-Proteine (G_s) und bewirken durch Aktivierung der Adenylat-Zyklase eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. HAS2-mRNA und HA-Synthese konnten auch mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylat-Zyklase und db-cAMP, einem cAMP-Analog, induziert werden. Der EP₄-Rezeptor, der wie der IP- und EP₂-Rezeptor an stimulatorische G-Proteine koppelt, hatte keinen Einfluss auf die HAS2-Expression. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hVSMC nur geringe Mengen an EP₄-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren. Aus Literaturbefunden geht auch hervor, dass in anderen Zelllinien die Stimulation mit EP₂-Rezeptoragonisten eine höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration erzeugte, als die Stimulation mit EP₄-Rezeptoragonisten (Debey, Dissertation 2002).

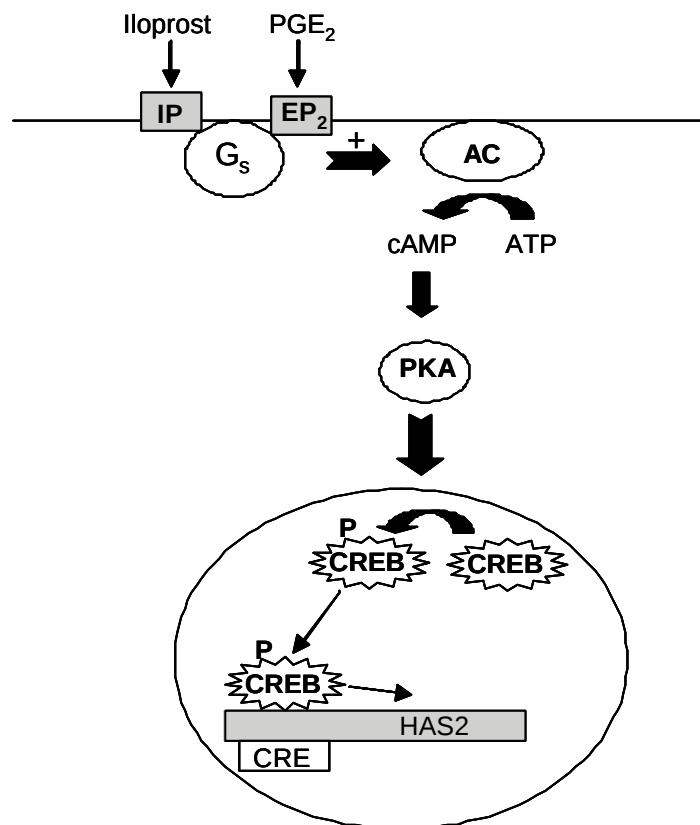


Abbildung 25: cAMP-/PKA-/CREB-abhängige Induktion der HAS2-mRNA.

Die IP- und EP₂-medierte Zunahme der cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der PKA. Die PKA aktiviert durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor CREB, der nachfolgend an die CRE-Sequenz in der Promotorregion von HAS2 bindet. Die Bindung des Transkriptionsfaktors bewirkt die Aktivierung der HAS2-Transkription.

Weiterhin konnte die Iloprost-induzierte HAS2-Expression durch den PKA-Inhibitor H89 gehemmt werden (Abbildung 9 und 11). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivierung der G_s -gekoppelten IP- und EP₂-Rezeptoren über eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs und Aktivierung der PKA die erhöhte HAS2-Transkription auslösen. Damit im Einklang steht das Ergebnis, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PKC-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Iloprost-vermittelte HAS2-Induktion zeigten. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung der PKC an der HAS2-Induktion beteiligt ist.

Die IP-/EP₂-Rezeptor-vermittelte HAS2-Induktion könnte durch die Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP-responsive element binding protein) und CREM (cAMP-responsive element modulator) vermittelt werden. CREB und CREM werden durch cAMP-/PKA-abhängige Phosphorylierung aktiviert und binden sich an die sogenannten CRE-Elemente (cAMP-responsive elements), in den Promotorsequenzen ihrer Zielgene. Die Bindung von CREB/CREM in der Promotorregion bewirkt eine Aktivierung der Transkription (Abbildung 25).

In der Promotorregion von HAS2 konnte durch eine Datenbankrecherche (Mat Inspector V2.2/TRANSFAC 4.0) eine CRE-Sequenz, als mögliche Zielsequenz der Transkriptionsaktivatoren CREB/CREM identifiziert werden (Genlokus: -460). Diese Erkenntnisse lassen daher auf eine Beteiligung von CREB und CREM an der durch IP- und EP₂-Rezeptor induzierten HAS2-Expression schließen.

Die Untersuchungen der Iloprost-vermittelten Regulation der HAS2-mRNA und der HA-Synthese zeigten Unterschiede in der jeweiligen Induktionsstärke. Die erhaltenen Faktoren der mRNA-Induktion waren dabei wesentlich schwächer ausgeprägt, als die Faktoren, die bei den Induktionen der HA-Synthese erzielt wurden. Untersuchungen deuten darauf hin, dass HA-Synthasen unabhängig von der Proteinneusynthese phosphoryliert und dadurch aktiviert werden können. Die Beteiligung einer PKC-, aber auch einer cAMP-abhängigen Aktivierung der HA-Synthasen konnte an humanen Fibroblasten gezeigt werden (Suzuki et al., 1995). Neben der HAS2-Induktion, könnte die cAMP-abhängige Aktivierung der HA-Synthasen, additiv oder synergistisch die HA-Synthese steigern und so die Unterschiede zwischen der Induktion der HAS2-Expression und der HA-Synthese erklären.

Prostaglandine weisen neben der vasodilatierenden Funktion außerdem anti-proliferative und anti-migratorische Eigenschaften auf und hemmen auch direkt die Funktion von FA (Bulin et al., 2004). Die Schlüsselenzyme der PG-Synthese sind die Cyclooxygenasen (COX), die entweder konstitutiv exprimiert vorliegen (COX1), oder während der Atherosklerose durch pro-inflammatorische Mediatoren induziert werden (COX2). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Regulationsmechanismus der HA-Synthese durch die vasodilatierenden PGs, PGI_2 und PGE_2 , in hVSMCs aufgeklärt werden. Eine mögliche physiologische Bedeutung dieser PG-vermittelten Induktion der HAS2-Expression, konnte dadurch gezeigt werden, dass auch die Stimulation mit geringen, physiologisch relevanten Konzentrationen, eine deutliche Zunahme der HAS2-Expression und der HA-Synthese bewirkte. Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Regulation von HAS2 durch Prostaglandine physiologisch relevant sein könnte, ergaben Untersuchungen mit dem COX2-spezifischen Inhibitor Etoricoxib. In kultivierten, wachstumsarretierten hVSMCs bewirkte die Inhibierung der COX2-Aktivität durch Etoricoxib eine Reduktion der basalen HAS2-Expression (Abbildung 11) bei gleichzeitiger Expression von funktionell aktivem COX2-Protein. Zusätzlich wurden im Zellkulturüberstand von gehungerten hVSMCs Konzentrationen von 6-Keto-PGF_{1 α} , einem stabilen PGI_2 -Metaboliten, im nanomolaren Bereich gemessen. Da nanomolare Konzentrationen von Iloprost und Cicaprost in Zellkulturversuchen die Expression von HAS2 deutlich induzierten (Abbildung 11), lassen diese Befunde den Schluss zu, dass endogen COX2-abhängig gebildete Prostaglandine die HAS2-Expression in hVSMC autokrin oder parakrin induzieren.

Da HA aber abhängig vom Molekulargewicht entweder pro- oder anti-atherosklerotische Funktionen vermitteln kann (West et al., 1989), sollte in weiterführenden Arbeiten auch das Molekulargewicht von HA nach Stimulation mit PG bestimmt werden. Außerdem ist es noch unbekannt, ob Prostaglandine auch Effekte auf andere Komponenten der perizellulären HA-Matrix haben. Auch diese Frage sollte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, da auch eine Regulation anderer Matrix-Komponenten durch PGs, die perizelluläre HA-EZM indirekt beeinflussen und so den Phänotyp von hVSMCs verändern könnte.

4.2 Die Bedeutung von HAS2 für die Regulation des glattmuskulären Phänotyps

Die Bedeutung von HAS2 für den Phänotyp von hVSMCs und die pathophysiologische Rolle von HA und den HAS-Isoenzymen während der Atherosklerose, ist bis heute weitgehend unbekannt. Eine Möglichkeit die Funktion einzelner Gene zu untersuchen, bietet neben der Erzeugung einer transgenen oder Gen-defizienten Maus *in vivo*, die RNA-Interferenz-Technologie. Mit dieser Methode kann auch in Zellkulturexperimenten, *in vitro* eine Ausschaltung eines spezifischen Gens erzielt werden.

Die Methode der RNA-Interferenz wurde in der vorliegenden Arbeit für HAS2 an hVSMCs erfolgreich angewendet. Die Transfektion spezifischer HAS2-siRNA inhibierte die Iloprost- und PDGF-BB-induzierte HAS2-Expression nahezu vollständig und hemmte auch die HA-Synthese und Sekretion um 50 % (Abbildung 15). Die Diskrepanz zwischen der starken Wirkung der siRNA auf die HAS2-Expression und der nur 50 %-igen Hemmung der HA-Synthese könnte durch den Mechanismus der RNA-Interferenz erklärt werden. Die Reduktion der Proteinexpression hängt dabei nicht nur von der Herabregulierung des Transkriptes, sondern zusätzlich von der Halbwertszeit der Proteindegradation ab. Während des Versuchszeitraums könnte trotz verringerter HAS2-Expression, noch funktionell aktive HAS2 in der Plasmamembran vorhanden sein. Weiterhin sind neben HAS2 noch HAS1 und HAS3 in die Plasmamembran integriert, die zusätzlich HA in die EZM extrudieren und für den nicht-hemmbaren Anteil der HA-Synthese verantwortlich sein könnten.

Da die HAS2-vermittelte Funktion auf den glattmuskulären Phänotyp weitgehend unbekannt war, wurden anschließend mit Hilfe der siRNA-Technik in funktionellen Analysen HAS2-spezifische Effekte auf VSMCs untersucht.

4.2.1 Morphologie

Unter dem Einfluss von Iloprost traten deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie auf. Das PGI_2 -Mimetikum Iloprost induzierte in humanen VSMCs deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie, mit einer Auflösung von Aktin-Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten (Bulin et al., 2004). Diese reversible

Auflösung zytoskelettärer Bestandteile bewirkte eine Abrundung des Zellkörpers. Auch VSMC, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten unter dem Einfluss von Iloprost, die beschriebene Abrundung der Zelle. Im Gegensatz dazu führte die Suppression von HAS2 zu einer deutlichen Zunahme der Zellausbreitung und zur Veränderung der Zellgestalt (Abbildung 16). Die HAS2-spezifische HA könnte daher an der Regulation der Zellform und der Zellausbreitung beteiligt sein. Dieser Effekt ist möglicherweise sehr relevant, da Ausbreitung und Zellform den Phänotyp von adhärenenten Zellen stark beeinflussen können (Ivanov et al., 2004; Sroka et al., 2002). Weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Zellausbreitung, lieferten Untersuchungen an Keratinozyten, in denen antisense-HAS2 die Ausbildung fokaler Adhäsionsplaques induzierte (Rilla et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde ein ähnlicher Phänotyp durch HAS2-siRNA induziert, da auch die transfizierten VSMC direkte Kontakte mit dem Untergrund ausbildeten. Das Fehlen anti-adhäsiver perizellulärer HA-Hüllen (Evanko et al., 1999), die möglicherweise überwiegend durch HAS2 synthetisiert werden (Itano et al., 2002), könnte eine mögliche Ursache für die HAS2-siRNA-vermittelte Zellausbreitung sein. Eine morphologisch ähnlich induzierte Zellausbreitung und flächige Erscheinungsform konnte auch in Analysen mit HA-Oligosacchariden gezeigt werden (Evanko et al., 1999), die HA von den CD44- und RHAMM-Rezeptoren verdrängen. Die Zunahme der Zellfläche ging in der Arbeit von Evanko et al. einher mit einer Reduktion perizellulärer HA-Hüllen.

4.2.2 Migration

Die perizelluläre HA-abhängige Matrixbildung ist ein dynamischer, rasch koordinierter Prozess, der durch verringerte Adhäsion, die Migration und die Proliferation von VSMCs fördert (Evanko et al., 1999). In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Abnahme der migratorischen Aktivität von hVSMCs nach Inhibierung der HAS2-Expression gezeigt werden (Abbildung 18). Dieser Befund legt nahe, dass die HAS2-Isoform eine wichtige Funktion für die Regulation migratorischer Prozesse in hVSMC spielt. Eine Ursache dafür könnte eine unzureichende Ausbildung perizellulärer HA-Hüllen darstellen einhergehend mit einer erhöhten Zelladhäsion, wie oben stehend erläutert. Eine weitere Erklärung könnte das Fehlen von HA an der Zellunterseite sein, wodurch die koordinierte Ablösung der Zelle während der gerichteten

Bewegung erschwert würde. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an Keratinozyten mittels antisense-HAS2 (Rilla et al., 2002) und an Fibroblasten mittels ektopischer Überexpression von HAS2 (Itano et al., 2002). Ebenso bewirkte die Inkubation von VSMC mit HA-Oligosacchariden, ähnlich wie HAS2-siRNA, eine Suppression der Migration mit gleichzeitiger Reduktion perizellulärer HA-Hüllen (Evanko et al., 1999).

Während es noch unbekannt ist, welcher Rezeptor für die HAS2-vermittelte Migration von hVSMC verantwortlich ist, ergaben Untersuchungen an Fibroblasten (Sohara et al., 2001) und an Endothelzellen (Singleton and Bourguignon, 2002), dass die durch HA-stimulierte Migration CD44-abhängig ist. Eine Regulierung migratorischer Prozesse, wird durch die Interaktion der EZM mit Integrinen vermittelt. Durch diese Interaktion wird die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe (FA) induziert, die den dynamischen Auf- und Abbau des Aktin-Zytoskeletts regulieren können. Zusätzlich werden von der FAK auch intrazelluläre Signalwege aktiviert, die ebenfalls essentiell für die Migration von VSMCs sind, wie z.B. die Aktivierung von Rho, die Aktivierung der durch ‚src‘-initiierten ‚ras‘-, ‚raf‘-Tyrosinkinase-Kaskade und des P_{13} -Kinase-Weges (Aplin et al., 1998). Die FAK-medierte Signaltransduktion wird initiiert durch die Autophosphorylierung von FAK am Tyrosin 397. So führte eine Inhibierung der FAK-Phosphorylierung an der Autophosphorylierungsstelle Y397 zu einer reduzierten Rekrutierung der Tyrosinkinase Src in den FA-Komplex und bewirkte so eine Reduktion der Migration (Sieg et al., 2000). Somit ist es denkbar, dass die Dephosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) an der Autophosphorylierungsstelle Y397 nach Inhibierung der HAS2-Expression durch HAS2-siRNA (Abbildung 22) eine Erklärung für die Hemmung der Migration von hVSMC in diesen Experimenten bietet.

Die Dephosphorylierung von FAK könnte auch eine verminderte Phosphorylierung und Bindung von Paxillin bewirken und so zur Auflösung FA und zur veränderten Anordnung von Aktinfilamenten führen. Die Funktion HAS2-synthetisierter HA in der Regulation von FA ist bisher unbekannt. Analysen der Signaltransduktion des Rezeptors CD44, ergaben jedoch eine HA-stimulierte Induktion der Src-Kinaseaktivität hin, wodurch die Phosphorylierung von Cortactin, einem Protein des Zytoskeletts, induziert und die Vernetzung mit F-Aktin vermindert wurde (Bourguignon et al., 2001).

Untersuchungen an Fibroblasten wiesen auch auf eine HA-mediierte RHAMM-abhängige Regulation von FA hin, einhergehend mit einer Phosphorylierung und Dephosphorylierung von pp125^{FAK} (Hall et al., 1994). Im Gegensatz dazu bewirkte eine HA-Stimulation in humanen venösen und arteriellen Endothelzellen eine RHAMM-abhängige Tyr-Phosphorylierung von pp125^{FAK} und Paxillin (Lokeshwar and Selzer, 2000). Es ist somit möglich, dass in den hier vorgelegten Experimenten an hVSMC die von HAS2 synthetisierte HA über RHAMM die Phosphorylierung von FAK steuert.

Der HA-Rezeptor CD44 aktiviert nicht nur die HA-abhängige Signaltransduktion, welche die Ausbildung des Zytoskeletts reguliert, sondern kann zusätzlich, nach HA-Bindung, ähnlich wie Integrine, direkt mit Proteinen des Zytoskeletts interagieren. Zu diesen Proteinen gehört das Ankyrin (Bourguignon et al., 1998) oder die Familie der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin, Merlin) (Tsukita et al., 1994). Das Fehlen HAS2-synthetisierter HA könnte diese direkte Interaktion von CD44 mit Ankyrin und ERM inhibieren und so die beobachteten Veränderungen der FA und des Zytoskelett hervorrufen.

4.2.3 Zellproliferation

Die anti-adhäsiven Eigenschaften perizellulärer HA und die Organization des Zytoskeletts, sind auch während der Proliferation von VSMCs von großer Bedeutung, sowie auch intrazelluläre HA, die überwiegend mit dem Zellkern assoziiert vorkommt und nukleäre Prozesse wie z.B. die Chromosomensegregation während der Mitose steuert (Evanko and Wight, 1999).

Die eigenen Untersuchungen zur Rolle der HAS2-Expression für die Proliferation von hVSMC, ergaben eine Reduktion der Zellzahl, eine reduzierte DNA-Neusynthese und einen verminderten Gehalt an Cyclin D1 (Abbildung 19, 20, 21). Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion von HAS2-synthetisierter HA in der Zellzyklusprogression hin. Wie im Prozess der Migration könnte das Fehlen perizellulärer HA-Hüllen, die Abrundung der Zelle in der Mitose erschweren (Evanko et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit für den Zellzyklusarrest könnte das Fehlen HAS2-spezifischer intrazellulärer HA sein.

Die Assoziation von HA mit der Zellproliferation ist vielfältig, im Hinblick auf die Tumorentstehung beschrieben. So induzierte die HA-Stimulation in Krebszellen, durch Aktivierung des HA-Rezeptors CD44 das Zellwachstum in Tumorzelllinien. In Übereinstimmung zeigten Untersuchungen mit HA-Oligosacchariden, die hochmolekulare HA von CD44 und RHAMM verdrängen, eine Reduktion der Zellzahl, sowie die Abnahme von Tumorwachstum (Ghatak et al., 2002).

Die hier für HAS2 gezeigte Regulation der Proliferation von hVSMCs, steht im Einklang mit Untersuchungen in anderen Zelltypen. So konnte auch in Keratinozyten durch antisense-HAS2 eine deutliche Abnahme der Proliferation gezeigt werden (Rilla et al., 2002). Im Gegensatz dazu induzierte eine adenovirale Überexpression von HAS2 die Zellzahl in Epithelzellen vermittelt durch den HA-Rezeptor CD44 (Zoltan-Jones et al., 2003). Weiterhin bewirkte die ektopische Überexpression von HAS2 eine Aufhebung der Kontaktinhibierung des Zellwachstums von Fibroblasten (Itano et al., 2002).

In Zellkulturexperimenten konnte mit CD44 ein möglicher HA-Rezeptor auf der Zelloberfläche identifiziert werden, über den die Signaltransduktion für Proliferation und Zellwachstum aktiviert wird (Zoltan-Jones et al., 2003). Beruhend auf Untersuchungen an RHAMM^{-/-}-defizienten (Receptor of HA-mediated motility) Mäusen wurde auch eine Beteiligung dieses HA-Rezeptors an der Kontrolle der Proliferation postuliert. In Fibroblasten und Tumorzellen konnte abhängig von der RHAMM-Defizienz, eine Inhibierung der Zellproliferation gezeigt werden (Tolg et al., 2003). RHAMM ist nicht nur Zelloberflächenrezeptor, sondern kommt zusätzlich intrazellulär und nukleär vor. Im Zellkern assoziiert RHAMM mit den Mikrotubuli der Interphase und der mitotischen Spindel (Assmann et al., 1999). Anhand von Genexpressionsanalysen während der Zellzyklus-Progression, konnte die Induktion von RHAMM und HAS2 vor Beginn der Mitose gezeigt werden (Assmann et al., 1999), welches wiederum auf eine bedeutende Funktion von HAS2 im Zellzyklus hinweist.

Unter Einbeziehung der Literaturbefunde könnte der an hVSMC erhobene Befund, dass die Suppression von HAS2 mittels siRNA die Migration und Proliferation hVSMCs hemmt, auf der Modulation der FA (FAK-Phosphorylierung und Paxillin) und auf Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts beruhen. Diese Effekte könnten auf der Hemmung der RHAMM - und / oder CD44 - vermittelten Signaltransduktion basieren.

Ein weiterer Mechanismus könnte das Fehlen perizellulärer, durch HAS2-synthetisierte HA-Hüllen sein, welches zur verstärkten Zelladhäsion führt und dadurch die Abrundung der mitotischen Zelle sowie die gerichtete Zellbewegung erschwert.

4.2.4 PI_3 -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion

Die PI_3 -Kinase-/Akt-abhängige Signaltransduktion, die z.B. für die Migration, die Proliferation oder die Apoptose eine bedeutende Rolle spielt, wird anhand verschiedener Untersuchungen in Tumorzellen mit der CD44-/HA-vermittelten Signaltransduktion assoziiert (Fujita et al., 2002). Hinweise auf eine HAS2-vermittelte Regulation, erbrachte eine adenovirale Überexpression von HAS2, durch die der Phosphorylierungsgrad von Akt und der Gsk3 β (Glykogen-Synthase-Kinase 3 β), einem Substrat von Akt, induziert wurde (Zoltan-Jones et al., 2003). Analog der adenoviralen HAS2-Überexpression, führte in der hier vorgelegten Arbeit das Fehlen endogener HAS2 in hVSMC zu einer verminderten Akt-Phosphorylierung und zu einer Abnahme phosphorylierter Akt-Substrate (Abbildung 24). Ähnliche Effekte zeigten auch HA-Oligosaccharide, die die hochmolekulare HA von ihren Rezeptoren verdrängen und dadurch auch die PI_3 -Kinaseaktivität und das Wachstum von Tumorzellen inhibierten (Ghatak et al., 2002). Die vorliegenden Untersuchungen unterstützen daher die Annahme, dass in hVSMC besonders die von HAS2 gebildete HA eine Hemmung der PI_3 -Kinase/Akt-Signaltransduktion bewirkt und so zu einer Reduktion der Migration und der Proliferation führt.

Die Bindeglieder zwischen den HA - Rezeptoren einerseits und der Phosphorylierung von FAK und AKT andererseits sind bisher unbekannt. In Tumorzellen scheint die CD44-/HA-abhängige Aktivierung der Rho-Kinase (ROK) durch RhoA, für die Rekrutierung von Akt verantwortlich zu sein, wodurch das wiederum das Wachstum gefördert wird. Eine Beteiligung der Rho-Kinase an den HAS2-vermittelten Effekten auf die PI_3 -Kinase/Akt-abhängige Signaltransduktion in hVSMC, sollte daher nachfolgend untersucht werden.

Weiterhin könnte eine Induktion der Phosphatase PTEN, wie zuvor nach Applikation von HA-Oligosacchariden beobachtet wurde durch das Fehlen HAS2-spezifischer HA bewirkt werden (Ghatak et al., 2002). Diese Phosphatase induziert eine Dephosphorylierung von PIP_3 , wodurch die Rekrutierung von Akt inhibiert und die

Signaltransduktion unterbrochen wird (Maehama and Dixon, 1998). Zusätzlich kann PTEN eine Dephosphorylierung von FAK bewirken und so die Zelladhäsion und Migration beeinflussen.

Ziel zukünftiger Untersuchungen könnte es demnach sein zu klären, ob tatsächlich ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen HAS2-Expression und HA-Synthese und der Aktivität von FAK sowie der der P_{β} -/Akt-abhängigen Signaltransduktion besteht und ob dieser Zusammenhang die Regulation des glattmuskulären Phänotyps durch HAS2 erklären kann. Zusätzlich sollte die mögliche Beteiligung von Phosphatasen, Kinasen oder GTPasen wie Ras, RhoA oder Rac1 für HAS2-abhängige Effekte analysiert und die verantwortlichen HA-Rezeptoren identifiziert werden.

4.2.5 Genexpression

Die Suppression von HAS2 bewirkte dramatische Veränderungen der phänotypischen Eigenschaften von VSMC. Mittels Mikroarrayanalysen sollte anschließend der Einfluss von HAS2-siRNA auf die Genexpression untersucht werden. Die Klassifizierung differentiell regulierter Gene erfolgte in verschiedenen funktionellen Gruppen (Tabelle 8). Es wurden viele Gene identifiziert, die den Zellzyklus regulieren oder in inflammatorische Prozesse involviert sind sowie Gene der EZM, des Zytoskeletts, oder die mit der Apoptose assoziiert werden. Diese veränderte Genexpression könnte maßgeblich an der HAS2-siRNA-induzierten Entstehung des glattmuskulären Phänotyps beteiligt sein.

Die wichtigsten der differentiell regulierten Gene sollten nachfolgend hinsichtlich einer potentiellen Bedeutung für den glattmuskulären Phänotyp besprochen werden. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen weisen darauf hin, dass das Fehlen von HAS2 eine Modulation der EZM induzieren könnte. Die massive Induktion der Matrixmetalloproteinasen 8 und 10 (MMP 8; MMP 10), könnte die Degradierung von Matrixkomponenten bewirken, da z.B. Kollagene (Typ I, II, III, IV und V), nicht-polymerisiertes Kollagen, Proteoglykane, das Link-Protein, Fibronectin, Laminin oder Elastin, Substrate dieser Matrixmetalloproteinasen darstellen (Katsuda and Kaji, 2003) und so die Zusammensetzung der EZM verändert werden könnte (Nagase and Woessner, 1999; Okada and Hashimoto, 2001). Im Gegensatz zu den MMPs, wurde TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3), ein Inhibitor der MMP-Aktivität, durch

HAS2-siRNA herunterreguliert. Die reduzierte TIMP-medierte Hemmung der MMP-Aktivität, könnte sich additiv oder synergistisch auf den MMP-induzierten Abbau der oben beschriebenen EZM-Moleküle auswirken. Aus der publizierten Literatur ergeben sich zu VSMC bisher noch keine Hinweise auf eine HAS2-abhängige Regulation der MMP-Expression. Nach Stimulation mit HA-Oligosacchariden zeigen allerdings Tumorzellen, eine Induktion von MMP9 und MMP13, (Fieber et al., 2004). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den hier vorgelegten Daten, da die HA-Oligosaccharide in Tumorzellen die Signaltransduktion von CD44 und RHAMM hemmen. Zusätzlich führte HAS2-siRNA zu einer Herabregulation der Genexpression für die Kollagene Typ I, VI und XV. Kollagene sind wesentliche Bestandteile der EZM und beeinflussen verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Differenzierung, Adhäsion, Apoptose, Migration oder die Proliferation (Plenz et al., 2003). Die experimentelle Hemmung der HAS2-Expression könnte demnach eine Förderung des Kollagenabbaus durch MMPs induzieren und gleichzeitig die Kollagenneusynthese hemmen. Dadurch könnte ein dramatischer Umbau der Kollagenmatrix eingeleitet werden.

Eine weitere funktionelle Bedeutung für den glattmuskulären Phänotyp, könnte die HAS2-abhängige Herunterregulierung von Versikan (Spleißvariante V3) haben. Das Versikan V3 ist in die Regulation der Elastinfibrillogenese und damit in die Organisation der EZM involviert (Merrilees et al., 2002). Außerdem fungiert Versikan V3 wahrscheinlich als Antagonist zum ‚normalen‘ Versikan. Versikan ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, das auch Bestandteil der perizellulären EZM-Matrix ist. Sowohl Versikan V3 als auch Versikan interagieren mit HA durch spezifische HA-Bindungsregionen (Merrilees et al., 2002; Wight and Merrilees, 2004). Auch ein weiteres Molekül des perizellulären HA-Mantels, Tsg-6, wurde durch HAS2-siRNA differentiell reguliert. Tsg-6 ist wie Versikan und Versikan V3 ein mit HA-interagierendes Hyaladherin und wird in Fibroblasten, Monozyten, Chondrozyten und SMC, als Antwort auf inflammatorische Mediatoren und Wachstumsfaktoren exprimiert (Day, 1999; Wisniewski and Vilcek, 1997). Obwohl die Funktion von Tsg-6 nicht eindeutig scheint, gibt es Hinweise darauf, dass das anti-inflammatorische Molekül (Wisniewski et al., 1996) einen endogenen Inhibitor der Migration darstellt (Parkar et al., 1998). Daher könnte die Tsg-6-Induktion durch HAS2-siRNA möglicherweise zu der Hemmung der Migration durch HAS2-siRNA beitragen.

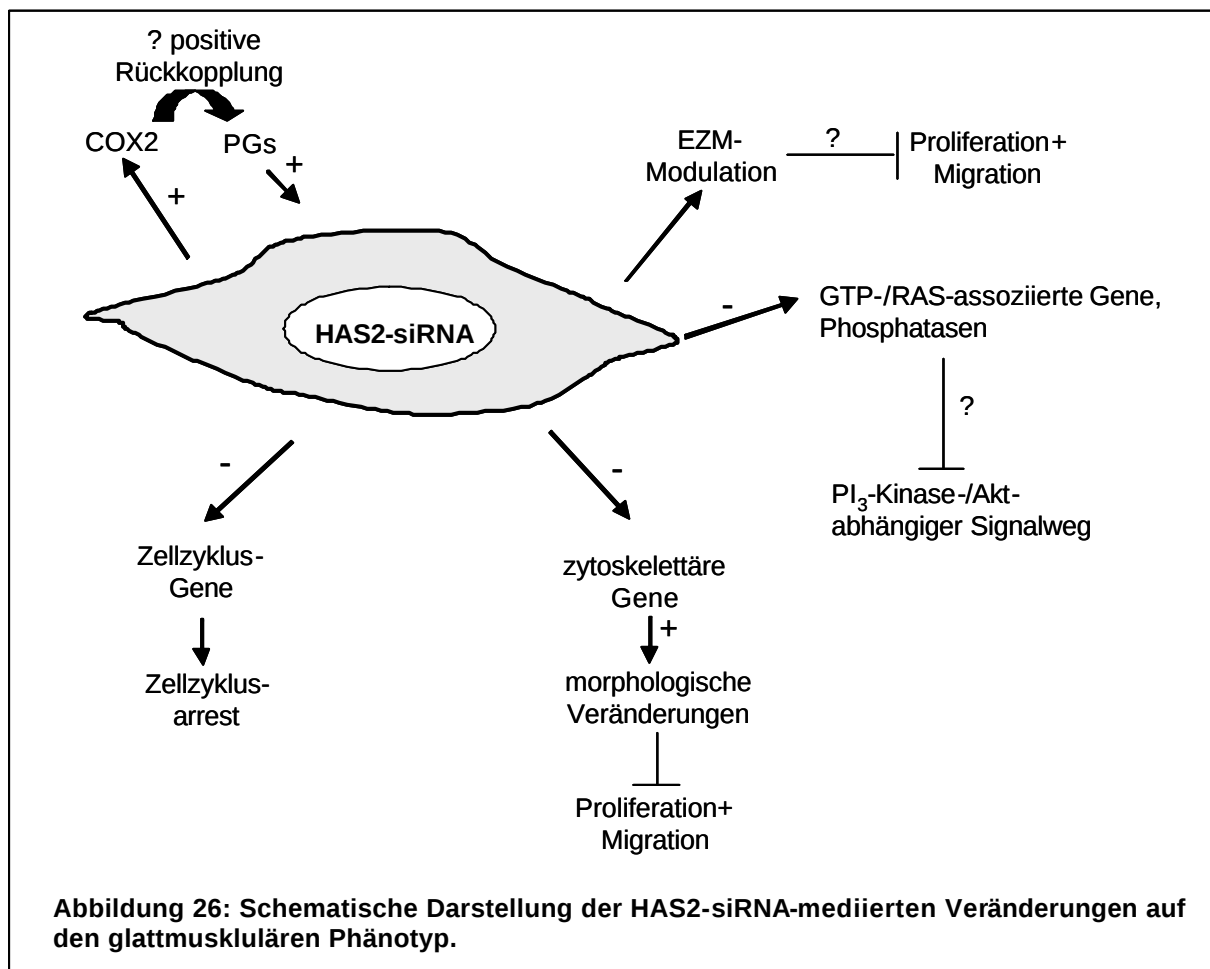
Zusammenfassend ergibt sich aus der Expressionsanalyse, dass ein Mangel an HAS2 eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären und der HA-abhängigen perizellulären Matrix auslöst. Da diese die zelluläre Antwort von VSMC auf Wachstumsfaktoren kontrolliert und so die Migration und Proliferation VSMC beeinflusst, könnte die EZM-Modulation ein Grund für die HAS2-vermittelte Reduktion von Migration und Proliferation sein.

Anhand der DNA-Mikroarrayanalysen konnten auch Genregulationen aufgedeckt werden, die den durch HAS2-siRNA-induzierten Zellzyklus-Arrest vermitteln könnten, da eine differentielle Regulation verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Gene auftrat. So ergab die Transfektion mit HAS2-siRNA eine Transkriptverminderung des Replikationsfaktors C, der in der DNA-Elongation während der Replikation involviert ist (Munshi et al., 2003). Einen weiteren Hinweis auf eine HAS2-siRNA-induzierte Abnahme der Proliferation, könnte die Herabregulation von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) sein (Baroja et al., 1996). Desweiteren bewirkte HAS2-siRNA eine verminderte Expression einer Reihe von weiteren Genen, die für die Progression des Zellzyklus essentiell sind wie CDK8 (cyclin-dependent-kinase 8), CDC6 (cell-division-cycle 6), Cyclin G1 und Rb-Protein (retinoblastoma protein).

Desweiteren, scheint HAS2-synthetisierte HA apoptotische Prozesse zu regulieren. Die Expressionsanalyse ermöglichte die Identifizierung verschiedener Apoptose-assoziiierter Gene, die unter dem Einfluss von HAS2-siRNA differentiell reguliert waren. SOX-4, der als positiver Regulator apoptotischer Prozesse beschrieben wurde (Kim et al., 2002), wurde bei Suppression von HAS2 induziert und könnte so einen Zelltod bewirken. Zusätzlich wurde die Expression von MDA-7 (melanoma differentiation-associated gene-7) in Abhängigkeit der HAS2-siRNA massiv heraufreguliert, dass ebenfalls die Apoptose in hVSMC induzieren könnte. Hinweise auf eine Beteiligung von MDA-7 an apoptotischen Prozessen, erbrachten Untersuchungen an Krebszellen. Dort bewirkte die adenovirale Überexpression von MDA-7, über Inhibierung der P_{b} -Kinase/Akt-abhängigen Signaltransduktion, eine Reduktion der Migration, mit gleichzeitiger Induktion der Apoptose (Ramesh et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von DRAK2, eine Serin-/Threoninkinase, die Apoptose induzieren kann (Sanjo et al., 1998), durch HAS2-siRNA deutlich vermindert. Diese Ergebnisse erscheinen von großem Neuheitswert,

da es auf die HAS2-/bzw. HA-vermittelte Regulation dieser Apoptose-assoziierten Gene und die resultierenden Auswirkungen auf hVSMC bisher noch keine Hinweise gab. Dass die Akt-Phosphorylierung, ein starkes anti-apoptotisches Signal, durch HAS2-siRNA gehemmt wurde, spricht ebenfalls für eine Rolle von HAS2 in der Regulation der Apoptose. Untersuchungen an Krebszellen unterstützen den postulierten HAS2/HA-vermittelten Einfluss auf die Apoptose, da für die Interaktion von CD44 mit HA in Krebszellen starke anti-apoptotische Wirkungen nachgewiesen wurden (Fujita et al., 2002). Ein möglicher pro-apoptotischer Effekt der HAS2-siRNA in hVSMC sollte Ziel nachfolgender Untersuchungen sein.

Interessanterweise führte die Transfektion mit HAS2-siRNA zu einer verstärkten COX2-Expression. Da COX2-abhängig gebildete Prostaglandine die HAS2-Expression fördern, könnte die durch HAS2-siRNA-vermittelte Induktion eine positive Rückkopplung darstellen. Durch das Fehlen endogener HAS2, würde so die PG-Synthese COX2-vermittelt induziert werden, was wiederum zur HAS2-Induktion und zur verstärkten HA-Synthese führen könnte.



Zusammenfassend konnten zahlreiche differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Vielen dieser Gene werden Funktionen in der Phänotyp-Modulation zugeschrieben (Abbildung 26). Eine HAS2-siRNA-vermittelte EZM-Modulation könnte eine Verminderung der Migration und Proliferation sowie eine Förderung der Apoptose bewirken. Zusätzlich könnte die veränderte Expression zytoskelettärer Gene, die Zellmorphologie beeinflussen und so ebenfalls zur Hemmung der Migration und die Proliferation betragen.

4.3 Die Bedeutung der Prostaglandin-vermittelten HA-Induktion für die Atherosklerose

Die Atherosklerose, eine chronische Entzündung der Gefäßwand, kann aus einer arteriellen Gefäßverletzung hervorgehen oder die Folge von lokalen und systemischen Risikofaktoren sein. Der Atherosklerose geht die endotheliale Dysfunktion voraus, durch die vasoprotektive Mediatoren wie z.B. PGI_2 vermindert gebildet werden (Ross, 1999). Nach der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Endothelschicht, durchwandern diese das Endothel und differenzieren im subendothelialen Raum zu Makrophagen und später zu Schaumzellen. Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, induziert die Dedifferenzierung von VSMCs in einen „synthetischen“ Phänotyp. Dieser Phänotyp weist sehr hohe proliferative und migratorische Aktivität auf, sowie eine hohe Synthese verschiedener EZM-Moleküle, die eine neue Umgebung für die VSMC schaffen. Diese pro-atherosklerotischen Eigenschaften von VSMCs, werden wahrscheinlich durch HA gefördert. Im Gegensatz dazu, besitzen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PGs, anti-atherosklerotische Eigenschaften, wie z.B. die Inhibierung von Proliferation und Migration VSMCs.

Die in den Zellkulturexperimenten nachgewiesene signifikante Induktion der HA-Synthese, bereits bei physiologisch relevanten PG-Konzentrationen, könnte auf eine mögliche physiologische Bedeutung des identifizierten Regulationsmechanismus hinweisen. Diese These wurde zusätzlich unterstützt durch die Assoziation der COX2-Aktivität mit der basalen HAS2-Expression *in vitro*. Da ein möglicher Zusammenhang von HA mit PG in der humanen Atherosklerose nicht bekannt war, wurden verschiedene immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

Atherosklerotische Läsionen wurden zum einen für HA gefärbt und zum anderen wurden COX2, der EP₂-Rezeptor, glatte Muskelzellen und Makrophagen nachgewiesen. Die Befunde dieser Analysen, gaben Hinweise auf eine Kolo-kalisierung von HA mit COX2 im Bereich der Neointima. Zusätzlich konnte eine Assoziation von HA mit EP₂-Rezeptoren und VSMCs identifiziert werden. Diese Ergebnisse, werden durch verschiedene Befunde bestätigt, in der das Vorkommen von HA in allen Bereichen atherosklerotischer Plaques (Levesque et al., 1994), sowie in der Neointima nach Gefäßverletzung (Riessen et al., 1996) gezeigt werden konnte. Zusätzlich assoziierten perizelluläre HA-Mäntel in atherosklerotischen Läsionen mit stark proliferativen VSMC (Riessen et al., 1996), was die pro-atherosklerotische Funktion von HA unterstützt.

In verschiedenen Untersuchungen wurde eine mögliche Funktion von HA, in der Rekrutierung von Makrophagen und deren CD44-abhängige Adhäsion an die Endotheloberfläche postuliert (Nandi et al., 2000), welches den Initialprozess in der Entstehung der Atherosklerose fördern könnte. Weiterhin konnte in CD44^{-/-} /ApoE^{-/-}-defizienten Mäusen eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen um 50%-70% erzielt werden, begleitet von einer verminderten Adhäsion von Makrophagen (Cuff et al., 2001).

Im Gegensatz zu den postulierten pro-atherosklerotischen Eigenschaften von HA, wird die Funktion von COX2 in der Atherosklerose kontrovers diskutiert. COX2 und die Prostaglandin E-Synthase (PGES) werden verstärkt durch Makrophagen und VSMCs in atherosklerotischen Läsionen exprimiert (Cipollone et al., 2001), was auf eine mögliche pro-atherosklerotische Funktion von COX2 und PGE₂ hindeutet. Weiterhin wird die Expression von COX2 und auch die von PGES durch pro-inflammatorische Stimuli, wie Interferon γ oder IL-1 β induziert, die während der Atherosklerose durch die Aktivierung von Makrophagen vermehrt gebildet werden. (Murakami et al., 2000). Die koordinierte Heraufregulierung von COX2 und PGES könnte in atherosklerotischen Läsionen hohe Konzentrationen pro-inflammatorischer PGs (PGE₂) induzieren. Das Konzept der pro-atherosklerotischen PGE₂-Wirkung wird durch Befunde an Patienten gestützt, die nahelegen, dass PGs in atherosklerotischen Plaques Matrix-Metalloproteinasen (MMP 9) induzieren (Burleigh et al., 2002; Cipollone et al., 2001). Die Induktion von MMPs könnte begrenzte, kleine Rupturen der fibrotischen Plaquekappe begünstigen, die die Progression der Plaques fördern oder auch umfangreiche Rupturen auslösen, welche wiederum

häufig einen thrombotischen Verschluss der betroffenen Arterie nach sich ziehen. Weitere pro-atherosklerotische Effekte von COX2 wurden bei Patienten mit koronar vaskulären Erkrankungen beobachtet. Hier führte die selektive COX2-Inhibierung zu einer Verbesserung der Endothel-abhängigen Funktionen, mit einhergehender Verminderung der Menge an C-reaktivem Protein (Chenevard et al., 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Kollokalisierung von HA, COX2 und dem EP₂-Rezeptor, deuten ebenfalls auf eine pro-atherosklerotische Funktion von COX2 hin (Abbildung 13 und 14). Da eine Assoziation von HA mit VSMCs gezeigt werden konnte, die den EP₂-Rezeptor exprimierten, könnte von COX2-synthetisiertes PGE₂ über den EP₂-Rezeptor die HA-Synthese in atherosklerotischen Läsionen induzieren. Im Gegensatz dazu scheint der IP-Rezeptor, der in den untersuchten humanen atherosklerotischen Läsionen nicht detektiert werden konnte, keine Bedeutung für die HA-Akkumulation in der Neointima zu haben. Somit scheint die pathophysiologische Relevanz der Regulation von HAS2 durch Eikosanoide für die Atherosklerose in der durch PGE₂- und dem EP₂-Rezeptor-medierten HA-Synthese zu liegen. PG_I₂ oder Iloprost können zwar *in vitro* ebenfalls über Aktivierung der AC und des cAMP-/PKA-Weges HAS2 induzieren. Dieser Weg scheint aber *in vivo* keine Rolle zu spielen, da die IP-Rezeptoren in den atherosklerotischen Plaques nicht nachgewiesen werden konnten und es auch keine Befunde gibt, die zeigen, dass in atherosklerotischen Läsionen die PG_I₂-Synthase in größeren Mengen zusammen mit COX2 exprimiert wird. Diese Schlussfolgerung ist daher auch mit dem Konzept der vasoprotektiven Funktion von PG_I₂ und IP-Rezeptoren in gesunden Gefäßen vereinbar.

Zusammenfassend deuten die an Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Atherosklerose erhobenen Erkenntnisse, dass PGE₂ die MMP Bildung induziert (Cipollone et al., 2001), dass sich die Endothelfunktion nach COX2-Inhibition verbessert (Chenevard et al., 2003) und dass PGE₂ via EP₂-Rezeptoren HAS2 induziert, darauf hin, dass die über COX2, PGES, PGE₂ und EP₂-Rezeptoren vermittelten Signale die Progression der Atherosklerose fördern. Weitere Hinweise auf eine pro-atherosklerotische Funktion von COX2, erbrachten Untersuchungen an LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. Die genetische Deletion, sowie die pharmakologische Inhibierung von COX2, bewirkte in diesem Tiermodell eine verminderte Bildung atherosklerotischer Läsionen. Im Gegensatz dazu, werden durch COX2-Inhibitoren akut pro-thrombotische Effekte bei Patienten mit

atherosklerotischer Grunderkrankung ausgelöst. So ergaben die Befunde aus der VIGOR-Studie, dass die Hemmung von COX2 mittels Rofecoxib ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bewirken kann. Dieser pro-thrombotische Effekt wird auf die verminderte Synthese vasodilatierender PGs und eine Reduktion von anti-aggregatorischem PGI_2 (Bombardier et al., 2000) bei unveränderter Thromboxan A_2 -Synthese durch COX1 in Thrombozyten zurückgeführt. Damit ergibt sich die Hypothese, dass COX2 Inhibitoren möglicherweise die Progression der atherosklerotischen Plaques langfristig hemmen, gleichzeitig aber durch das gestörte Gleichgewicht von Prostazyklin und Thromboxan A_2 akut das thromboembolische Risiko von Patienten mit bestehender atherosklerotischer Gefäßerkrankung erhöhen.

5 Zusammenfassung

HA wird durch 3 HAS-Isoformen synthetisiert und anschließend in den extrazellulären Raum sezerniert. Die HA-Synthese und die HAS-Expression werden durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli induziert. HA vermittelt eine Vielzahl proatherogener Eigenschaften, wie die Förderung der Migration oder der Proliferation von VSMCs. Desweiteren findet man eine starke HA-Akkumulation im atherosklerotischen Plaque und restenotischen Läsionen. PGI_2 und PGE_2 gehören zur Gruppe der Prostaglandine, deren Vorstufen in Blutgefäßen aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen (COX1, COX2) gebildet werden. PGI_2 und PGE_2 hemmen die Migration und Proliferation von VSMCs und wirken vasodilatierend.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die HA-Synthese in hVSMC durch Prostaglandine induziert wird und eine Bedeutung dieser Regulation für die Atherosklerose nahegelegt. Es konnte gezeigt werden, dass vasodilatierende Prostaglandine vermittelt über IP_1 - und EP_2 -Rezeptoren die HAS2-Expression und HA-Synthese cAMP-/PKA-abhängig induzieren. Die Zunahme der HAS2-mRNA führte zur verstärkten Ausbildung perizellulärer HA-Mäntel. Nachfolgend wurde die Bedeutung des PG-vermittelten Regulationsmechanismus für die Atherosklerose an humanen atherosklerotischen Läsionen bestätigt. Bei diesen Untersuchungen wurde eine Kolo-kalisierung von HA und COX2 nachgewiesen, sowie eine Assoziation von HA mit dem EP_2 -Rezeptor und VSMCs gezeigt. Die Iloprost-vermittelte HAS2-Expression und die HA-Synthese konnten anhand der Methode der RNA-Interferenz gehemmt werden, wodurch auch Untersuchungen zur Funktion der von HAS2-synthetisierten HA ermöglicht wurden. HAS2-siRNA induzierte morphologische und zytoskelettäre Veränderungen sowie eine reduzierte Migration. Desweiteren wurde durch Hemmung der HAS2-Expression ein Zellzyklus-Arrest ausgelöst, welches sich anhand der verminderten Cyclin D_1 -Konzentration, der Abnahme der DNA-Neusynthese und letztlich durch die reduzierte Zellproliferation zeigen ließ. Kausal für diese Effekte könnten die Dephosphorylierung von FAK und eine Inhibierung der PI_3 -Kinase/Akt-abhängigen Signaltransduktion sowie Veränderungen der Genexpression sein, die mittels Genexpressionsanalysen nachgewiesen wurden. Unter den HAS2-abhängig regulierten Genen fanden sich funktionell verwandte Gen-Gruppen, die die EZM-Modulation, den Zellzyklus-Arrest oder die zytoskelettären Veränderungen vermitteln könnten. Aus den vorgelegten Daten lässt sich daher schließen, dass HAS2 und HAS2-medierte HA-Synthese eine bedeutende Funktion für den

glattmuskulären Phänotyp haben und dass die Prostaglandin-vermittelte Regulation von HAS2 möglicherweise eine Rolle für die Progression der Atherosklerose spielt.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, S.G., H.S. Kim, S.W. Jeong, B.E. Kim, H. Rhim, J.Y. Shim, J.H. Lee and I.K. Kim. 2002. Sox-4 is a positive regulator of HEP3B and HepG2 apoptosis induced by prostaglandin (PG) A(2) and delta (12)-PGI₂. *Exp Mol Med*.34 (3): 243-249.
- Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari, and R.L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 50:197-263.
- Assmann, V., D. Jenkinson, J.F. Marshall, and I.R. Hart. 1999. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci*. 112 (Pt 22):3943-54.
- Belton, O., D. Byrne, D. Kearney, A. Leahy, and D.J. Fitzgerald. 2000. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*. 102:840-5.
- Bombardier, C., L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, R. Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M.B. Ferraz, C.J. Hawkey, M.C. Hochberg, T.K. Kvien, and T.J. Schnitzer. 2000. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*. 343:1520-8, 2 p following 1528.
- Bornfeldt, K.E. 2003. The cyclin-dependent kinase pathway moves forward. *Circ Res*. 92:345-347.
- Bourguignon, L.Y., V.B. Lokeshwar, J. He, X. Chen, and G.J. Bourguignon. 1992. A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol Cell Biol*. 12:4464-71.
- Bourguignon, L.Y., P.A. Singleton, H. Zhu, and F. Diedrich. 2003. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem*. 278:29420-34.
- Bourguignon, L.Y., D. Zhu, and H. Zhu. 1998. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci*. 3:d637-49.

- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, L. Shao, and Y.W. Chen. 2000. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem.* 275:1829-38.
- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, L. Shao, and Y.W. Chen. 2001. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem.* 276:7327-36.
- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, L. Shao, D. Zhu, and Y.W. Chen. 1999. Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43:269-87.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Bretscher, A. 1999. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol.* 11:109-16.
- Breyer, M.D., and R.M. Breyer. 2001. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol.* 63:579-605.
- Bulin, C., U. Albrecht, J.G. Bode, A.A. Weber, K. Schror, B. Levkau, and J.W. Fischer. 2004. Differential Effects of Vasodilatory Prostaglandins on Focal Adhesions, Cytoskeletal Architecture, and Migration in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
- Burleigh, M.E., V.R. Babaev, J.A. Oates, R.C. Harris, S. Gautam, D. Riendeau, L.J. Marnett, J.D. Morrow, S. Fazio, and M.F. Linton. 2002. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation.* 105:1816-23.
- Camenisch, T.D., A.P. Spicer, T. Brehm-Gibson, J. Biesterfeldt, M.L. Augustine, A. Calabro, Jr., S. Kubalak, S.E. Klewer, and J.A. McDonald. 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 106:349-60.
- Campbell, J.B., J.L. Glover, and B. Herring. 1988. The influence of endothelial seeding and platelet inhibition on the patency of ePTFE grafts used to replace small arteries--an experimental study. *Eur J Vasc Surg.* 2:365-70.
- Casals-Stenzel, J., M. Buse, and W. Losert. 1983. Comparison of the vasodepressor action of ZK 36 374, a stable prostacyclin derivative, PGI₂ and PGE₁ with

- their effect on platelet aggregation and bleeding time in rats. *Prostaglandins Leukot Med.* 10:197-212.
- Chenevard, R., D. Hurlimann, M. Bechir, F. Enseleit, L. Spieker, M. Hermann, W. Riesen, S. Gay, R.E. Gay, M. Neidhart, B. Michel, T.F. Luscher, G. Noll, and F. Ruschitzka. 2003. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation.* 107:405-9.
- Cipollone, F., C. Prontera, B. Pini, M. Marini, M. Fazia, D. De Cesare, A. Iezzi, S. Uchino, G. Boccoli, V. Saba, F. Chiarelli, F. Cuccurullo, and A. Mezzetti. 2001. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation.* 104:921-7.
- Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 46:205-29.
- Cuff, C.A., D. Kothapalli, I. Azonobi, S. Chun, Y. Zhang, R. Belkin, C. Yeh, A. Secreto, R.K. Assoian, D.J. Rader, and E. Pure. 2001. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest.* 108:1031-40.
- Day, A.J. 1999. The structure and regulation of hyaluronan-binding proteins. *Biochem Soc Trans.* 27:115-21.
- Day, A.J., and G.D. Prestwich. 2002. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem.* 277:4585-8.
- de La Motte, C.A., V.C. Hascall, A. Calabro, B. Yen-Lieberman, and S.A. Strong. 1999. Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C). *J Biol Chem.* 274:30747-55.
- de la Motte, C.A., V.C. Hascall, J. Drazba, S.K. Bandyopadhyay, and S.A. Strong. 2003. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol.* 163:121-33.
- Debey, S., L. Kirchrath, K. Schror, and J. Meyer-Kirchrath. 2003. Iloprost down-regulates the expression of the growth regulatory gene Cyr61 in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 474:161-4.

- Delpech, B., J.P. Vannier, N. Girard, M. Bizet, A. Delpech, B. Lenormand, H. Tilly, and H. Piguet. 1993. Expression of the hyaluronan-binding glycoprotein hyaluronectin in leukemias. *Leukemia*. 7:172-6.
- Englesbe, M.J., J. Deou, B.D. Bourns, A.W. Clowes, and G. Daum. 2004. Interleukin-1 β inhibits PDGF-BB-induced migration by cooperating with PDGF-BB to induce cyclooxygenase-2 expression in baboon aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 39:1091-6.
- Evanko, S.P., J.C. Angello, and T.N. 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*. 19:1004-13.
- Evanko, S.P., E.W. Raines, R. Ross, L.I. Gold, and T.N. Wight. 1998. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*. 152:533-46.
- Evanko, S.P., and T.N. Wight. 1999. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem*. 47:1331-42.
- Felsher, D.W. 2004. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 14(1):37-42.
- Fieber, C., P. Baumann, R. Vallon, C. Termeer, J.C. Simon, M. Hofmann, P. Angel, P. Herrlich, and J.P. Sleeman. 2004. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci*. 117:359-67.
- Gardiner, P.J. 1986. Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (psi) using a highly selective agonist, TR4979. *Br J Pharmacol*. 87:45-56.
- Ghatak, S., S. Misra, and B.P. Toole. 2002. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 277:38013-20.
- Hall, C.L., L.A. Lange, D.A. Prober, S. Zhang, and E.A. Turley. 1996. pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene*. 13:2213-24.
- Hall, C.L., C. Wang, L.A. Lange, and E.A. Turley. 1994. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol*. 126:575-88.

- Honda, A., Y. Sekiguchi, and Y. Mori. 1993. Prostaglandin E2 stimulates cyclic AMP-mediated hyaluronan synthesis in rabbit pericardial mesothelial cells. *Biochem J.* 292 (Pt 2):497-502.
- Horai, S., R. Kondo, K. Murayama, S. Hayashi, H. Koike, and N. Nakai. 1991. Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 333:409-16; discussion 416-7.
- Itano, N., F. Atsumi, T. Sawai, Y. Yamada, O. Miyaishi, T. Senga, M. Hamaguchi, and K. Kimata. 2002. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3609-14.
- Itano, N., T. Sawai, O. Miyaishi, and K. Kimata. 1999a. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 59:2499-504.
- Itano, N., T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, T. Shinomura, M. Hamaguchi, Y. Yoshida, Y. Ohnuki, S. Miyauchi, A.P. Spicer, J.A. McDonald, and K. Kimata. 1999b. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 274:25085-92.
- Ivanov, D., M. Philippova, V. Tkachuk, P. Erne, and T. Resink. 2004. Cell adhesion molecule T-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility. *Exp Cell Res.* 293:207-18.
- Jacobson, A., J. Brinck, M.J. Briskin, A.P. Spicer, and P. Heldin. 2000. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J.* 348 Pt 1:29-35.
- Kaback, L.A., and T.J. Smith. 1999. Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:4079-84.
- Kamikura, D.M., H. Khoury, C. Maroun, M.A. Naujokas, and M. Park. 2000. Enhanced transformation by a plasma membrane-associated met oncoprotein: activation of a phosphoinositide 3'-kinase-dependent autocrine loop involving hyaluronic acid and CD44. *Mol Cell Biol.* 20:3482-96.

- Knudson, A.G., and O. Hino. 1997. Meeting report: genetic environmental interactions in cancer susceptibility in animal models. *J Natl Cancer Inst.* 89:1669-72.
- Knudson, C.B., and B.P. Toole. 1985. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol.* 112:308-18.
- Kolodgie, F.D., A.P. Burke, A. Farb, D.K. Weber, R. Kutys, T.N. Wight, and R. Virmani. 2002. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1642-8.
- Kosaki, R., K. Watanabe, and Y. Yamaguchi. 1999. Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.* 59:1141-5.
- Lawrence, R.A., and R.L. Jones. 1992. Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br J Pharmacol.* 105:817-24.
- Lazaar, A.L., S.M. Albelda, J.M. Pilewski, B. Brennan, E. Pure, and R.A. Panettieri, Jr. 1994. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med.* 180:807-16.
- Lefkowitz, R.J., and J.T. Willerson. 2001. Prospects for cardiovascular research. *Jama.* 285:581-7.
- Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 54:271-335.
- Levesque, H., N. Girard, C. Maingonnat, A. Delpech, C. Chauzy, J. Tayot, H. Courtois, and B. Delpech. 1994. Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis.* 105:51-62.
- Lokeshwar, V.B., N. Iida, and L.Y. Bourguignon. 1996. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 271:23853-64.
- Lokeshwar, V.B., and M.G. Selzer. 2000. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 275:27641-9.

- Maehama, T., and J.E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273:13375-8.
- Matrosova, V.Y., I.A. Orlovskaya, N. Serobyanyan, and S.K. Khaldoyanidi. 2004. Hyaluronic acid facilitates the recovery of hematopoiesis following 5-fluorouracil administration. *Stem Cells.* 22:544-55.
- Merrilees, M.J., J.M. Lemire, J.W. Fischer, M.G. Kinsella, K.R. Braun, A.W. Clowes, and T.N. Wight. 2002. Retrovirally mediated overexpression of versican v3 by arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointima after vascular injury. *Circ Res.* 90:481-7.
- Merzak, A., S. Koocheckpour, and G.J. Pilkington. 1994. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 54:3988-92.
- Mirza, A.M., S. Gysin, N. Malek, K. Nakayama, J.M. Roberts, and M. McMahon. 2004. Cooperative Regulation of the Cell Division Cycle by the Protein Kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol.* 24:10868-81.
- Mohapatra, S., X. Yang, J.A. Wright, E.A. Turley, and A.H. Greenberg. 1996. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J Exp Med.* 183:1663-8.
- Moncada, S., P. Needleman, S. Bunting, and J.R. Vane. 1976. Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. *Prostaglandins.* 12:323-35.
- Murakami, M., H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh, and I. Kudo. 2000. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 275:32783-92.
- Nagase, H., and J.F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274:21491-4.
- Nandi, A., P. Estess, and M.H. Siegelman. 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 275:14939-48.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79:1193-226.

- Ogorochi, T., M. Ujihara, and S. Narumiya. 1987. Purification and properties of prostaglandin H-E isomerase from the cytosol of human brain: identification as anionic forms of glutathione S-transferase. *J Neurochem.* 48:900-9.
- Okada, Y., and G. Hashimoto. 2001. [Degradation of extracellular matrix by matrix metalloproteinases and joint destruction]. *Seikagaku.* 73:1309-21.
- Oliferenko, S., I. Kaverina, J.V. Small, and L.A. Huber. 2000. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J Cell Biol.* 148:1159-64.
- Owen, J.D., P.J. Ruest, D.W. Fry, and S.K. Hanks. 1999. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol.* 19:4806-18.
- Owens, F.N., D.R. Gill, D.S. Secrist, and S.W. Coleman. 1995. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *J Anim Sci.* 73:3152-72.
- Papakonstantinou, E., M. Roth, L.H. Block, V. Mirtsou-Fidani, P. Argiriadis, and G. Karakiulakis. 1998. The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atheromatic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Atherosclerosis.* 138:79-89.
- Parkar, A.A., J.D. Kahmann, S.L. Howat, M.T. Bayliss, and A.J. Day. 1998. TSG-6 interacts with hyaluronan and aggrecan in a pH-dependent manner via a common functional element: implications for its regulation in inflamed cartilage. *FEBS Lett.* 428:171-6.
- Plenz, G.A., M.C. Deng, H. Robenek, and W. Volker. 2003. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 166:1-11.
- Ramesh, R., I. Ito, B. Gopalan, Y. Saito, A.M. Mhashilkar, and S. Chada. 2004. Ectopic production of MDA-7/IL-24 inhibits invasion and migration of human lung cancer cells. *Mol Ther.* 9:510-8.
- Reimer, R., H.K. Heim, R. Muallem, H.S. Odes, and K.F. Sewing. 1992. Effects of EP-receptor subtype specific agonists and other prostanoids on adenylate cyclase activity of duodenal epithelial cells. *Prostaglandins.* 44:485-93.

- Riessen, R., T.N. Wight, C. Pastore, C. Henley, and J.M. Isner. 1996. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 93:1141-7.
- Rilla, K., M.J. Lammi, R. Sironen, K. Torronen, M. Luukkonen, V.C. Hascall, R.J. Midura, M. Hyttinen, J. Pelkonen, M. Tammi, and R. Tammi. 2002. Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (Has2) genes. *J Cell Sci*. 115:3633-43.
- Ropponen, K.M., M.J. Eskelinen, P.K. Lipponen, E. Alhava, and V.M. Kosma. 1997. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol*. 182:318-24.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 138:S419-20.
- Sanjo, H., T. Kawai, and S. Akira. 1998. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem*. 273:29066-71.
- Schönbeck, U., G.K. Sukhova, P. Graber, S. Coulter, and P. Libby. 1999. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 155:1281-91.
- Schrör, K., and R. Verheggen. 1988. Use of human post-mortem cerebral blood vessels to study vasospasm. *Trends Pharmacol Sci*. 9:71-4.
- Schwaner, I., R. Seifert, and G. Schultz. 1992. Receptor-mediated increases in cytosolic Ca²⁺ in the human erythroleukaemia cell line involve pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem J*. 281 (Pt 2):301-7.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, D. Ilic, C.K. Klingbeil, E. Schaefer, C.H. Damsky, and D.D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 2:249-56.
- Singleton, P.A., and L.Y. Bourguignon. 2002. CD44v10 interaction with Rho-kinase (ROK) activates inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-mediated Ca²⁺ signaling during hyaluronan (HA)-induced endothelial cell migration. *Cell Motil Cytoskeleton*. 53:293-316.
- Sohara, Y., N. Ishiguro, K. Machida, H. Kurata, A.A. Thant, T. Senga, S. Matsuda, K. Kimata, H. Iwata, and M. Hamaguchi. 2001. Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and

- phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. *Mol Biol Cell*. 12:1859-68.
- Spicer, A.P., and J.A. McDonald. 1998. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem*. 273:1923-32.
- Sroka, J., M. von Gunten, G.A. Dunn, and H.U. Keller. 2002. Phenotype modulation in non-adherent and adherent sublines of Walker carcinosarcoma cells: the role of cell-substratum contacts and microtubules in controlling cell shape, locomotion and cytoskeletal structure. *Int J Biochem Cell Biol*. 34:882-99.
- Tolg, C., R. Poon, R. Fodde, E.A. Turley, and B.A. Alman. 2003. Genetic deletion of receptor for hyaluronan-mediated motility (Rhamm) attenuates the formation of aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene*. 22:6873-82.
- Toole, B.P. 2002. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*. 12:37R-42R.
- Town, M.H., E. Schillinger, A. Speckenbach, and G. Prior. 1982. Identification and characterisation of a prostacyclin-like receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analogue, ciloprost, as radioactive ligand. *Prostaglandins*. 24:61-72.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, and A. Kawai. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol*. 126:391-401.
- Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon. 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 277:4589-92.
- Weber, A-A, T.P. Zucker, A. Hasse, D. Bönisch, M. Wittpoth and K. Schrör. 1998. Antimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 93:54-57.
- West, D.C., and S. Kumar. 1989. Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp*. 143:187-201; discussion 201-7, 281-5.
- Wight, T.N., and M.J. Merrilees. 2004. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res*. 94:1158-67.
- Wisniewski, H.G., J.C. Hua, D.M. Poppers, D. Naime, J. Vilcek, and B.N. Cronstein. 1996. TNF/IL -1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *J Immunol*. 156:1609-15.

- Wisniewski, H.G., and J. Vilcek. 1997. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:143-56.
- Wong, S.T., L.P. Baker, K. Trinh, M. Hetman, L.A. Suzuki, D.R. Storm, and K.E. Bornfeldt. 2001. Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E(2)-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 276:34206-12.
- Yaron, M., I. Yaron, C. Wiletzki, and U. Zor. 1978. Interrelationship between stimulation of prostaglandin E and hyaluronate production by poly (I) . poly (C) and interferon in synovial fibroblast culture. *Arthritis Rheum.* 21:694-8.
- Zoltan-Jones, A., L. Huang, S. Ghatak, and B.P. Toole. 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem.* 278:45801-10.

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an Herr Prof. Dr. J.W. Fischer für die Vergabe des äußerst interessanten Themas, für das Engagement, die Diskussionsbereitschaft, sowie für die zahlreichen motivierenden und aufmunternden Worte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. K. Schrör danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Zusätzlich danke ich Peggy Mann für die Unterstützung bei zahlreichen Experimenten in so manchen „Stresssituationen“.

Auch möchte mich bei den anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe und den restlichen Mitarbeitern des Institutes bedanken, für die freundschaftliche, lockere und spaßige Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Erika Lohmann und Karin Montag für die geduldige Unterstützung bei zahlreichen organisatorischen Angelegenheiten.

Besonders danke ich meinem lieben Freund Jörg van den Boom, für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine Geduld, sowie für zahlreiche tröstende und so manches aufmunternde Wort zur richtigen Zeit.

Ich danke meiner Mutter, Gerd und meiner Schwester Nadine, für die moralische Unterstützung während der Promotion und in so manchen anderen „stressigen“ Lebenslagen.

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Düsseldorf, den

Lebenslauf

Melanie Sussmann

ledig, geboren am 26.6.1977 in
Dinslaken

Schulausbildung

August 1987-Juni 1996

Theodor-Heuss-Gymnasium
Dinslaken; Abschluss Abitur

Studium und Promotion

Oktober 1996 – Februar 2002

Studium der Biologie an
der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
Hauptfach Mikrobiologie,
Diplomarbeit am Institut für
Mikrobiologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
bei Priv. Dozent Ramezani-Rad
(Thema: Funktionsanalyse der
RA-Domäne des Ste50 Adap-
torproteins aus der Hefe
Saccharomyces cerevisiae.)

März 2002 – Dezember 2004

Promotion am Institut für
Pharmakologie und Klinische
Pharmakologie bei Prof. J.W.
Fischer (Thema: Unter-
suchungen zur Regulation und
Funktion der Hyaluronsäure-
synthase-2 an humanen glatten
Gefäßmuskelzellen.)

Düsseldorf, den

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Publikation

Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. **Circ Res** 94: 592-600 (2004)

Kongressbeiträge

Vorträge

1) Sussmann, M.; Meyer-Kirchrath, J.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2003) ;Induction of HAS2-Expression by prostaglandins in human vascular smooth muscle cells is mediated via IP- and EP2-Receptors'. September 2003, *3rd international Conference on Proteoglycans; The Harden Conferences*; Parma, Italien.

2) Sussmann, M.; Sarbia, M.; Meyer-Kirchrath, J.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2003)
Induction of HAS2-Expression by vasodilatory prostaglandins in human vascular smooth muscle cells, *Hyaluronan 2003*; Cleveland, USA.

3) Sussmann, M.; Sarbia, M., Meyer-Kirchrath, J.; Schrör, K. ;Fischer, J.W. (2004).
Vasodilatory prostaglandins stimulate HAS2-expression and hyaluronic acid synhtesis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.*; 369:R34 (134).

4) Sussmann, M.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2004). Inhibition of HAS2 Expression by siRNA inhibits phosphorylation of focal adhesion kinase and migration in smooth muscle cells. *11th Gordon Research Conference, Proteoglycans*; Procter Acadamy, Andover, New Hampshire, USA.

5) Sussmann, M.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2004). Inhibition of HAS2 Expression by siRNA inhibits phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 110, III-276

Poster

1) Sussmann, M; Meyer-Kirchrath, J.; Fischer, J.W.; Schrör, K. (2003). Prostacyclin stimulates hyaluronic acid (HA) synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.*; 367:R40 (146).

2) Sussmann, M; Meyer-Kirchrath, J.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2003). cAMP/PKA dependent induction of hyaluronic acid synthase-2 (*HAS-2*) in human vascular smooth muscle cells by IP- and EP2 receptor ligands. *Circulation*, 108, IV-193

3) Sussmann, M.; Schrör, K.; Fischer, J.W. (2004) ;Effects of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) on the phenotype of human vascular smooth muscle cells. *Deutsch. Med. Wochenschr.* 129: S141-S172; Supplement 3.