

Aus dem Institut
für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J. W. Fischer

**Die Wirkung von Adenosin auf die Hyaluronsäure-Synthese und
die mRNA Expression der Hyaluronsäuresynthasen 1-3 an
humanen koronar-arteriellen glatten Muskelzellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Johanna Hoffmann

2016

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis.

Basic Res Cardiol. 2013;108(2):340. doi: 10.1007/s00395-013-0340-6. Epub 2013 Feb 26.

Grandoch M¹, Hoffmann J, Röck K, Wenzel F, Oberhuber A, Schelzig H, Fischer JW.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Atherosklerose	1
1.2	Hyaluronsäure.....	2
1.2.1	Struktur und Funktion	2
1.2.2	Hyaluronsäuresynthese und –abbau	3
1.2.3	Hyaluronsäurerezeptoren	3
1.3	Adenosin	4
1.4	Zielsetzung.....	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Substanzen.....	8
2.1.2	Zellkultur	8
2.1.3	Chemikalien und Kits	9
2.1.4	Antikörper	9
2.1.5	Geräte und Material	10
2.2	Methoden	11
2.2.1	Zellkultur	11
2.2.2	Bestimmung der mRNA-Expression der HAS-1-3	12
2.2.3	Bestimmung der HA im Medium	15
2.2.4	Immunhistochemische Färbungen.....	16
2.2.5	PARP-Western	17
2.2.6	Statistische Auswertung	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Adenosinrezeptorexpression auf HCASMC	19
3.2	HA-Produktion nach unspezifischer Stimulation der Adenosinrezeptoren...	19
3.2.1	Veränderung der HA-Produktion und des Phänotyps der HCASMC nach Stimulation mit NECA.....	21
3.2.2	Veränderung der HA-Produktion und des Phänotyps der HCASMC nach Stimulation mit CADO	23
3.3	Einfluss von NECA und CADO auf die mRNA-Expression der verschiedenen Hyaluronsäuresynthaseisoformen (HAS-1-3)	24

3.3.1	HAS-1	24
3.3.2	HAS-2	25
3.3.3	HAS-3v1	26
3.3.4	HAS-3v2	27
3.4	Untersuchungen zu Apoptose und Zytoskelettschädigung unter NECA/CADO	28
3.4.1	PARP-Western	29
3.4.2	Darstellung des Zytoskeletts mit Phalloidin und immunhistochemischer Färbung	31
3.5	Einfluss der verschiedenen Adenosinrezeptorsubtypen auf die Regulation der mRNA Expression der HAS-1	33
3.5.1	Stimulation der AdoRA-Subtypen mit spezifischen Agonisten	33
3.5.2	Inhibition der HAS-1 mRNA Expressionssteigerung	36
3.6	Antagonisierung der durch NECA Stimulation gesteigerten HA-Produktion	40
4	Diskussion	42
4.1	Effekte von NECA und CADO auf die HA Produktion der HCASMC	42
4.1.1	Effekt von NECA und CADO auf die Sezernierung der HA ins Medium	43
4.1.2	Effekt von NECA und CADO auf den perizellulären HA-Mantel und die Ausbildung von HA Kabeln	43
4.2	Phänotypische Effekte von NECA und CADO auf das Zytoskelett der HCASMC	44
4.3	Effekte von NECA und CADO auf die Apoptoserate der HCASMC	44
4.4	Effekte der Stimulation mit NECA und CADO auf die mRNA Expression der HAS-Isoenzyme	45
4.4.1	Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit NECA und CADO	46
4.5	Bedeutung der Adenosin Rezeptorsubtypen in der Regulation der HAS-1 mRNA Expression und der veränderten HA Produktion	46
4.5.1	Spezielle Bedeutung des AdoRA ₂ (A) für und Einordnung in die Atheroskleroseentstehung	47
4.6	Zusammenfassung und Einordnung in die kardiovaskuläre Forschung ..	48
5	Abkürzungsverzeichnis	iii
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	v
7	Abbildungsverzeichnis	ix
8	Tabellenverzeichnis	xi
9	Anhang	xii
9.1	Danksagung	xii
9.2	Eidesstattliche Erklärung	xiii

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie der Herzinfarkt stellen in den westlichen Ländern die häufigste Todesursache dar und die Atherosklerose ist eine der wichtigsten Verursacher dieser Erkrankungen [1]. Atherosklerose bezeichnet ein multifaktorielles Geschehen, welches durch Lipideinlagerungen und die Bildung fibröser Plaques in der Neointima von Gefäßen gekennzeichnet ist. Obwohl bei Älteren häufiger auftretend, sind auch schon junge Menschen, unabhängig von Herkunft und Ernährung, betroffen [2]. Bestimmte Risikofaktoren wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes, Rauchen, Metabolisches Syndrom und Bewegungsmangel erhöhen die Wahrscheinlichkeit atherosklerotische Läsionen zu entwickeln stark. Die wichtigste Theorie zur Entstehung der Atherosklerose ist die sogenannte response-to-injury Theorie, welche 1977 von Ross et al. aufgestellt wurde [3]. Diese besagt, dass der erste Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose eine Verletzung der Gefäßintima ist. Dies führt zu einer entzündlichen Reaktion, in deren Verlauf es zur Ausschüttung von Zytokinen und der Migration von Monozyten in die Gefäßwand kommt. Die Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass es bei Atherosklerose als entzündlichem Prozess [4], zur Akkumulation großer Mengen Hyaluronsäure (HA) in den Plaques und der Neointima kommt [5]. HA ist hier sowohl für den Verschluss der Gefäße, als auch für die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems verantwortlich [5] .

1.2 Hyaluronsäure

1.2.1 Struktur und Funktion

Hyaluronsäure (HA) ist ein ubiquitär vorkommendes, unverzweigtes und nicht sulfatiertes Glykosaminoglykan, welches als Bestandteil der Extrazellulären Matrix (EZM) 1934 das erste Mal von Karl Mayer und John Palmer im Glaskörper eines Kuhauges entdeckt wurde und zunächst lange Zeit als einfaches Füllmaterial betrachtet wurde. Sie setzt sich unter physiologischen Bedingungen aus 2.000-25.000 repetitiven Disaccharideinheiten zusammen. Diese bestehen aus D-Glukuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin, welche β 1,3, bzw. 1,4 verknüpft sind, und mit einem Molekulargewicht von 10^6 - 10^7 Da Polymere von 2- 25 μm^2 bilden (siehe **Abbildung 1-1**).

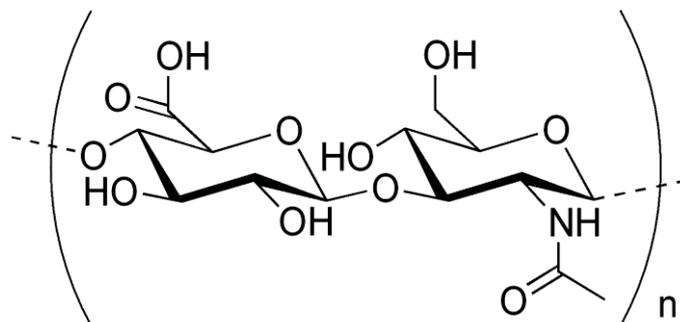


Abbildung 1-1: Hyaluronsäure: D-Glukuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin β (1-4) bzw. β (1-3)verknüpft

Als Bestandteil der EZM kommen ihr verschiedene Aufgaben zu. So ist sie als polyanionisches, großes Molekül in der Lage das 1000-fache ihres eigenen Gewichts an Wasser zu binden und gewährleistet Viskosität, Elastizität und Filterfunktionen, z.B. in der Synovialflüssigkeit von Gelenken und dem Augapfel. Durch vielfältige Bindungen zu anderen Proteoglykanen der EZM, wie Versican und Aggrecan, ist HA an der Bildung der perizellulären Matrix beteiligt, die z.B. während der Embryogenese auch Voraussetzung für Migration und Proliferation

Einleitung

der Zellen darstellt [6]. Auch während der Wundheilung kommt es zur Akkumulation großer Mengen an HA [7] [8].

Die spezifische Wirkung der HA hängt von ihrer Größe ab. Niedermolekulare HA-Fragmente, wie sie beim Abbau entstehen, wirken inflammatorisch, pro-angiogenetisch und migrationsfördernd, hochmolekulare HA hingegen wirkt anti-angiogenetisch und immunsupprimierend [9] [10] [11] [12] .

Diese vielen verschiedenen Funktionen der HA werden durch eine Vielzahl verschiedener Hyaluronsäure-bindender-Proteine, wie CD44 (*cluster of differentiation 44*), LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) und RHAMM (*Receptor of Hyaluronan mediated motility*) [13] und deren unterschiedliche Signalkaskaden ermöglicht.

1.2.2 Hyaluronsäuresynthese und –abbau

Im Gegensatz zu allen anderen Glykosaminoglykanen wird die HA nicht in Zellorganellen, sondern von drei in die Zytoplasmamembran integrierten Synthesen mit Glykosyltransferaseaktivität an der Innenseite der Zellplasmamembran synthetisiert und dann mit Hilfe von *ATP-binding-cassette-transporters* (ABC-Transportern) in die EZM abgegeben wird. Die Isoformen der Hyaluronsäuresynthesen (HAS) produzieren HA unterschiedlicher molekularer Masse, HAS-1 und HAS-2 bilden Polymere von 2×10^5 - 2×10^6 Da, HAS-3v1, eine der zwei Spleißvarianten von HAS 3, bildet Polymere mit einem Gewicht von 1×10^5 bis 1×10^6 Da. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob HAS-3v2 auch HA produziert [14] [15] [16].

Abgebaut wird HA überwiegend durch die Hyaluronidase 1 (Hyal 1) und 2 (Hyal 2), wobei Hyal 2 den ersten Schritt des Abbaus übernimmt und HA in ca. 20 kDa kleine Moleküle spaltet, Hyal 1 baut diese dann in den Lysosomen zu nur wenige Disaccharideinheiten großen Molekülen ab [17] [18].

1.2.3 Hyaluronsäurerezeptoren

CD44, der erste identifizierte Hyaluronsäurerezeptor, ist membranständig und in unterschiedlichen Spleißvarianten auf vielen Zellen zu finden. Er dient u.a. der Anheftung und Migration von Lymphozyten während inflammatorischer

Einleitung

Geschehen [19] und ist am Um- und Abbau der EZM an der Zelloberfläche beteiligt.

Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist der sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommende RHAMM (*Receptor of Hyaluronan mediated motility*), welcher sowohl beim Aufbau des Zytoskeletts, als auch bei der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie dem für die Motilität wichtigen Ras GTPase Weg eine entscheidende Rolle spielt [20].

1.3 Adenosin

Adenosin ist ein ubiquitär vorkommendes Nucleosid, bestehend aus der Base Adenin, welche über eine β -N₉-glykosidische Bindung an den Zucker Ribose gebunden ist (siehe **Abbildung 1-2**). Adenosin kommt sowohl als Baustein energieliefernder Nucleotide wie Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) als auch als aktives Autakoid im Körper vor [21].

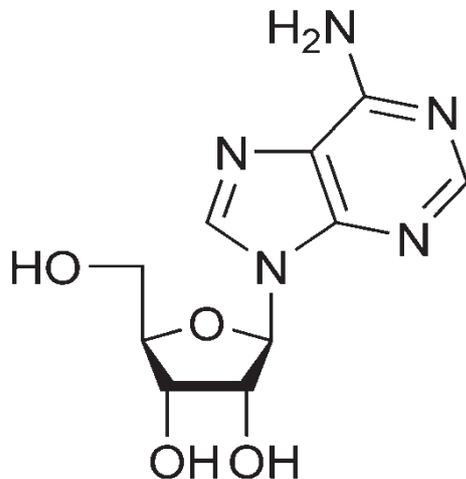


Abbildung 1-2: Adenosin: Adenin und Ribose, β -N-glykosidisch verknüpft

Extrazellulär befinden sich die Konzentrationen im gesunden Gewebe zwischen 30 und 300 nM [22]. Der Großteil des extrazellulär vorkommenden Adenosins entsteht in den Geweben durch den Abbau von ATP [23]. ATP wird von verschiedenen Zellen wie Thrombozyten, aktivierten Granulozyten und Endothelzellen ausgeschüttet und an der Plasmamembran über CD39 (Ecto-Nucleosid-Triphosphat-Diphosphorylase/ ATP-Diphosphohydrolase) erst zu

Einleitung

Adenosinmonophosphat (AMP) und schließlich über die membranständige Ecto-5'-Nucleotidase/ CD73 zu Adenosin abgebaut [24]. Desweiteren entsteht Adenosin auch intrazellulär durch die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein. Über den sogenannten Salvage-pathway werden ca. 90% des so entstandenen Adenosins über die Adenosinkinase wieder zu AMP phosphoryliert. Ein weiterer Teil wird entweder über die Adenosin-Deaminase aus Adenosin oder aus Inosin-Monophosphat zu Inosin umgebaut.

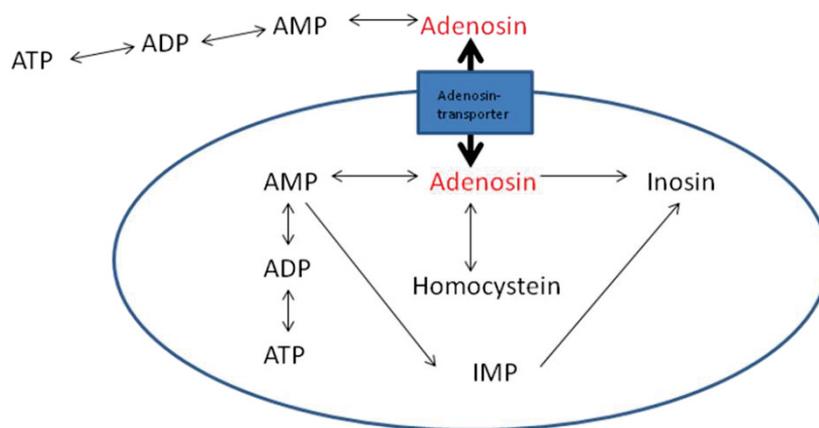


Abbildung 1-3: Regulation extra- und intrazellulärer Adenosinkonzentrationen

Der Transport des Adenosins über die Plasmamembran der Zelle findet über passive *Equilibrative Nucleoside Transporters* (ENTs) und aktive *Concentrative NTs* (CNT) statt. Der bei Weitem wichtigste Transporter ist der ENT1, welcher auf allen Geweben vorkommt, allerdings je nach Gewebe unterschiedlich stark exprimiert wird [25]. Normalerweise fungiert er als Diffusions-limitierter bidirektionaler Transporter, steigt die extrazelluläre Adenosinkonzentration, transportiert er es vornehmlich in den Intrazellularraum und beeinflusst so die Adenosinwirkung an Gefäßen.

Adenosin wirkt unter anderem über vier G-Protein gekoppelte Adenosinrezeptorsubtypen A_1 (AdoRA₁), $A_2(A)$ (AdoRA_{2(A)}), $A_2(B)$ (AdoRA_{2(B)}) und A_3 (AdoRA₃), welche je nach Gewebe und Organismus unterschiedlich stark exprimiert werden [26]. Während AdoRA₁ und AdoRA₃ G_i- und G_o-gekoppelt den cAMP Spiegel der Zelle verringern und den IP₃/DAG Spiegel erhöhen, erhöhen die beiden G_{qs}-gekoppelten AdoRA₂ über eine Aktivierung der Adenylatzyklase

Einleitung

den cAMP Spiegel. Die Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen des Adenosins lässt sich dadurch erklären, dass neben den G_{α} -gekoppelten Signalkaskaden weitere Signalkaskaden möglich sind. So ist beispielsweise der AdoRA₂(B) auch G_q -gekoppelt und nimmt somit Einfluss auf die PhospholipaseC-IP₃ Signalkaskade der Zelle [21].

1.4 Zielsetzung

Sowohl Adenosin als auch Hyaluronsäure sind wichtige Komponenten in der Reaktion verschiedener Zelltypen auf entzündliche Prozesse im Rahmen der Atherosklerose. Das Zusammenspiel von Adenosin und Hyaluronsäure wurde bisher erst wenig untersucht. Bekannt ist, dass niedermolekulare HA, wie sie beim Abbau in entzündlich verändertem Gewebe entsteht, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine erhöht. Neueste Forschungen zeigen, dass die Stimulation von Makrophagen mit niedermolekularer HA in Verbindung mit CGS 21680, einem spezifischen AdoRA₂(A) Agonisten, zu einer signifikanten Reduktion pro-inflammatorischer TNF- α Genexpression führt [27]. Hyaluronsäure und Adenosin beeinflussen sich in ihrer Wirkung auf verschiedene Zelltypen während inflammatorischer Prozesse im Gewebe demnach gegenseitig. Es stellt sich die Frage, inwiefern humane koronararterielle glatte Muskelzellen (HCASMC), welche durch Migration und Proliferation einen wichtigen Anteil an der Bildung atherosklerotischer Plaques haben, mit ihrer Hyaluronsäuresynthese auf erhöhte Adenosinkonzentrationen in ihrer direkten Umgebung reagieren.

Ziel der Dissertation ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Ist die Expression von Adenosinrezeptoren auf mRNA Ebene in HCASMC nachweisbar?
2. Auf welche der Hyaluronsäuresynthasen 1-3 übt Adenosin auf transkriptioneller Ebene Effekte aus?
3. Hat Adenosin einen Einfluss auf die Hyaluronsäureproduktion der HCASMC?
4. Lässt sich diese Wirkung einem einzelnen der exprimierten Adenosinrezeptorsubtypen zuordnen?

Einleitung

5. Wird die Veränderung der Hyaluronsäureproduktion durch den gleichen Rezeptor reguliert, welcher auch für die Veränderung der mRNA Expression der HA-Synthasen verantwortlich zeichnet?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

Tabelle 2-1: Substanzliste Stimulation

Substanzen	Substanzklasse	Hersteller
NECA	Stabiles Adenosinanalogen	Tocris bioscience, Bristol, UK
2-CADO	AdoRA Agonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
CCPA	Selektiver AdoRA ₁ Agonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
CGS 21680 Hydrochlorid	Selektiver AdoRA ₂ (A) Agonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
DPCPX	Selektiver AdoRA ₁ Antagonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
IB-MECA	Selektiver AdoRA ₃ Agonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
MRS 1334	Selektiver AdoRA ₃ Antagonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
MRS 1706	Selektiver inverser AdoRA ₂ (B) Agonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
PBS 603	Selektiver AdoRA ₂ (B) Antagonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
SCH 58261	Selektiver kompetitiver AdoRA ₂ (A) Antagonist	Tocris bioscience, Bristol, UK
Staurosporin	Breitspektrum-Kinase Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2-2: Material Zellkultur

Material	Hersteller
DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle Medium) Zellkulturmedium + Zusatz: Glutamin + Zusatz: nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FCS)	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
Humane glatte Muskelzellen aus Koronararterien	Promocell, Heidelberg
Penicillin/ Streptomycin	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

Material und Methoden

Smooth muscle cell growth medium 2 + Zusatz: "SupplementMix", enthält: - Epidermalen Wachstumsfaktor - Basis Fibroblasten Faktor - Insulin - Fötale Kälber Serum	Promocell, Heidelberg
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien und Kits

Tabelle 2-3: Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (als Lösungsmittel)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid 0,1 M	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd 3,7%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTecRec Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SYBR Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tri-Reagent®	Sigma-Aldrich, München
Triton X100	Sigma-Aldrich, München
Vectashield Antifade Mounting Medium®	Vector Laboratories, USA

2.1.4 Antikörper

Färbungen

Tabelle 2-4: Antikörper Färbungen

Antikörper	Hersteller
biotinyliertes Hyaluronsäurebindeprotein (HABP)	Seikagaku, Japan
FITC-konjugierter Streptavidin Zweitantikörper	DAKO, Hamburg
DAPI-konjugiertes Hoechst 33342	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
FITC-konjugiertes Phalloidin	Sigma-Aldrich, München

Western

Tabelle 2-5: Antikörper Western

Antikörper	Hersteller
PARP rabbit	Cell-signaling, USA
Goat-anti-rabbit Zweitantikörper IR-Dye 800 (grün)	Li-Cor, USA
β-Tubulin mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Donkey-anti-mouse Zweitantikörper IR-Dye 680 (rot)	Li-Cor, USA

2.1.5 Geräte und Material

Tabelle 2-6: Geräte und Material

	Gerät/ Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heracell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific Inc., USA
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop	Zeiss, Jena
Fluoreszenzdetektor Western-Blots	Odyssey [®] Infrared Imaging System	Li-Cor, USA
Heizblock	Schutron Thermoshaker	Wolf Laboratories Ltd., UK
Photometer	Multiscan Ex	Thermo Electron Corporation, Bremen
RNA-Messung	Nanodrop-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Realtime-PCR-Gerät	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Western Blot Transfer Membran	Immobilon-P	Millipore, USA
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht GmbH und Co KG, Sondheim
Zellkultur-Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifugen	- Centrifuge 5415 R (kühlbar) - Megafuge 1.0	Eppendorf, Hamburg Heraeus Sepatech, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung der Zellen

Die humanen, koronararteriellen glatten Muskelzellen (HCASMC) wurden in SMC2-Medium, welchem ein firmeneigenes Supplement und Penicillin/Streptomycin gegen bakterielle Kontamination zugesetzt wurden, im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂ Begasung von 5% kultiviert. Der Mediumswechsel fand alle 3-4 Tage statt. Sobald die Zellen eine 80%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert und für die Experimente eingesetzt.

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und mit PBS gespült, um eventuell vorhandene tote Zellen so weit wie möglich zu entfernen. Durch 3-minütige Inkubation mit 1x Trypsin wurden die Zellen gelöst, diese Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM mit 10% FCS gestoppt und die gelösten Zellen wurden in ein steriles Falcon-Tube überführt. Bei 1000 rpm wurden die Zellen abzentrifugiert und das Medium abgesaugt. Das am Boden des Falcon-Tubes befindliche Zellpellet wurde in neuem SMC2-Medium resuspendiert und 10 µL entnommen, welche zur Zellzählung mit 10 µL Trypanblau versetzt wurden. Hiervon wurden 10 µL in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Trypanblau wird nur durch die permeable Zellwand abgestorbener Zellen aufgenommen, so dass diese gut zu erkennen sind und später nicht in die Berechnung der Zellzahl einfließen.

Die Zellen wurden dann in neue Kulturflaschen zur Weiterzucht oder in 12-Loch-Platten für die Experimente ausgesät.

Stimulation

Für die Stimulationsexperimente wurden die glatten Muskelzellen der Passagen 5-10 mit 50.000 Zellen/cm² in 12-Loch-Platten gesät und anschließend für 24 Stunden in 500 µL SMC2-Medium angezogen. Nach Spülung in PBS wurde das SMC2-Medium für weitere 24 Stunden durch serumfreies DMEM ersetzt, um den Zellen die Nahrung zu entziehen und sie so dazu zu bringen in die G₀ Phase des

Material und Methoden

Zellzyklus überzugehen. Hiermit erreicht man eine möglichst gleiche Reaktion aller Zellen auf die Stimuli, was dazu führt, dass die Ergebnisse eine geringere Streuung aufweisen. Die vorher hergestellten und in Aliquots bei -20 °C gelagerten Stock Lösungen der verschiedenen Stimuli wurden zu den angegebenen Konzentrationen in DMEM verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert. In Versuchen, welche den gleichzeitigen Einsatz von Antagonisten und Agonisten erforderten, wurden die Zellen vor Zugabe des Agonisten eine halbe Stunde im Brutschrank mit dem Antagonisten vorinkubiert. Als Lösungsmittel der Stimuli wurde DMSO gebraucht, welches im Medium eine Endkonzentration von 1,1% nicht überschritt. Zum Ausschluss DMSO-spezifischer Effekte wurde der Kontrollgruppe DMSO in gleicher Konzentration zugesetzt.

2.2.2 Bestimmung der mRNA-Expression der HAS-1-3

mRNA-Isolierung

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums für 10 Minuten mit 500 µL TriReagent pro well versetzt. Hierdurch werden die Zellen lysiert und die RNA freigesetzt. Nach Überführung in ein Eppendorf-Gefäß wurde die wässrige phenolhaltige Phase des TriReagent, mit der darin gelösten RNA, durch Zugabe von Chloroform vom restlichen TriReagent getrennt und nach Abzentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol und erneuter Zentrifugation, diesmal bei 4 °C für 45 Minuten, setzte sich die RNA als Pellet am Boden des Gefäßes ab, und die Flüssigkeit konnte vorsichtig abgeschüttet werden. Nach Waschung mit 70% Ethanol und Zentrifugation wurde auch dieses abgeschüttet und die Eppendorf-Gefäße bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet. Die Proben wurden daraufhin mit 15 µl RNase freiem Wasser auf 65 °C erhitzt, um die Löslichkeit der RNA zu verbessern.

Bestimmung der RNA Konzentration

Die RNA Menge wurde mithilfe des ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 230 nm photometrisch bestimmt. Als Leerwert diente das gleiche RNase freie Wasser (ultra-gefiltert), welches auch zum Lösen der RNA

Material und Methoden

gebraucht wurde. Gemessen wurde jeweils 1 µl einer jeden Probe, der RNA Gehalt wird in ng RNA/ µl angegeben. Zur Fortführung der Experimente wurde nur RNA verwendet, welche wenig Verunreinigungen aufwies; dies wird durch Bildung des Quotienten aus photometrischer Messung bei 260 und 280 nm Wellenlänge ermittelt. Liegt er zwischen 1,5 (absolut rein) und 2,1, können die Proben weiter verwendet werden.

cDNA-Synthese

Um mit Real-Time PCR die Expressionslevel der Gene zu bestimmen, muss die RNA zunächst in doppelsträngige cDNA (copyDNA) umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe des QuantiTecRec Transcription Kit der Firma Qiagen. Hierzu wurden zunächst 1 µg RNA der Proben mit RNase freiem Wasser auf 12 µl Volumen aufgefüllt. Nach dem Zusatz von 2 µl DNA-wipe-out-buffer zur Entfernung genomischer DNA wurde die Mischung für 2 Minuten auf 42°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis überführt. Zu jeder Probe wurden 6 µl des zuvor hergestellten MasterMix aus

4 µl RT-Buffer

1 µl Primer

1 µl Reverse Transkriptase

hinzupipettiert und nach Homogenisierung wurden die Proben im Cycloer für 30 Minuten auf 42°C und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms Reverse Transkriptase für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde in ultrafiltriertem H₂O verdünnt und anschließend bei 4°C gelagert.

Quantitative RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht es, aus den zuvor in cDNA umgeschriebenen Proben bestimmte Nukleotidsequenzen millionenfach zu kopieren. Mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe ist es möglich den Verlauf der DNA Produktion zu verfolgen, die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit dem Entstehen der Produkte zu.

Material und Methoden

Es werden hierfür kurze, gensequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, benötigt, die spezifisch am Beginn und Ende der zu kopierenden DNA-Matrize anlagern (hybridisieren). Da die hitzestabile Taq-Polymerase, das Enzym, welches mit Hilfe der zugefügten Basen die doppelsträngige DNA synthetisiert, nur am 3' Ende des zu vermehrenden Genabschnitts beginnen kann, benötigt man für jeden einzelnen Strang einen eigenen Primer. Durch Erhitzen wird der entstandene Doppelstrang getrennt (denaturiert) und es entstehen neue Matrizen. Bis zum Verbrauch der zugefügten einzelnen Basen wird der Zyklus aus Anlagerung, Synthese, Denaturierung, erneuter Anlagerung wiederholt und die Produktmenge steigt exponentiell an.

Für die quantitative Real-Time PCR wurde SYBR Green® PCR Master Mix genutzt. Die Expressionslevel wurden nach der $2^{[-\Delta\Delta C(T)]}$ Methode berechnet.

PCR- Ansatz

Tabelle 2-7: PCR Ansatz

cDNA	5 µl
H ₂ O	5 µl
qPCR supermix	10 µl
Primer	5 nM; 2,5 µl je Primer

Temperaturprofil

Tabelle 2-8: Temperaturprofil PCR

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

Verwendete Primer

Tabelle 2-9: Primer PCR

Gen	Primer-Sequenzen
humane HAS-1	5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3' 5'-CTGGAGGTGTA CTTGGTAGC-3'

humane HAS-2	5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3' 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
humane HAS-3v1	5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3' 5'-CCCACTAATACTGACACAC-3'
humaner AdoRA ₁	5'-TGCGAGTTCGAGAAGGTCATC-3' 5'-GAGCTGCTTGCGGATTAGGTA-3'
humaner AdoRA ₂ (A)	5'-CGAGGGCTAAGGGCATCATTG-3' 5'-CTCCTTTGGCTGACCGCAGTT-3'
humaner AdoRA ₂ (B)	5'-CTCTTCCTCGCCTGCTTCGTG-3' 5'-TTATACCTGAGCGGGACACAG-3'
humaner AdoRA ₃	5'-TACATCATTGGAACAACTC-3' 5'-GTCTTGA ACTCCCGTCCATAA-3'

Das Expressionsniveau der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) mRNA diente als interne Kontrolle und die relative Expression der Gene wurde auf diese standardisiert.

2.2.3 Bestimmung der HA im Medium

Die Zellkultivierung und Stimulation erfolgte entsprechend des in 3.2.1 angegebenen Protokolls. Das Medium, in welchem die Zellen stimuliert wurden, wurde in sterile Eppendorfgefäße überführt und ein Teil der Probe wurde zur Bestimmung des HA-Gehalts weiterverwendet.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Versuche zu gewährleisten, wird die HA Menge in ng HA/µg Protein angegeben.

Zur Proteinmengenbestimmung wurden die nach Abnahme des Mediums am Zellkulturplattenboden adhärenen Zellen in 75 µl einer 0,1 M NaOH- Lösung lysiert und zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

HA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der ins Medium sezernierten Hyaluronsäuremenge wurde ein Hyaluronic Acid Test Kit benutzt. Dieses besteht aus mit HAbP (Hyaluronsäure bindendes Protein) beschichteten Reagenzgefäßen, in welche die Standards und

Material und Methoden

die den Zellkulturplatten entnommenen Mediumproben pipettiert werden. Die HA in den Proben reagiert jetzt mit dem HAbP und nach einer Stunde Inkubation und anschließender Waschung mit PBS zur Entfernung von freier HA, wurden den Reagenzgefäßen 100 µl Meerrettich-Peroxidase konjugiertes HAbP zugesetzt, welches wiederum mit der schon gebundenen HA Komplexe bildet. Nach erneutem Waschen und Zugabe von Tetramethylbenzidin-Substrat und Wasserstoffperoxid, 30 minütiger Inkubation und Zufügen einer Stopplösung kann die Intensität der Farbreaktion mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm gemessen werden.

Proteinquantifizierung

Von den 1:10 in destilliertem Wasser verdünnten Proteinproben wurden jeweils 5 µl in einer 96-well Platte mit 200 µl des 1:5 verdünnten Bradford-Farbreagens (Biorad) gemischt. Als Standard wurde eine BSA (bovines Serum Albumin) Verdünnungsreihe, mit Proteinkonzentrationen von 400 ng bis 2000 ng, hergestellt und die Proben wurden mit Hilfe eines ELISA-Readers photometrisch bei 595 nm ausgewertet.

Der Korrelationskoeffizient der Standardkurve sollte hierbei $>0,99$ liegen.

2.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Um die extrazelluläre HA und das F-Aktin Zytoskelett der HCASMC mit Hilfe einer Immunhistochemischen Färbung darzustellen, wurden die Zellen zunächst auf kleinen Glasplättchen ausgesät und dann nach Protokoll gezüchtet und stimuliert. Vor der Fixierung mit einer Mischung aus 70% Ethanol, 5% Essigsäure 3,7% Formalinlösung ad 10 ml Wasser wurden sie einmal mit PBS gewaschen. Die verschiedenen Färbungen folgten den in 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschriebenen Protokollen. Nach dem Färben wurden die Glasplättchen mit *Vectashield Antifade Mounting Medium*® eingedeckt und mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop unter Anwendung einer stets gleichen Belichtungszeit und Lasereinstellung.

Färbung der extrazellulären Hyaluronsäure

Der Erstantikörper, biotinyliertes HA-Bindeprotein, wurde 0,4%ig in 3%iger BSA-Blockierlösung angesetzt und die Zellen wurden bei 4° C über Nacht mit der Lösung inkubiert. Die folgenden Färbeschritte fanden im abgedunkelten Raum statt. Nach dreimaligem Waschen in raumtemperiertem PBS wurde der 1:200 in PBS verdünnte Zweitantikörper (FITC-gekoppeltes Streptavidin) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Vor der Kernfärbung wurden die Zellen erneut gewaschen, diesmal 6 mal 5 Minuten. Die Kernfärbung wurde durch 2 minütige Inkubation mit 1:1000 in PBS verdünntem Hoechst 33342 und anschließender 3 mal 5 minütiger PBS-Waschung erreicht.

Färbung des F-Aktin Zytoskeletts

Die auf den Glasplättchen fixierten und gewaschenen Zellen wurden zunächst fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1 % Triton X100 in PBS permeabilisiert. Nach einstündiger Blockierung in 3 % BSA Lösung wurden die Zellen für 20 Minuten mit 0,2 M 1:1000 in PBS verdünntem FITC-markiertem Phalloidin unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS wurde die Kernfärbung wie in 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.5 PARP-Western

Für die Untersuchung der Zellen mittels Western Blots wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend in 1x Lämmli-Puffer unter Zugabe von Proteinaseinhibitoren lysiert. Zur Denaturierung der Proteine wurde das Lysat anschließend für 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, wobei die Konzentration des Acrylamid im Sammelgel 5% und im Trenngel 10% betrug. Die Elektrophorese lief bei 160 V ca. 60 Minuten. Die Laufdauer richtete sich hierbei nach der Proteingröße und wurde mit Hilfe des mitlaufenden gefärbten Proteinstandards (LabTek) abgeschätzt.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine in Methanol aktivierte Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierzu diente eine „Semi-Dry“ Blotapparatur,

Material und Methoden

welche bei 1200 V lief. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit Ponceaurot gefärbt.

Um unspezifische Bindungen der zur Färbung dienenden Antikörper zu verhindern wurde die Membran vor der Färbung für 12 Stunden bei 4°C mit 2%igem TBST-Blockingpuffer behandelt.

Die Färbungen für β -Tubulin und PARP wurden nacheinander durchgeführt, wobei die beiden Erstantikörper (PARP rabbit; β -Tubulin mouse, Sigma) 1:10.000 in PBS verdünnt bei Raumtemperatur inkubierten. Nach 3x 5-minütigem Waschen in TBST wurden die Zweitantikörper (Goat-anti-rabbit IR-Dye 800; Donkey-anti-mouse IR-Dye 680) aufgetragen.

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz erfolgte am Odyssey.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die in dieser Dissertation gezeigten Abbildungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc.) erstellt und statistisch ausgewertet. Gezeigt werden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM). Zur statistischen Analyse wurden One-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur genutzt. Für ein $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Adenosinrezeptorexpression auf HCASMC

Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR konnte gezeigt werden, dass die in den folgenden Experimenten genutzten HCASMC alle vier bekannten Subtypen der Adenosinrezeptorgene exprimieren, wobei die mRNA Expression des Gens für den AdoRA₂(B) Rezeptor mit 54% Gesamtanteil überwiegt. Der Anteil des AdoRA₂(A) liegt mit 13% am niedrigsten. Diese Angaben sind Näherungswerte unter der Annahme, dass die Primereffizienzen ähnlich sind.

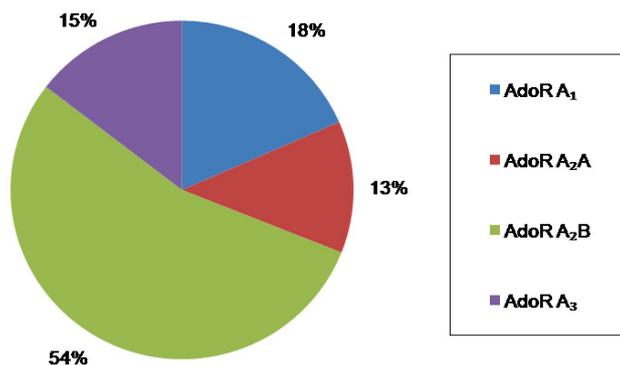


Abbildung 3-1: mRNA-Expression der Adenosinrezeptorisoformen auf nicht stimulierten HCASMC (n=3-5).

3.2 HA-Produktion nach unspezifischer Stimulation der Adenosinrezeptoren

Die sehr kurze Halbwertszeit des Adenosins von etwa 10 Sekunden und die damit verbundene Schwierigkeit, reproduzierbare Versuche durchzuführen, führte zur Verwendung zweier anderer, stabilerer Substanzen: NECA (1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-N-ethyl- β -D-ribofuranuronamid), ein potenter stabiler

Ergebnisse

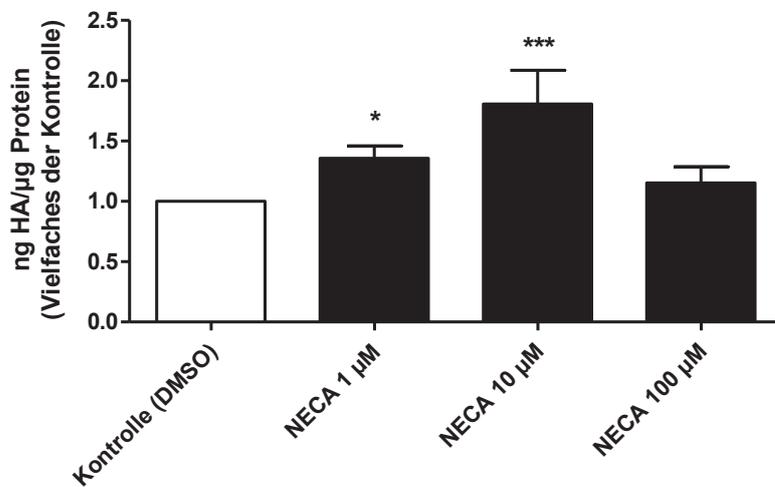
Adenosinrezeptoragonist und CADO (6-Amino-2-chloropurin ribosid), ein metabolisch stabiles Adenosin-Analogon.

Um Veränderungen der HA-Produktion zu untersuchen, wurden die HCASMC zunächst nach Protokoll kultiviert und mit NECA bzw. CADO in Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 100 μM stimuliert. Die HA Bestimmung im Medium erfolgte nach Protokoll.

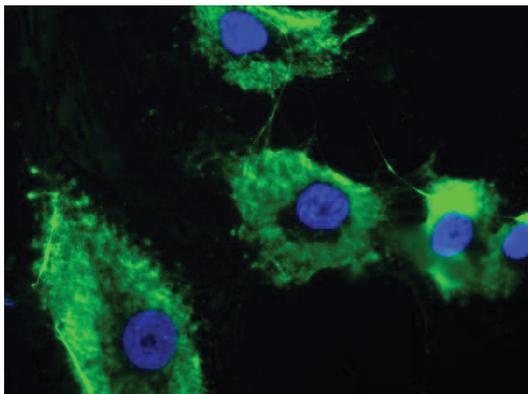
Die zur affinitätshistochemischen Färbung genutzten Zellen wurden auf kleinen Glasplättchen ausgesät und stimuliert, anschließend wurden sie nach Protokoll gefärbt und bei 40x Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

Ergebnisse

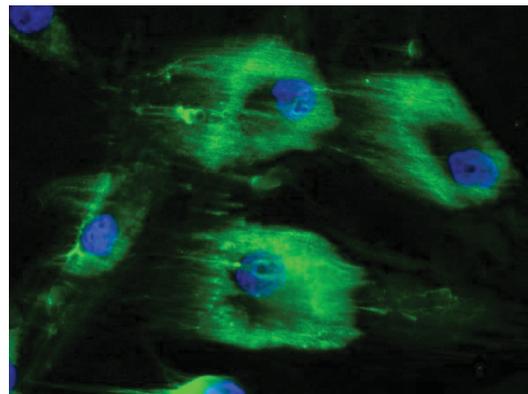
3.2.1 Veränderung der HA-Produktion und des Phänotyps der HCASMC nach Stimulation mit NECA



A



B



C

Abbildung 3-2: Stimulation mit NECA

A: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach 24-stündiger Stimulation mit NECA (1 µM/ 10 µM/ 100 µM) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (n=4-8); Mittelwert ± SEM; *: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle; ***: p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle

B+C: Affinitätshistochemische Färbung der extrazellulären HA und der Zellkerne in der Kontrolle (**B**) und nach 24-stündiger Stimulation mit NECA in einer Konzentration von 10 µM (**C**). 400x Vergrößerung

Wie in Abbildung 4.2.1.A dargestellt, führte die 24-stündige Inkubation der HCASMC mit NECA in Konzentrationen von 1 µM bzw. 10 µM zu einem signifikanten Anstieg der HA Produktion (1,358 ± 0,1007 versus Kontrolle bzw. 1,806 ± 0,2802 versus Kontrolle). Die Inkubation mit einer Konzentration von 100

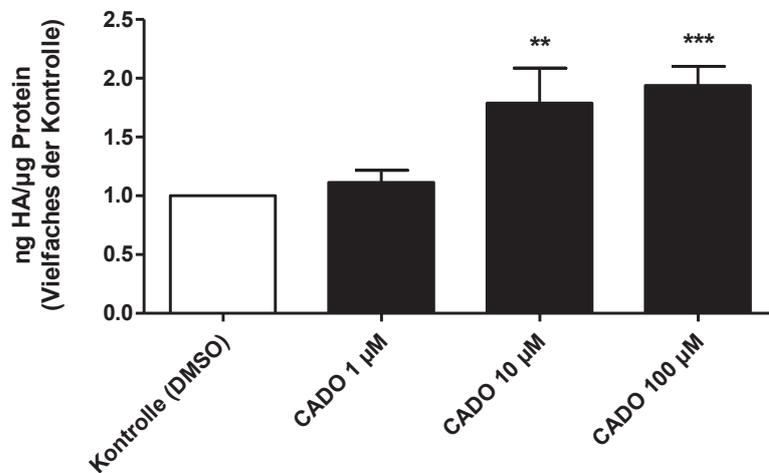
Ergebnisse

μM NECA führte zu keiner nennenswerten Veränderung der HA Konzentration im Medium im Vergleich zur Kontrolle.

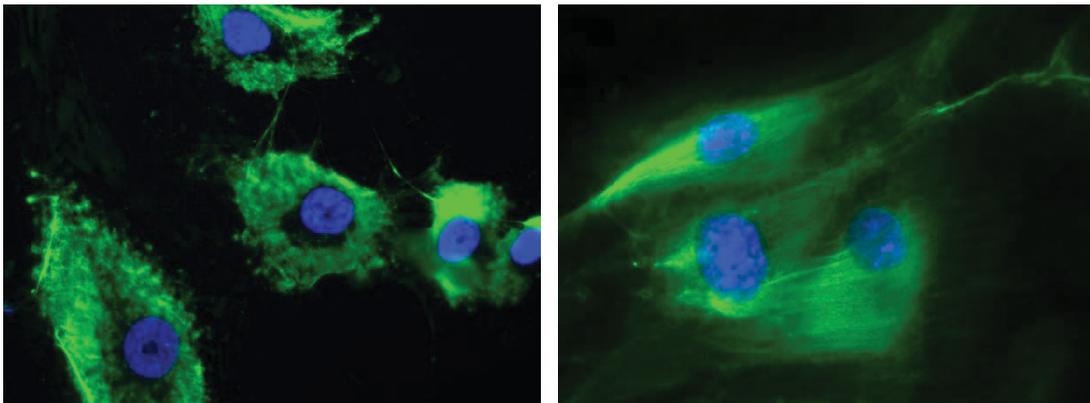
Nach der affinitätshistochemischen Färbung zeigte sich bei den mit NECA inkubierten Zellen unter dem Mikroskop eine Zunahme des perizellulären HA-Mantels, wobei es so wirkte, als würde die HA die Zellen in Form feiner haarähnlicher Strukturen umgeben.

Ergebnisse

3.2.2 Veränderung der HA-Produktion und des Phänotyps der HCASMC nach Stimulation mit CADO



A



B

C

Abbildung 3-3: Stimulation mit CADO

A: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach 24-stündiger Stimulation mit CADO (1 µM/ 10 µM/ 100 µM) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (n=3-4); Mittelwert ± SEM; **: $p < 0,01$

B+C: Affinitätshistochemische Färbung der extrazellulären HA und der Zellkerne in der Kontrolle (**B**) und nach 24-stündiger Stimulation mit CADO in einer Konzentration von 10 µM (**C**). 400x Vergrößerung

Auch die 24-stündige Inkubation mit CADO führte zur Zunahme der HA Konzentration im Medium, wobei die Zunahme bei einer Konzentration von 1 µM geringer ausfiel als bei NECA. Inkubation der Zellen mit CADO in Konzentrationen von 10 µM und 100 µM führte zu signifikantem Anstieg der HA Produktion der Zellen ($1,789 \pm 0,2983$ versus Kontrolle und $1,938 \pm 0,1616$ versus Kontrolle).

Ergebnisse

Eine gegenüber der NECA Stimulation noch deutlicher sichtbare Zunahme der extrazellulären HA, mit vermehrter Bildung haar- und auch kabelähnlicher Strukturen, zeigte sich in der mikroskopischen Betrachtung der affinitätshistochemischen Färbung.

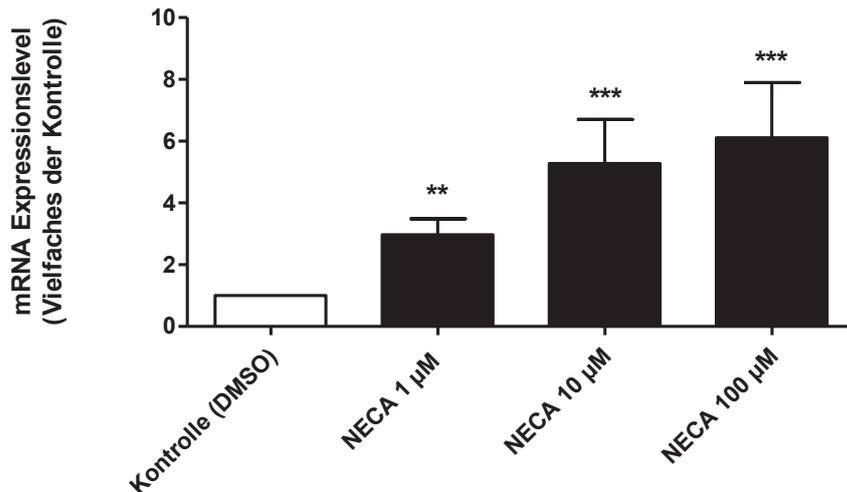
3.3 Einfluss von NECA und CADO auf die mRNA-Expression der verschiedenen Hyaluronsäuresynthaseisoformen (HAS-1-3)

3.3.1 HAS-1

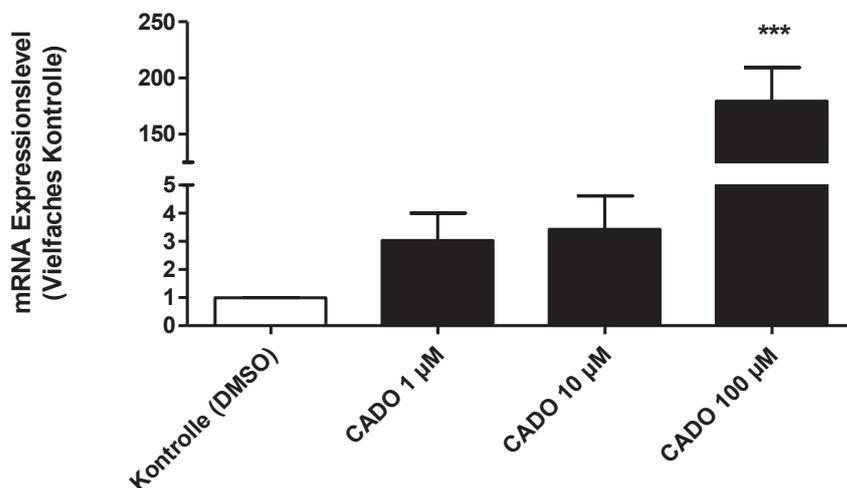
Durch die Inkubation mit NECA wurde die Expression der mRNA der HAS-1 im Vergleich zu der mit DMSO inkubierten Lösungsmittelkontrolle nach 24 Stunden konzentrationsabhängig und signifikant gesteigert. Schon die Inkubation mit 1 μM NECA führte zu einer signifikanten Induktion der HAS-1 ($2,968 \pm 0,5209$ versus Kontrolle). 10 μM steigerten die Expression weiter ($5,280 \pm 1,420$ versus Kontrolle) und die höchste Expression der HAS-1 mRNA Expression wurde mit einer NECA Konzentration von 100 μM erreicht ($6,109 \pm 1,787$ versus Kontrolle).

CADO führte nach 24 Stunden ebenso zu einer Induktion der HAS-1, diese fiel bei Konzentrationen von 1 μM etwas stärker und bei 10 μM etwas geringer aus als bei NECA ($3,035 \pm 0,9704$ bzw. $3,432 \pm 1,181$ versus Kontrolle). Zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der HAS-1 mRNA Expression auf $179,3 \pm 30,08$ versus Kontrolle kam es nach Inkubation mit 100 μM CADO.

Ergebnisse



A



B

Abbildung 3-4: A+B: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle

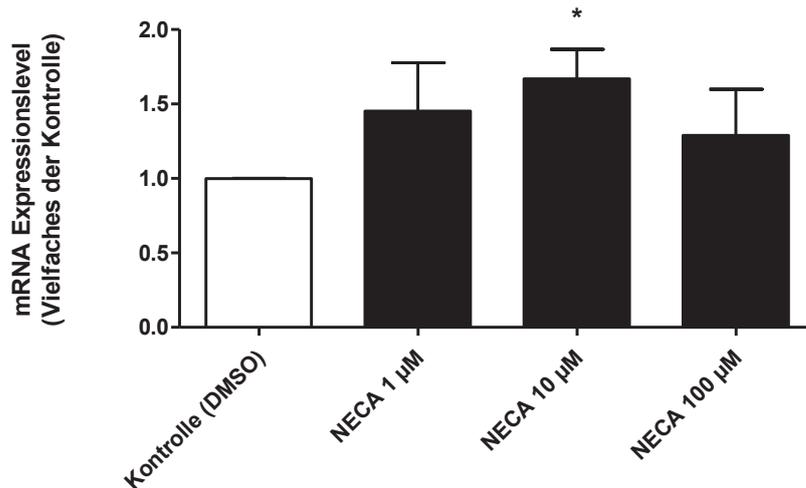
A: Stimulation mit NECA (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=5-8)

B: Stimulation mit CADO (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=3-5)

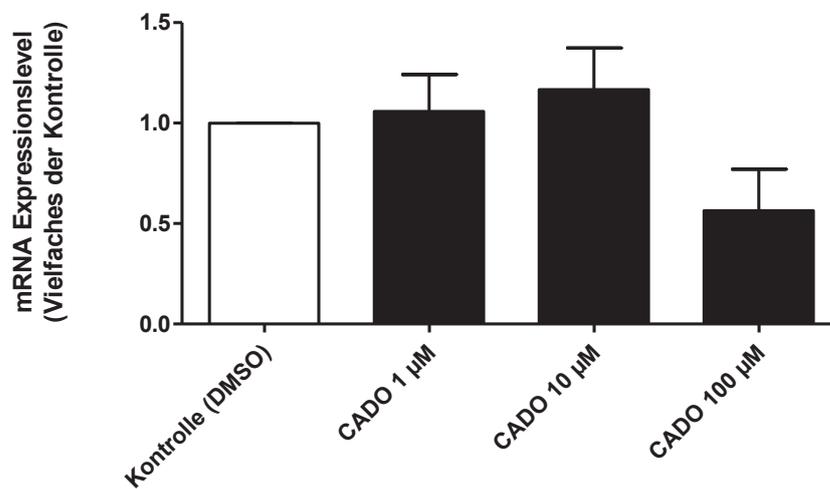
3.3.2 HAS-2

Sowohl NECA als auch CADO veränderten die mRNA Expression der HAS-2 im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig. Ausschließlich NECA in einer Konzentration von 10 µM führte zu einem signifikanten Anstieg der HAS-2 Expression ($1,670 \pm 0,1985$ versus Kontrolle).

Ergebnisse



A



B

Abbildung 3-5: A+B: Veränderung der HAS-2 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

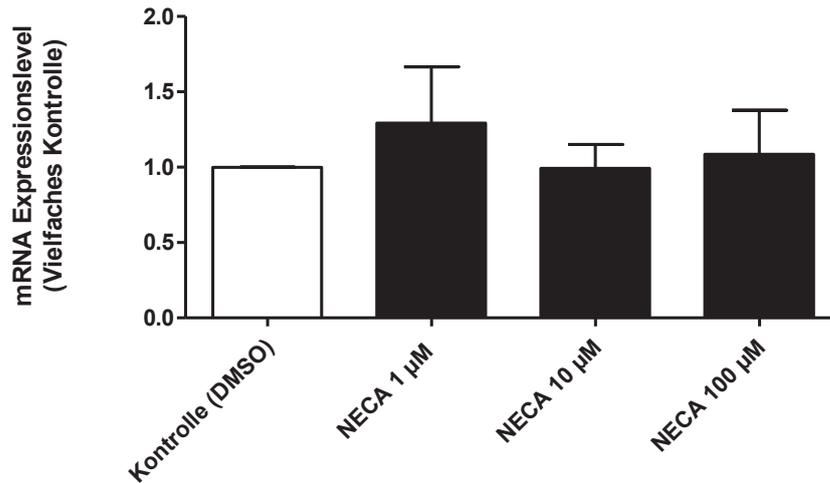
A: Stimulation mit NECA (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=4-5)

B: Stimulation mit CADO (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=4-6)

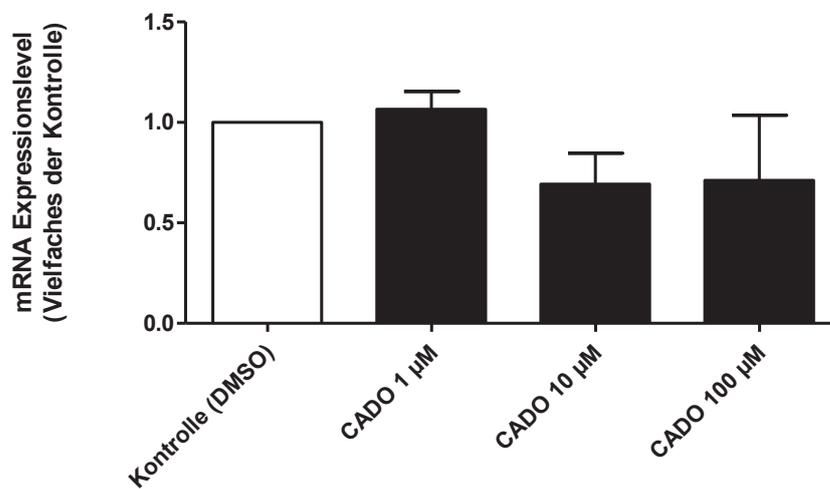
3.3.3 HAS-3v1

Die Expression der HAS-3v1 zeigte nach 24 Stunden Inkubation keine signifikante Änderung im Vergleich zu der mit DMSO inkubierten Kontrolle.

Ergebnisse



A



B

Abbildung 3-6: A+B: Veränderung der HAS-3v1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; Mittelwert \pm SEM

A: Stimulation mit NECA (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=4-6)

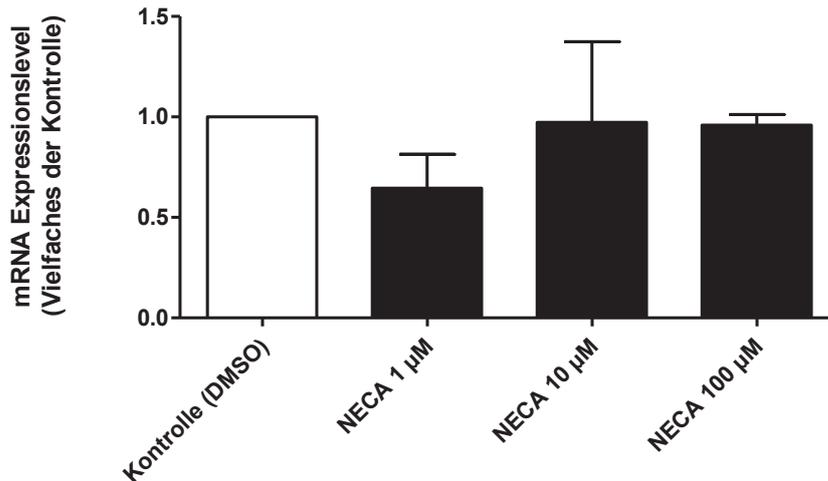
B: Stimulation mit CADO (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=4-6)

3.3.4 HAS-3v2

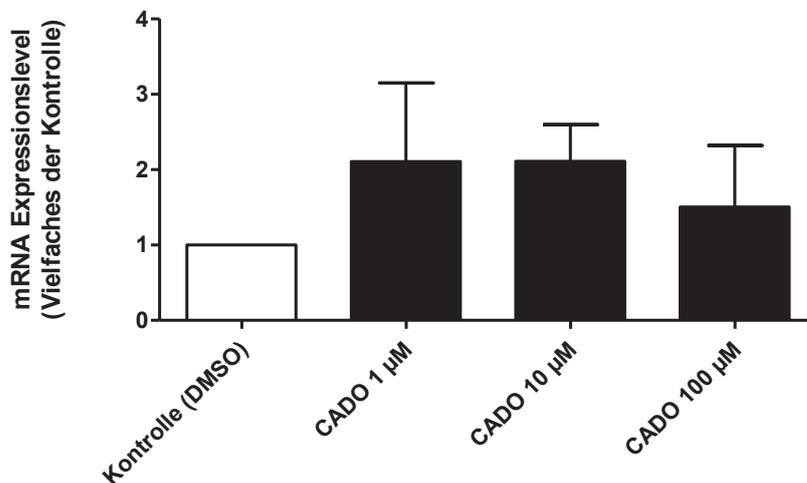
Inkubation der HCASMC mit NECA führte zu keiner signifikanten Änderung der HAS-3v2 mRNA Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

CADO führte zu einem geringen, jedoch nicht signifikanten Anstieg.

Ergebnisse



A



B

Abbildung 3-7: A+B: Veränderung der HAS-3v2 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; Mittelwert \pm SEM

A: Stimulation mit NECA (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=3)

B: Stimulation mit CADO (1 µM/ 10 µM/ 100 µM); (n=3-4)

3.4 Untersuchungen zu Apoptose und Zytoskelettschädigung unter NECA/CADO

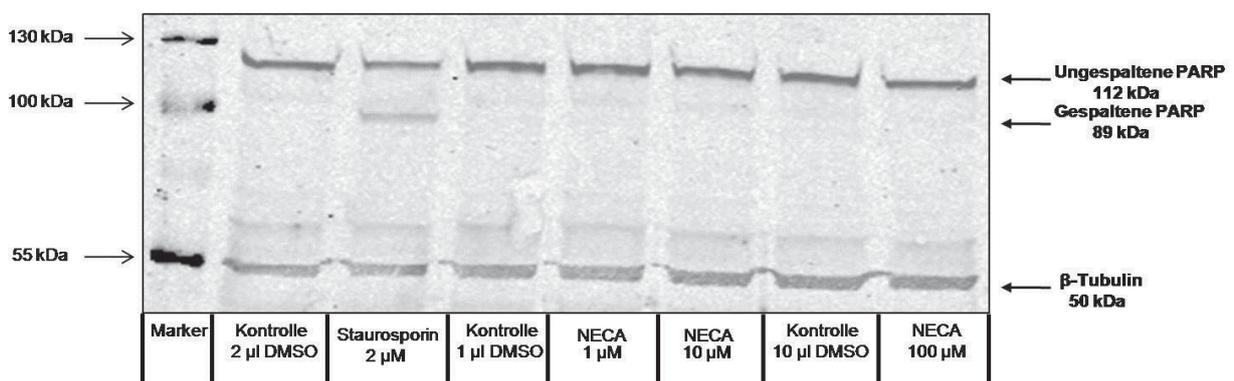
Es ist bekannt, dass Adenosin und vor allem auch CADO in bestimmten Zelllinien, insbesondere Krebszellen, sowie in hohen Konzentrationen auch in humanen arteriellen glatten Muskelzellen zum programmierten Zelltod, der sog. Apoptose, führt [28] [29]. Gleichzeitig führen Adenosin bzw. CADO in einigen Zelllinien, z.B.

Ergebnisse

der myoblastischen Zelllinie C2C12, in hohen Konzentrationen zur Desintegration des Zytoskeletts [29]. Um zu untersuchen, ob dies auch unter Stimulation mit NECA bzw. CADO in den hier eingesetzten Konzentrationen (1 μM / 10 μM / 100 μM) in HCASMC der Fall ist, wurde zunächst ein PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) Western und anschließend eine affinitätshistochemische Färbung des Zytoskeletts der HCASMC durchgeführt.

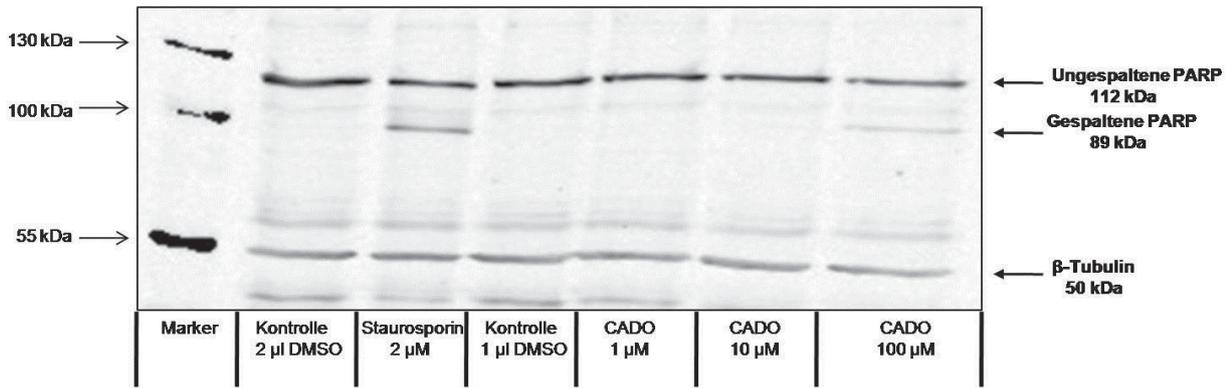
3.4.1 PARP-Western

PARP ist ein Reparaturenzym, welches spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie unter anderem durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen. Ungespaltenes PARP mit einem Molekulargewicht von 112 kD wird durch ICE-Proteasen (Interleukin Converting Enzym) wie Caspase-3/CCP32 in zwei Bruchstücke von 89 und 23 kD gespalten. Diese Spaltung ist Apoptose spezifisch und mit Hilfe von Antikörpern gegen PARP lässt sich im Western-Blot die Zunahme der Spaltprodukte im Vergleich zur ungespaltenen PARP und somit die Zunahme der Apoptose in Zellproben nachweisen. Als Positivkontrolle diente Staurosporin, ein Apoptose-induzierendes Alkaloid, das vom Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gebildet wird. Als Ladungskontrolle diente β -Tubulin.

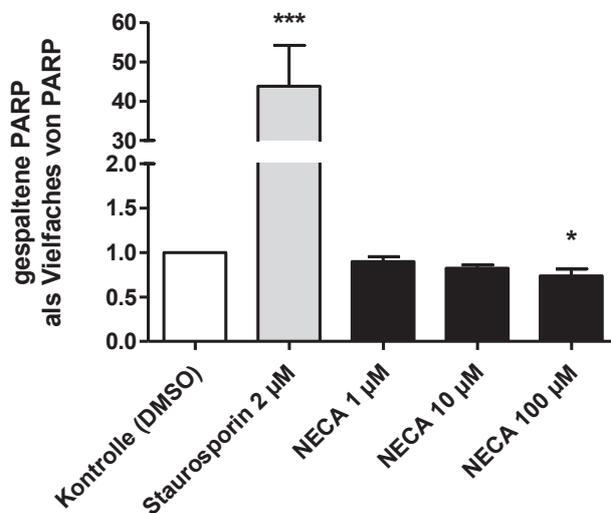


A

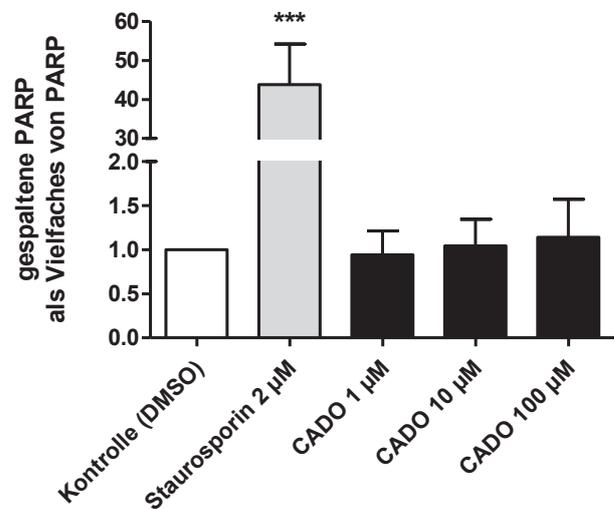
Ergebnisse



B



C



D

Abbildung 3-8:

A+B: PARP und β -Tubulin Nachweis auf Western Blots nach 24-stündiger Stimulation mit Staurosporin, NECA und CADO im Vergleich zu den lösungsmittelbehandelten Kontrollen ($n=3$).

A: Stimulation mit Staurosporin (2 μ M) und NECA (1 μ M/ 10 μ M/ 100 μ M)

B: Stimulation mit Staurosporin (2 μ M) und CADO (1 μ M/ 10 μ M/ 100 μ M)

C+D: Gespaltene PARP als Vielfaches von PARP nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle und im Vergleich zur

Positivkontrolle mit Staurosporin in einer Konzentration von 2 μ M;

Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle

C: Stimulation mit NECA (1 μ M/ 10 μ M/ 100 μ M); ($n=3$)

D: Stimulation mit CADO (1 μ M/ 10 μ M/ 100 μ M); ($n=3$)

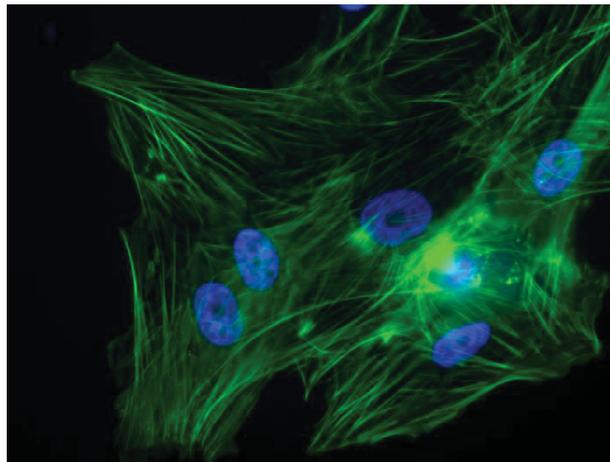
Wie erwartet, führte die Behandlung mit Staurosporin in den HCASMC zu einem hochsignifikanten Anstieg der Menge an gespalteener PARP auf $43,79 \pm 10,39$ versus Kontrolle. Der Einfluss von NECA und CADO war konzentrationsabhängig,

Ergebnisse

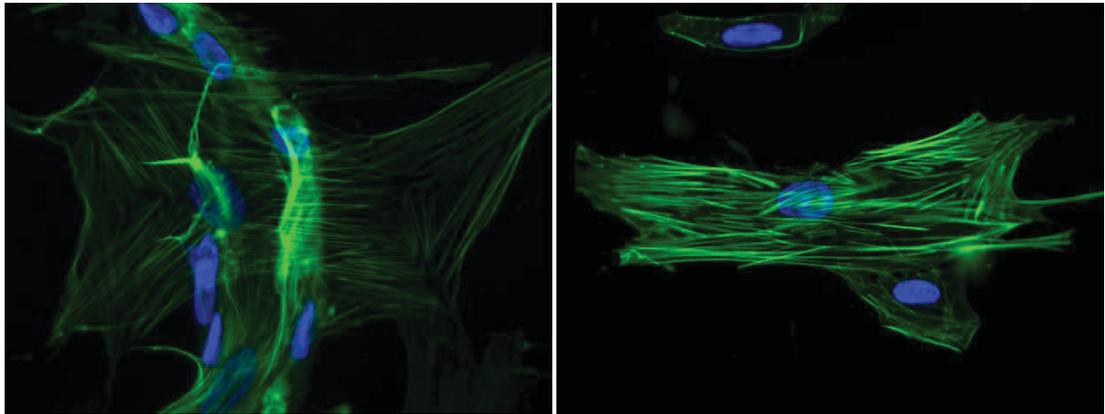
jedoch weitaus geringer. NECA führte hier zu einer geringen Abnahme des Anteils gespaltener PARP an der insgesamt vorhandenen PARP, welche bei einer Konzentration von 100 μM NECA $0,7377 \pm 0,07785$ versus Kontrolle betrug und somit signifikant war. CADO führte konzentrationsabhängig zu einem geringen Anstieg des Anteils der gespaltenen PARP an der Gesamt-PARP, welcher bei einer Konzentration von 100 μM CADO $1,142 \pm 0,4316$ versus Kontrolle betrug.

3.4.2 Darstellung des Zytoskeletts mit Phalloidin und affinitätshistochemischer Färbung

Phalloidin bindet nach Permeabilisierung der Zellmembran spezifisch an F-Aktin innerhalb der Zelle. F-Aktin besteht aus Bündeln polymerisierten G-Aktins, welche vor allem der Migration und Motilität der Zellen und dem Transport von Vesikeln, beispielsweise aus dem endoplasmatischen Retikulum zur äußeren Zellmembran dienen.



A



B

C

Abbildung 4-9: Stimulation mit NECA und CADO; Darstellung des F-Aktinskeletts mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Phalloidin; Darstellung der Kerne mit Hoechst 33342; 400x Vergrößerung

A: Darstellung des F-Aktinskeletts in der nicht stimulierten Kontrolle

B: Darstellung des F-Aktinskeletts nach 24-stündiger Stimulation mit 10 μM NECA

C: Darstellung des F-Aktinskeletts nach 24-stündiger Stimulation mit 10 μM CADO

Sowohl in der Kontrollfärbung der unstimulierten Zellen als auch in der Färbung der 24 Stunden mit 10 μM NECA inkubierten Zellen waren die F-Aktinbündel größtenteils geordnet und teilweise auch parallel angeordnet. In der Färbung der 24 Stunden mit 10 μM CADO inkubierten Zellen schienen die F-Aktinbündel im Inneren der Zelle dicker geworden zu sein. Die Zellen sahen zusammengezogen aus. In einigen Zellen war kein F-Aktinskelett mehr zu erkennen, stattdessen war das vorhandene F-Aktin am Rand der Zytoplasmamembran lokalisiert.

Ergebnisse

Aufgrund der leicht erhöhten Apoptoserate und der Beeinflussung des F-Aktinskeletts durch CADO wurden die folgenden Versuche ausschließlich mit NECA als unspezifischem AdoRA Agonisten durchgeführt.

3.5 Einfluss der verschiedenen Adenosinrezeptorsubtypen auf die Regulation der mRNA Expression der HAS-1

Da der Adenosinrezeptoragonist NECA bzw. das Adenosinanalgon CADO zu einer signifikanten Änderung der mRNA Expression der HAS-1 führte, stellte sich die Frage, ob diese Änderung unspezifisch über die Adenosinrezeptoren ausgelöst wird oder ob sie einem einzelnen der vier exprimierten AdoRA-Subtypen zuzuordnen ist.

3.5.1 Stimulation der AdoRA-Subtypen mit spezifischen Agonisten

Die Stimulation der einzelnen Adenosinrezeptoren erfolgte nach Protokoll für den AdoRA₁ mit dem spezifischen Agonisten CCPA (2-Chloro-N-cyclopentyladenosine), für den AdoRA₂(A) mit dem selektiven Agonisten CGS 21680 (4-[2-[[6-Amino-9-[N-ethyl-β-D-ribofuranuronamidoyl]-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic acid hydrochlorid) und für den AdoRA₃ mit dem selektiven Agonisten IB-MECA (1-Deoxy-1-[6-[[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide).

Wirkung des AdoRA₁ Agonisten CCPA auf die Expression der HAS-1 mRNA

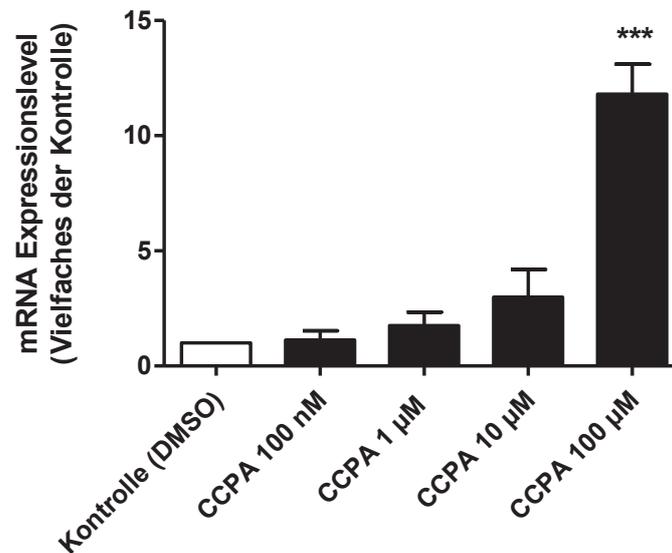


Abbildung 4-10: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation mit CCPA (100 nM/ 1 µM/ 10 µM/ 100 µM) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; (n=3-4); Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle

Inkubation der Zellen mit dem selektiven A₁-Rezeptoragonisten CCPA führte erst in hohen Konzentrationen von 100 µM zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Steigerung des mRNA -Expressionslevels der HAS-1 ($11,80 \pm 1,302$ versus Kontrolle). Die Steigerung des mRNA-Expressionslevels fiel bei CCPA in Konzentrationen von 1 bzw. 10 µM geringer aus als unter vergleichbaren NECA Konzentrationen ($1,762 \pm 0,5846$ versus Kontrolle bzw. $2,999 \pm 1,193$ versus Kontrolle).

Wirkung des AdoRA₂(A) Agonisten CGS 21680 auf die Expression der HAS-1 mRNA

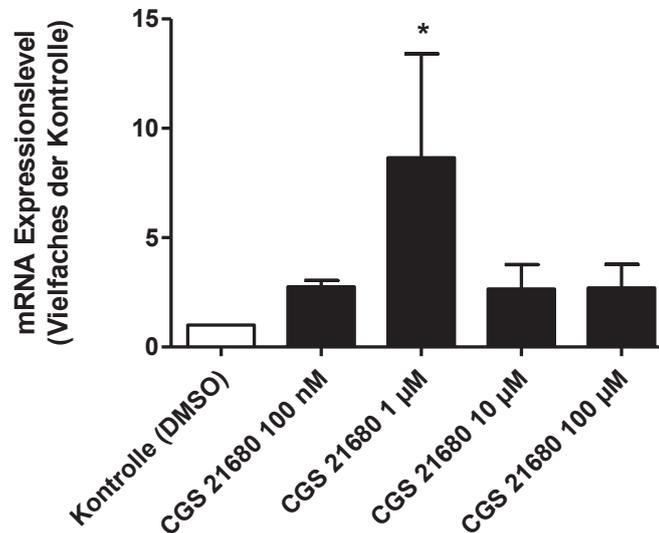


Abbildung 4-11: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation mit CGS 21680 (100 nM/ 1 µM/ 10 µM/ 100 µM) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; (n=3-4); Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

Die 24-stündige Stimulation der HCASMC mit dem selektiven AdoRA₂(A) - Agonisten CGS 21680 führte zu einer Induktion der Expression der HAS-1 mRNA, wobei diese bei einer Konzentration von 1 µM signifikant war ($8,660 \pm 4,746$ versus Kontrolle). Auch Konzentrationen von 100 nM bzw. 10 µM führten zu einer Steigerung der HAS-1 mRNA Expression ($2,761 \pm 0,2841$ versus Kontrolle bzw. $2,660 \pm 1,109$ versus Kontrolle), welche deutlicher als bei dem selektiven AdoRA₁- Agonisten CCPA ausfiel.

Wirkung des AdoRA₃ Agonisten IB-MECA auf die Expression der HAS-1 mRNA

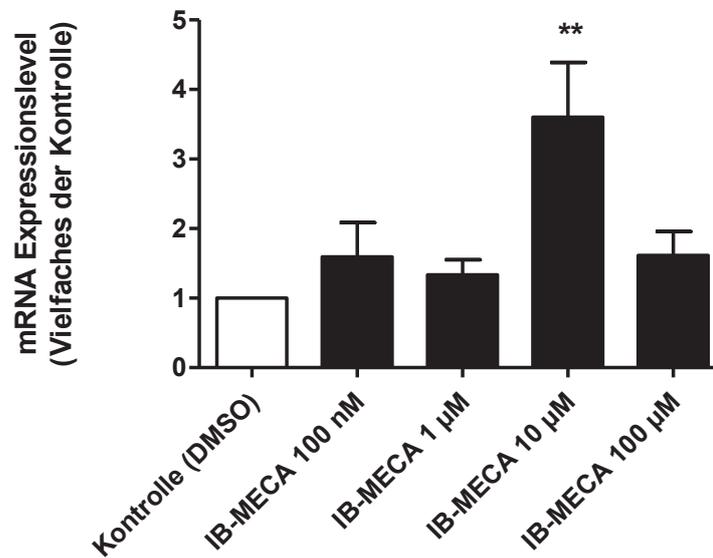


Abbildung 4-12: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation mit IB-MECA (100 nM/ 1 µM/ 10 µM/ 100 µM) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; (n=3-4); Mittelwert ± SEM; **: p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle

Stimulation mit dem selektiven AdoRA₃ Agonisten IB-MECA führte bei einer Konzentration von 10 µM zu einer signifikanten Steigerung des HAS-1 mRNA-Expressionslevels auf $3,604 \pm 0,7875$ versus Kontrolle. Die Induktion bei Konzentrationen von 100 nM, 1 µM und 100 µM blieb hinter der durch NECA induzierten Hochregulation zurück und stellte sich als nicht signifikant dar.

Die Ergebnisse der Stimulation mit den spezifischen Agonisten der AdoRA-Subtypen deuten auf eine Schlüsselrolle des AdoRA₂(A) und des AdoRA₃ in der Regulation der HAS-1 mRNA Expressionsveränderung durch Adenosin hin.

3.5.2 Inhibition der HAS-1 mRNA Expressionssteigerung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Agonistenversuche, wurden AdoRA-subtypspezifische Antagonisten eingesetzt um die durch NECA-Stimulation bewirkte Hochregulation der HAS-1 mRNA Expression zu inhibieren.

Inhibition der HAS-1 mRNA Expressionssteigerung durch Antagonisierung mit vier AdoRA-subtypspezifischen Antagonisten

In einem ersten Versuch wurden die HCASMC hierfür mit den vier Substanzen DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin; selektiver AdoRA₁ Antagonist), SCH 58261 (2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amin; selektiver AdoRA₂(A) Antagonist), MRS 1706 (N-(4-Acetylphenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]acetamid; inverser AdoRA₂(B) Agonist) und MRS 1334 (1,4-Dihydro-2-methyl-6-phenyl-4-(phenylethyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid 3-ethyl-5-[(3-nitrophenyl)methyl]ester; selektiver AdoRA₃ Antagonist) in einer Konzentration von jeweils 10 µM vorinkubiert. Nach einer halben Stunde wurde NECA in einer Konzentration von 1 µM zugesetzt und die Expression der HAS-1 mRNA wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR nach 24 Stunden bestimmt.

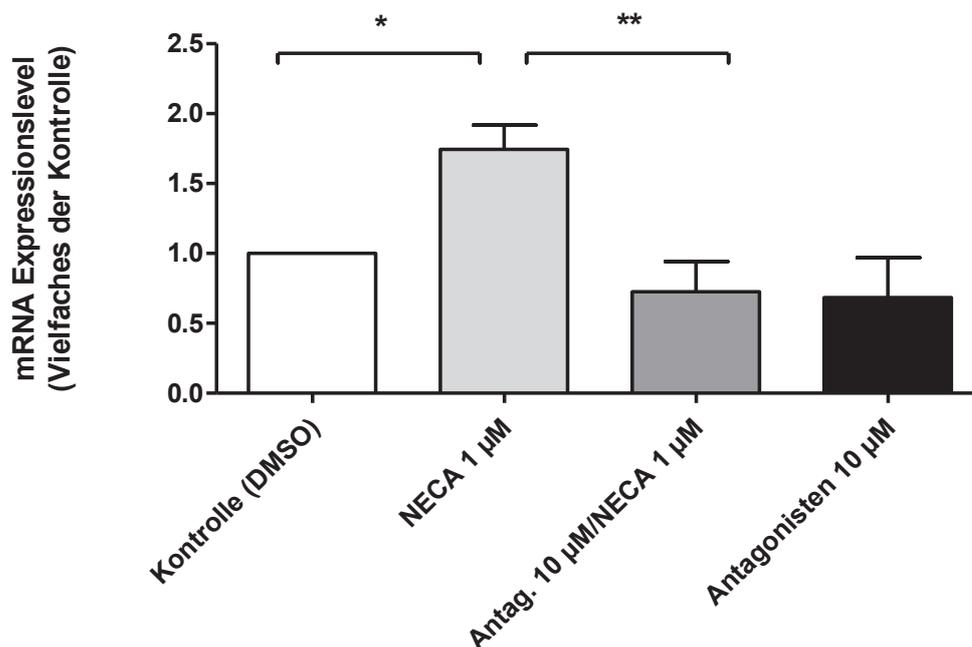


Abbildung 4-13: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation mit NECA (1 µM), nach 30-minütiger Vorinkubation mit DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 (jeweils 10 µM) und anschließender Stimulation mit NECA (1 µM) und nach 24-stündiger Stimulation mit DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 (jeweils 10 µM) ohne anschließende Stimulation mit NECA, im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle; (n=3); Mittelwert ± SEM; *: p<0,05; **: p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle

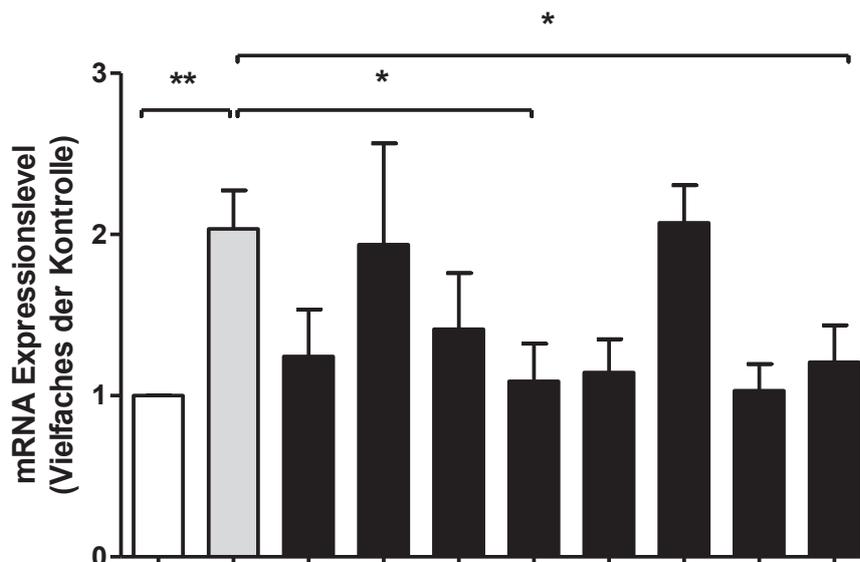
Ergebnisse

Die durch NECA verursachte Hochregulation der HAS-1 mRNA Expression von $1,746 \pm 0,1726$ versus Kontrolle konnte durch die gemeinsame Vorinkubation mit DPCPX, SCH 58261, MRS 1706 und MRS 1334 in einer Konzentration von jeweils $10 \mu\text{M}$ auf $0,7258 \pm 0,2175$ versus Kontrolle gesenkt werden. Alleinige Inkubation mit den vier AdoRA-subtypspezifischen Antagonisten zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das HAS-1 Expressionslevel.

Bestimmung des für die NECA Antagonisierung verantwortlichen AdoRA-Subtypen

Zur Beantwortung der Frage, ob die Inhibition eines bestimmten der vier AdoRA-Subtypen für die Inhibition der NECA-induzierten Hochregulation der HAS-1 mRNA Expression verantwortlich zu zeichnen ist, wurde in den folgenden Versuchen statt des inversen Agonisten des AdoRA₂(B), MRS 1706, der selektive AdoRA₂(B) Antagonist PSB 603 verwendet. Dies diente der erneuten Kontrolle der vorherigen Versuchsergebnisse und dem Ausschluss eventueller durch einen inversen Agonisten verursachten Wirkungen am Rezeptor. Des Weiteren wurde die Konzentration der eingesetzten Antagonisten von $10 \mu\text{M}$ auf 100 nM reduziert, um verfälschte Ergebnisse durch unphysiologisch hohe Konzentrationen zu vermeiden.

Ergebnisse



NECA 1 µM	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
DPCPX 100 nM	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
SCH 58261 100 nM	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PSB 603 100 nM	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
MRS 1334 100 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Abbildung 4-14: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Stimulation, im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle.

+: Zugabe des Stimulans in angegebener Konzentration,
-: keine Zugabe des Stimulans.

30-minütige Vorinkubation mit den selektiven Antagonisten DPCPX, SCH 58261, PSB 603, MRS 1334 in den Versuchen, in denen zusätzlich NECA benutzt wurde.

(n=4-8; NECA 1 µM: n=11); Mittelwert ± SEM; *: p<0,05; **: p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Die alleinige Inkubation mit den selektiven AdoRA Antagonisten führte zu keiner signifikanten Änderung der HAS-1 mRNA Expression nach 24-stündiger Inkubation. Der selektive AdoRA₁ Antagonist DPCPX führte zu einer leichten Hochregulation auf $1,244 \pm 0,2912$ versus Kontrolle. SCH 58261 als selektiver AdoRA₂(A) Antagonist war in der Lage, die mRNA Expression der HAS-1 auf $1,412 \pm 0,3488$ zu erhöhen. PSB 603 mit selektiver antagonistischer Wirkung auf den AdoRA₂(B) führte zu einer leichten Erhöhung der Expression auf $1,144 \pm 0,2073$ und MRS 1334 als Antagonist des AdoRA₃ übte keinen nennenswerten Einfluss auf die mRNA Expression der HAS-1 aus.

Ergebnisse

Stimulation mit 1 μ M NECA über 24 Stunden führte, wie auch in **Abbildung 4-4 A** schon gezeigt wurde, zu einer signifikanten Hochregulation der HAS-1 auf $2,034 \pm 0,2399$.

Die Vorinkubation mit den selektiven Antagonisten der einzelnen Adenosinrezeptoren in Konzentrationen von jeweils 100 nM führte nach Zugabe von NECA und anschließender 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei dem selektiven AdoRA₂(A) Antagonisten SCH 58261 zu einer signifikanten Verhinderung des durch NECA ausgelösten Effektes. So war dieser in der Lage die mRNA Expression der HAS-1 trotz Zugabe des unspezifischen Agonisten NECA fast auf Kontrollniveau bei $1,090 \pm 0,2335$ versus Kontrolle zu halten. Dies entspricht einem p von $< 0,05$.

Auch MRS 1334, als selektiver AdoRA₃ Antagonist führte zu einer Einschränkung des Anstiegs des HAS-1 mRNA Expressionslevels nach NECA Zugabe von $1,208 \pm 0,2290$ versus Kontrolle. Dies entspricht einem p von $< 0,05$.

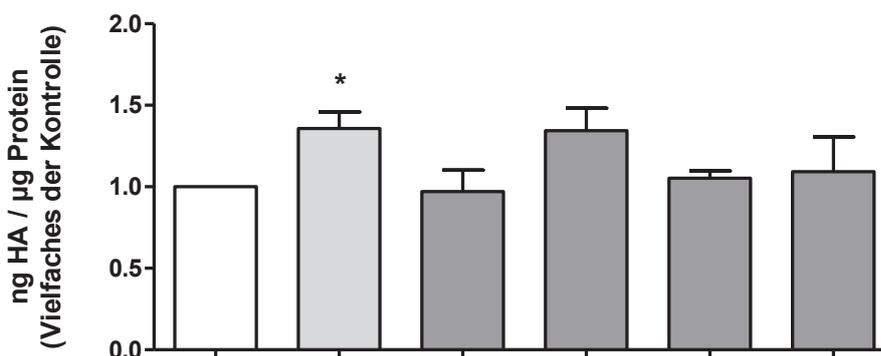
Die mRNA Expression der HAS-1 unter DPCPX (AdoRA₁ Antagonist) und PSB 603 (AdoRA₂(B) Antagonist)–Vorinkubation stieg nach NECA Zugabe und 24-stündiger Stimulation auf ähnlich hohe Werte wie unter NECA Stimulation alleine ($1,938 \pm 0,6266$ bzw. $2,073 \pm 0,2314$ versus Kontrolle).

3.6 Antagonisierung der durch NECA Stimulation gesteigerten HA-Produktion

NECA führt in HCASMC wie in **Abbildung 4-1** gezeigt zu einer gesteigerten Sezernierung von HA ins Medium. Gleichzeitig wird die mRNA Expression der HAS-1 deutlich erhöht. Es stellt sich die Frage, ob die vermehrte HA Produktion der Zellen der HAS-1 zuzuschreiben ist oder ob diese über eine andere Hyaluronsäuresynthase reguliert wird. Zur Klärung dieser Frage wurden die nach Protokoll kultivierten Zellen mit den Antagonisten aus 3.5.2 vorinkubiert und nach einer halben Stunde mit NECA stimuliert.

Wäre die Erhöhung der HA Produktion der HAS-1 zuzuschreiben, müsste wie in 3.5.2.2 vor allem der AdoRA₂(A) Antagonist SCH 28561 in der Lage sein, den durch NECA verursachten Effekt auf die Hyaluronsäureproduktion der HCASMC zu verhindern.

Ergebnisse



NECA 1 µM	-	+	+	+	+	+
DPCPX 100 nM	-	-	+	-	-	-
SCH 58261 100 nM	-	-	-	+	-	-
PSB 603 100 nM	-	-	-	-	+	-
MRS 1334 100 nM	-	-	-	-	-	+

Abbildung 4-15: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach 24-stündiger Stimulation, im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle.

+: Zugabe des Stimulans in angegebener Konzentration,

-: keine Zugabe des Stimulans.

30-minütige Vorinkubation mit den selektiven Antagonisten DPCPX, SCH 58261, PSB 603, MRS 1334 in den Versuchen, in denen zusätzlich NECA benutzt wurde.

(n=3; NECA 1 µM: n=11); Mittelwert ± SEM; *: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Die durch 1 µM NECA hervorgerufene signifikante Steigerung der Hyaluronsäurekonzentration im Medium auf $1,358 \pm 0,1007$ versus Kontrolle wurde durch Vorinkubation mit 100 nM SCH 58261, dem spezifischen AdoRA₂(A) Antagonisten, nicht beeinflusst. Die Hyaluronsäuremenge im Medium lag hier weiterhin bei $1,344 \pm 0,1378$ versus Kontrolle. Alle anderen drei AdoRA-subtypspezifischen Antagonisten senkten die Hyaluronsäureproduktion der HCASMC. Der AdoRA₁-subtypspezifische Antagonist DPCPX senkte die HA Menge im Medium auf $0,9713 \pm 0,1307$ versus Kontrolle, PBS 603 als spezifischer AdoRA₂(B) Antagonist senkte sie auf $1,052 \pm 0,04555$ versus Kontrolle und der spezifische AdoRA₃ Antagonist MRS 1334 führte zu einer Reduktion der durch NECA gesteigerten HA Produktion auf $1,092 \pm 0,2147$ versus Kontrolle.

4 Diskussion

Hyaluronsäure als ubiquitär vorkommender Teil der extrazellulären Matrix spielt eine wichtige und komplex regulierte Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Hierbei ist sie nicht nur struktureller Bestandteil der EZM, sondern reguliert über die Interaktion mit dem RHAMM und CD44 Rezeptor auf der Zelloberfläche eine Vielzahl verschiedener Signalwege, welche unter anderem Zellmigration und –proliferation steuern.

Schon 1969 konnte durch Saxena und Nagchaudhuri gezeigt werden, dass die Menge an Hyaluronsäure in experimentell erzeugten atherosklerotischen Gefäßläsionen erhöht ist [30] und Hyaluronsäure somit auch Bedeutung für die kardiovaskuläre Forschung hat.

Erst in den letzten Jahren wurde allerdings bekannt, dass Hyaluronsäure in atherosklerotischen Plaques nicht nur einen statischen Teil der Matrix darstellt, sondern eng in die Modulation der Plaquekomposition eingebunden ist. Ein Knock-out des CD44 Rezeptors im Mausmodell führt über verschiedene Mechanismen zu verminderter Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen [31].

Unbestritten ist auch die wichtige Rolle des Adenosins im kardiovaskulären System. Eine direkte Funktion erfüllt Adenosin hier zum Beispiel bei der Regulation des Blutflusses in Gefäßen.

Die vier verschiedenen Adenosinrezeptoren erlauben eine differenzierte Steuerung der Adenosinwirkung. Auch eine wechselseitige Beeinflussung zwischen Hyaluronsäure und Adenosin konnte aufgezeigt werden: So moduliert Adenosin die Reaktion inflammatorischer Gene auf niedermolekulare HA-Fragmente [27]. Eine direkte Verbindung zwischen einem Adenosinrezeptor und Atherosklerose konnte hergestellt werden, als Forschungen ergaben, dass ein Knock-out des AdoRA₂(A) im murinen ApoE^{-/-} Modell vor Atherosklerose schützt [32].

4.1 Effekte von NECA und CADO auf die HA Produktion der HCASMC

Sowohl NECA als auch CADO haben Auswirkungen auf die HA Produktion der HCASMC.

4.1.1 Effekt von NECA und CADO auf die Sezernierung der HA ins Medium

Wie zu Beginn dieser Arbeit (siehe **Abbildung 4-2/3**) über die Bestimmung der HA-Konzentration im Medium gezeigt werden konnte, erhöht die Stimulation der humanen vaskulären glatten Muskelzellen mit NECA bzw. CADO die Sezernierung von HA in die das die Zellen umgebende Medium.

Mit einer erhöhten Produktion und Abgabe von HA in die direkte Zellumgebung reagieren verschiedene Zelltypen auf bestimmte Reize wie beispielsweise Hyperglykämie und erhöhte Konzentration lokaler Prostaglandine, wie sie bei der Bildung der atherosklerotischen Plaques zu finden sind [33] [34].

Ein erhöhter HA Gehalt der EZM führt außerdem zu verstärkter Motilität und Zellproliferation und trägt somit zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen bei [35, 36].

4.1.2 Effekt von NECA und CADO auf den perizellulären HA-Mantel und die Ausbildung von HA Kabeln

In den affinitätshistochemischen Färbungen der perizellulären HA-Matrix (siehe **Abbildung 4-2 B/C, 4-3 B/C**) erkennt man eine Verdichtung des HA-Mantels und die Ausbildung sogenannter HA Kabel.

Dieser HA-Mantel und die HA Kabel vaskulärer glatter Muskelzellen dienen unter anderem der Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie Leukozyten und Monozyten [37] [36]. So wird es über das Zusammenspiel zwischen HA und dem CD44 Rezeptor Leukozyten ermöglicht, aus den Gefäßen in die Gefäßwand abzuwandern [38]. Auch die durch NECA Stimulation bewirkte Verdichtung des perizellulären HA-Mantels führt zu verstärkter Bindung von Monozyten [36] und scheint somit eine Rolle im inflammatorischen Geschehen zu spielen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Versican als weiterer Bestandteil der perizellulären Matrix eine Leukozytenwanderung verhindert [39] . Somit wäre eine genauere Analyse der Zusammensetzung der durch NECA Stimulation veränderten perizellulären Matrix von Interesse.

4.2 Phänotypische Effekte von NECA und CADO auf das Zytoskelett der HCASMC

Die affinitätshistochemische Färbung der HCASMC nach Stimulation mit 10 μ M NECA zeigt in der Ausbildung des F-Aktin Zytoskeletts keinen Unterschied zur Kontrolle. Die Stimulation mit CADO führt hingegen zu einer deutlichen Veränderung im Sinne einer deutlichen Abnahme des F-Aktin Zytoskeletts und der Formation dickerer, weniger geordnet erscheinender F-Aktin Bündel. In einigen Zellen scheint es zur Desintegration des F-Aktin Zytoskeletts zu kommen (siehe **Abbildung 4-3 C**). Eine Neuordnung des F-Aktin Zytoskeletts zeigt sich in vaskulären glatten Muskelzellen zu Beginn der Migration [40] [41]. In Migrationsversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit NECA über 24 Stunden migrationsfördernd auf HCASMC wirkt [36]. Es stellt sich hier die Frage, ob zu Beginn der Stimulation mit NECA ein deutlicherer Effekt auf das F-Aktin Zytoskelett zu beobachten ist.

4.3 Effekte von NECA und CADO auf die Apoptoserate der HCASMC

Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, hat Adenosin bzw. CADO in bestimmten Zelllinien einen pro-apoptotischen Effekt. Um auszuschließen, dass Ergebnisse der Versuche auf eine erhöhte Apoptoserate der HCASMs zurückzuführen sind, wurden PARP-Western mit NECA und CADO durchgeführt.

Wie aus **Abbildung 4-8** ersichtlich, haben NECA und CADO unterschiedliche Wirkungen auf die Apoptoserate der HCASMC. NECA scheint einen, wenn auch gering ausgeprägten, protektiven Effekt auf die Zellen auszuüben, wohingegen CADO zu einer geringen Steigerung der Apoptoserate führt. Dieser Effekt ist relativ gering und vor allem bei unphysiologisch hohen Konzentrationen der Substanzen zu erkennen, aber es ist bekannt, dass schon leichte Erhöhungen der Apoptoserate vor allem in vorgeschädigten Gefäßabschnitten zu starker Plaquevulnerabilität und –instabilität beitragen und somit zu einer Progression der Atherosklerose führen [42] [42]. Die unterschiedliche Wirkung von NECA und CADO mag an der Rezeptorspezifität der beiden Substanzen liegen. So aktiviert NECA in erster Linie den AdoRA₁ bzw die AdoRA₂ wohingegen CADO auf alle AdoRAs ähnlich stark wirkt. Eine apoptosesteigernde Wirkung könnte somit dem

AdoRA₃ zuzuschreiben sein. Dies stimmt überein mit verschiedenen Studien, welche z.B. in kardialen Myozyten [43], myeloischen [44] und humanen mononukleären Zellen [45] eine erhöhte Apoptoserate durch Stimulation des AdoRA₃ zeigen konnten. Allerdings konnte auch ein durch den AdoRA₃ vermittelter Schutz gegen Apoptose [46] und Zellverletzung [47] aufgezeigt werden und auch ein gewisser kardioprotektiver Effekt scheint über ihn vermittelt zu werden [48]. Die in 3.4. beschriebenen Studien weisen auch auf einen in höheren Konzentrationen rezeptorunabhängigen apoptosesteigernden Effekt von CADO hin. Auch dieser Mechanismus lässt sich hier nicht ausschließen und weitere Experimente wären notwendig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Erneut wird hiermit aber die stark zellspezifische und konzentrationsabhängige Wirkung von Adenosin gezeigt und eine apoptosefördernde Wirkung über den AdoRA₃ in HCASMC ist denkbar. Ob dieser Effekt in Zusammenhang mit einer der Hyaluronsäuresynthasen steht, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, denkbar wäre eine Rolle der HAS-3v2, denn wie aus **Abbildung 4-7** ersichtlich, ist diese Hyaluronsäuresynthase die einzige, bei der der CADO Effekt auf die mRNA Expression den Effekt von NECA übersteigt. Weitere Versuche mit Adenosin selbst wären auch hier notwendig, um zu untersuchen, welche der beiden Substanzen, NECA oder CADO, in ihrem Effekt am ehesten Adenosin entspricht.

4.4 Effekte der Stimulation mit NECA und CADO auf die mRNA Expression der HAS-Isoenzyme

Eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression einer HASe konnte, wie aus den **Abbildungen 4-4/5/6/7** ersichtlich, unter Stimulation mit NECA bei allen drei eingesetzten Konzentrationen bei der HAS-1 erreicht werden. Bei Stimulation mit CADO fiel diese Expressionserhöhung nur bei einer Konzentration von 100 µM signifikant aus. Die mRNA Expression der HAS-2 konnte unter Stimulation mit 10 µM NECA signifikant gesteigert werden. Diese Expressionserhöhung fiel allerdings schwächer aus, als die der HAS-1 mRNA.

4.4.1 Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit NECA und CADO

Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass eine Überexpression von HASen in arteriellen glatten Muskelzellen über die vermehrte Produktion von EZM Proteinen zu verstärkter Bindung von Monozyten führt [49]. Diese Bindung ist bei Überexpression von HAS-1 deutlich stärker ausgeprägt als bei Überexpression der beiden anderen Isoformen [49]. Zusätzlich konnte in humanen Synoviazellen eine Hochregulation der HAS-1 als Reaktion auf pro-inflammatorische Stimuli wie TNF α und IL-8 gezeigt werden [50], und in weißen, männlichen, neuseeländischen Kaninchen wurde in venösen Bypässen mit erhöhter Intima Hyperplasie eine Hochregulation der HAS-1 und des CD44 Rezeptors aufgezeigt.

Dies zeigt, dass die HAS-1 Hochregulation eine Rolle in inflammatorischen Geschehen in der EZM und auch in der Regulation atherosklerotischer Plaques spielt [51].

Auch in HCASMC wird die HAS-1 als Reaktion auf die Stimulation vor allem mit NECA und CADO hochreguliert. Eine durch NECA erhöhte HAS-1 Expression führt zur Migration von HCASMC [36], welche in atherosklerotischen Plaques stabilisierend wirken.

4.5 Bedeutung der Adenosin Rezeptorsubtypen in der Regulation der HAS-1 mRNA Expression und der veränderten HA Produktion

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation konnte mit Hilfe spezifischer AdoRA Agonisten (siehe **Abbildungen 4-10/11/12**) und Antagonisten (siehe **Abbildung 4-14**) gezeigt werden, dass die NECA abhängige Steigerung der mRNA Expression der HAS-1 in HCASMC überwiegend über den AdoRA₂(A) und den AdoRA₃ reguliert wird.

Die verstärkte HA Sezernierung der HCASMC in das Medium nach Stimulation mit NECA konnte über eine Vorinkubation der Zellen mit AdoRA-Subtypspezifischen Antagonisten teilweise verhindert werden. Den stärksten, wenn auch nicht signifikanten Effekt zeigten hier Antagonisten des AdoRA₁ und AdoRA₂(B). Auch ein Effekt des AdoRA₃ ließ sich nicht ausschließen (siehe **Abbildung 4-15**).

Diskussion

Dies zeigt, dass die Hochregulation der HAS-1 mRNA Expression nicht alleine für die erhöhte Menge der ins Medium sezernierten HA verantwortlich ist. Denkbar wäre es, dass die Hochregulation der HAS-1 durch NECA/CADO über den AdoRA₂(A) zu einer vermehrten Kabel Bildung durch HA führt. Dies passt zu den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen [49], die zeigen konnten, dass eine vermehrte HA-Kabel Bildung vor allem bei Überexpression der HAS-1 zu verzeichnen ist.

Interessant wäre es zu untersuchen, inwieweit eine Hochregulation der HAS-1 in HCASMC zu veränderter Adhäsionsproteinexpression führt. Die gleichzeitig verstärkte Expression von HAS-1 und CD44 bei Intimahyperplasie (s.o.) und die vermehrte Adhäsion von Monozyten an HAS-1 überexprimierende Zellen (s.o.) deuten auf einen bestehenden Zusammenhang hin. In diesem Fall wäre der HAS-1 eine wichtige Funktion in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen zuzuschreiben, welche nicht direkt über eine vermehrte HA Sezernierung geregelt ist.

4.5.1 Spezielle Bedeutung des AdoRA₂(A) für und Einordnung in die Atheroskleroseentstehung

Dem AdoRA₂(A) werden gemeinhin antiinflammatorische Wirkungen nachgesagt [52, 53], allerdings konnte vor kurzem gezeigt werden, dass im murinen ApoE^{-/-} Modell eine zusätzliche Inaktivierung des AdoRA₂(A) trotz erhöhter Serumlevel pro-inflammatorischer Zytokine vor Atherosklerose schützt [32]. Die verminderte Größe der atherosklerotischen Läsionen wurde in der Studie vor allem auf die erhöhte Apoptoserate der Schaumzellen zurückgeführt.

Ein Schutz vor Apoptose in HCASMC konnte in der vorliegenden Arbeit für NECA gezeigt werden, wurde aber keinem AdoRA direkt zugeordnet. Gegen eine über den AdoRA₂(A) und HAS-1 vermittelte Wirkung auf die Apoptoserate in HCASMC spricht, dass NECA und CADO unterschiedliche Wirkung auf die Apoptoserate haben, beide aber die HAS-1 mRNA Expression hochregulieren (siehe **Abbildung 4-4**).

Dies zeigt deutlich, dass die Effekte von Adenosin pleiotrop sind, das heißt je nach Spezies, Gewebe und Konzentration werden unterschiedliche Wirkungen erzielt [21]. Über den AdoRA₂(A) in HCASMC gibt es bisher wenige

Diskussion

Forschungsergebnisse, auch in der Erforschung der Atherosklerose stehen, wie oben bereits erwähnt, meist Makrophagen und Schaumzellen und die von ihnen exprimierten AdoRAs im Mittelpunkt des Interesses.

Weitere Untersuchungen zur Apoptose in mit NECA/CADO stimulierten HCASMC und zu dem verantwortlichen Rezeptor wären hier notwendig. Gleichzeitig müsste hier auch wieder untersucht werden, welche der beiden Substanzen in ihrer Wirkung am ehesten Adenosin entspricht, um die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse pathophysiologisch einordnen zu können.

4.6 Zusammenfassung und Einordnung in die kardiovaskuläre Forschung

Die komplexen und eng regulierten Zusammenhänge zwischen der Ausbildung der Atherosklerose und dem durch modulierende Faktoren wie Zytokine veränderten Gefäßmilieu sind schon lange Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Dass HA eine Rolle im Rahmen der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielt ist unumstritten. Bisher ging man in erster Linie davon aus, dass HA hier für die Bildung und Progression der Atherosklerose bedeutsam sei, 2010 konnte allerdings auch gezeigt werden, dass zumindest im murinen Modell eine Inhibition der Hylauronsäuresynthese zur deutlichen Zunahme atherosklerotischer Läsionen beiträgt [54]. In den letzten Jahren trat vermehrt auch Adenosin als in entzündlichen Prozessen stark erhöhtem Autakoid in den Focus der kardiovaskulären Forschung.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass HCASMC alle vier Adenosinrezeptorsubtypen exprimieren.

Die Stimulation der HCASMC mit NECA und CADO führte zu einer vermehrten Sekretion von HA in das die Zellen umgebende Medium und zu einer Vermehrung des perizellulären HA Mantels, welcher unter anderem der Rekrutierung pro-inflammatorischer Zellen wie Leukozyten und Monozyten dient.

Gleichzeitig konnte eine deutliche Hochregulation der HAS-1 mRNA Expression gezeigt werden.

Das Zytoskelett der HCASMC zeigt nach Stimulation mit CADO eine Neuordnung der F-Aktin Bestandteile, unter Umständen im Sinne einer beginnenden Migration der Zelle.

Diskussion

Während CADO eine leicht apoptosefördernde Wirkung auf HCASMC ausübt, konnte gezeigt werden, dass NECA einen zwar gering ausgeprägten, aber protektiven Effekt zu haben scheint.

Die vermehrte HA Sezernierung ins Medium konnte dem AdoRA₁/A₂(B) und AdoRA₃ zugeordnet werden.

Die gesteigerte mRNA Expression der HAS-1, welche vor allem für die Ausbildung der HA Kabel verantwortlich ist, konnte dem AdoRA₂(A) und AdoRA₃ zugeordnet werden.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte unterschiedliche Regulation der HA Sekretion ins Medium und der Ausbildung perizellulärer HA Kabel legt nahe, dass diese verschiedenen Formen der durch HCASMC produzierten HA unterschiedliche funktionelle Bedeutung besitzen. Gleichzeitig macht dies deutlich, wie komplex und genau reguliert die Wirkung von Adenosin auf Zellebene abläuft. In Atherektomieproben konnten sowohl alle 4 Adenosinrezeptorsubtypen, als auch eine deutliche Zunahme des HA-Gehalts gezeigt werden [36]. Dies deutet darauf hin, dass der in dieser Dissertation aufgezeigte Zusammenhang zwischen Adenosin und der Veränderung des HA Gehalts der EZM auch im klinisch-pathophysiologischen Zusammenhang der Atherosklerose bedeutsam ist.

Zusammengefasst bietet die vorliegende Dissertation neue, tiefere Einsichten zur Wirkung von Adenosin auf HCASMC und die Regulation der Hyaluronsäureproduktion und kann damit einen Teil zum Verständnis der komplexen Pathophysiologie der Atherosklerose beitragen.

5 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 5-1 Verwendete Abkürzungen

AdoRA	Adenosinrezeptor
AMP/ADP/ATP	Adenosinmono/di/triphosphat
CADO	(6-Amino-2-chloropurin ribosid)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kodierende DNA
Cy3	Carboncyanin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HCASMC	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell
mRNA	messenger RNA
NECA	1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-N-ethyl- β -D-ribofuranuronamid
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A

Abkürzungsverzeichnis

PKC	Proteinkinase C
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Loppnow, H., K. Werdan, and M. Buerke, *Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms*. *Innate Immun*, 2008. **14**(2): p. 63-87.
2. Cullen, P., J. Rauterberg, and S. Lorkowski, *The pathogenesis of atherosclerosis*, in *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005. p. 3-70.
3. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. *Am J Pathol*, 1977. **86**(3): p. 675-84.
4. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
5. Bot, P.T., et al., *Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(8): p. 786-91.
6. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 528-39.
7. Vostrov, A.A. and W.W. Quitschke, *Plasma hyaluronan-binding protein is a serine protease*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 22978-85.
8. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan in tissue injury and repair*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 435-61.
9. Feinberg, R.N. and D.C. Beebe, *Hyaluronate in vasculogenesis*. *Science*, 1983. **220**(4602): p. 1177-9.
10. Rooney, P., et al., *The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review)*. *Int J Cancer*, 1995. **60**(5): p. 632-6.
11. Sattar, A., et al., *Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin*. *J Invest Dermatol*, 1994. **103**(4): p. 576-9.
12. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(10): p. 2403-13.
13. Day, A.J. and G.D. Prestwich, *Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4585-8.
14. Rilla, K., et al., *Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31890-7.

Literatur- und Quellenverzeichnis

15. Kultti, A., et al., *Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15821-8.
16. Evanko, S.P. and T.N. Wight, *Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells*. J Histochem Cytochem, 1999. **47**(10): p. 1331-42.
17. Frost, G.I., et al., *Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 10-5.
18. Afify, A.M., et al., *Purification and characterization of human serum hyaluronidase*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(2): p. 434-41.
19. Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin, *CD44 cell adhesion molecules*. Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 189-96.
20. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
21. Klinger, M., M. Freissmuth, and C. Nanoff, *Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins*. Cell Signal, 2002. **14**(2): p. 99-108.
22. Rudolphi, K.A., et al., *Adenosine and brain ischemia*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1992. **4**(4): p. 346-69.
23. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
24. Loffler, M., et al., *Physiological roles of vascular nucleoside transporters*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1004-13.
25. Li, R.W., et al., *Physiological and pharmacological roles of vascular nucleoside transporters*. J Cardiovasc Pharmacol, 2012. **59**(1): p. 10-5.
26. Fredholm, B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1315-23.
27. Scheibner, K.A., et al., *The adenosine a2a receptor inhibits matrix-induced inflammation in a novel fashion*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(3): p. 251-9.
28. Peyot, M.L., et al., *Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor*. Circ Res, 2000. **86**(1): p. 76-85.
29. Ceruti, S., et al., *Adenosine- and 2-chloro-adenosine-induced cytopathic effects on myoblastic cells and myotubes: involvement of different intracellular mechanisms*. Neuromuscul Disord, 2000. **10**(6): p. 436-46.

Literatur- und Quellenverzeichnis

30. Saxena, I.D. and J. Nagchaudhuri, *A study of the acid mucopolysaccharides of the rabbit aorta during cholesterol-induced atherosclerosis*. Indian J Med Res, 1969. **57**(1): p. 96-102.
31. Cuff, C.A., et al., *The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 1031-40.
32. Wang, H., et al., *Inactivation of the adenosine A2A receptor protects apolipoprotein E-deficient mice from atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(7): p. 1046-52.
33. Wang, A. and V.C. Hascall, *Hyaluronan structures synthesized by rat mesangial cells in response to hyperglycemia induce monocyte adhesion*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10279-85.
34. Sussmann, M., et al., *Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 592-600.
35. Chai, S., et al., *Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis*. Circ Res, 2005. **96**(5): p. 583-91.
36. Grandoch, M., et al., *Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis*. Basic Res Cardiol, 2013. **108**(2): p. 340.
37. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan-dependent pericellular matrix*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(13): p. 1351-65.
38. Majors, A.K., et al., *Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 47223-31.
39. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration*. Matrix Biol, 2012. **31**(2): p. 90-100.
40. Gerthoffer, W.T., *Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 607-21.
41. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1208-12.
42. Clarke, M. and M. Bennett, *Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis*. Cell Cycle, 2006. **5**(20): p. 2329-31.
43. Shneyvays, V., et al., *Induction of apoptosis in cardiac myocytes by an A3 adenosine receptor agonist*. Exp Cell Res, 1998. **243**(2): p. 383-97.

Literatur- und Quellenverzeichnis

44. Kohno, Y., et al., *Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **219**(3): p. 904-10.
45. Barbieri, D., et al., *Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells*. *Neurochem Int*, 1998. **32**(5-6): p. 493-504.
46. Gao, Z., et al., *A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(1): p. 76-82.
47. Shneyvays, V., et al., *Activation of A(3)adenosine receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(6): p. 1249-61.
48. Safran, N., et al., *Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes*. *Mol Cell Biochem*, 2001. **217**(1-2): p. 143-52.
49. Wilkinson, T.S., et al., *Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(2): p. 378-85.
50. Stuhlmeier, K.M. and C. Pollaschek, *Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8753-60.
51. Dattilo, J.B., et al., *Hypercholesterolemia alters the gene expression of novel components of the extracellular matrix in experimental vein grafts*. *Ann Vasc Surg*, 1998. **12**(2): p. 168-73.
52. Ohta, A. and M. Sitkovsky, *Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage*. *Nature*, 2001. **414**(6866): p. 916-20.
53. Lappas, C.M., G.W. Sullivan, and J. Linden, *Adenosine A2A agonists in development for the treatment of inflammation*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005. **14**(7): p. 797-806.
54. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. *Circulation*, 2010. **122**(22): p. 2313-22.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Hyaluronsäure	2
Abbildung 1-2: Adenosin.....	4
Abbildung 1-3: Regulation extra- und intrazellulärer Adenosinkonzentrationen....	5
Abbildung 4-1: mRNA-Expression der Adenosinrezeptorisoformgene auf HCASMC.....	19
Abbildung 4-2: A: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach Stimulation mit NECA; B+C: Immunhistochemische Färbung der extrazellulären HA	21
Abbildung 4-3: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach Stimulation mit CADO; B+C: Immunhistochemische Färbung der extrazellulären HA.....	23
Abbildung 4-4: A+B: Veränderung der mRNA Expression der HAS-1 nach Stimulation mit NECA/CADO.....	25
Abbildung 4-5: A+B: Veränderung der mRNA Expression der HAS-2 nach Stimulation mit NECA/CADO.....	26
Abbildung 4-6: A+B: Veränderung der mRNA Expression der HAS-3v1 nach Stimulation mit NECA/CADO.....	27
Abbildung 4-7: A+B: Veränderung der mRNA Expression der HAS-3v2 nach Stimulation mit NECA/CADO.....	28
Abbildung 4-8:	30
A+B+C+D: PARP und β -Tubulin Nachweis auf Western Blots nach Stimulation mit NECA/CADO.....	30
Abbildung 4-9: Darstellung des F-Aktinskeletts mit Phalloidin nach Stimulation mit NECA und CADO	32
Abbildung 4-10: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit CCPA	34
Abbildung 4-11: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit CGS 21680.....	35
Abbildung 4-12: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit IB-MECA	36
Abbildung 4-13: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit NECA, nach Vorinkubation mit DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 gemeinsam und anschließender Stimulation mit NECA und nach Stimulation mit	

Abbildungsverzeichnis

DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 ohne anschließende Stimulation mit NECA.....	37
Abbildung 4-14: Veränderung der HAS-1 mRNA Expression nach Stimulation mit NECA und nach Vorinkubation mit DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 und anschließender Stimulation mit NECA	39
Abbildung 4-15: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach Stimulation NECA und nach Vorinkubation mit DPCPX, SCH21680, MRS1706 und MRS1334 und anschließender Stimulation mit NECA.	41

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Substanzliste Stimulation.....	8
Tabelle 2-2: Material Zellkultur	8
Tabelle 2-3: Chemikalien und Kits	9
Tabelle 2-4: Antikörper Färbungen	9
Tabelle 2-5: Antikörper Western	10
Tabelle 2-6: Geräte und Material	10
Tabelle 2-7: PCR Ansatz	14
Tabelle 2-8: Temperaturprofil PCR.....	14
Tabelle 2-9: Primer PCR.....	14
Tabelle 5-1: Verwendete Abkürzungen	iii

9 Anhang

9.1 Danksagung

Nach Fertigstellung meiner Dissertation danke ich allen, die mich in den letzten Jahren so tatkräftig unterstützt haben. Zunächst meinem Doktorvater, Herrn Professor Jens W. Fischer für die gute Betreuung und Frau Doktor Grandoch für ihre Betreuung und wichtige Denkanstöße.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Labor, welche mir immer wieder weitergeholfen haben, vor allem Peggy Marra-Mann für die unzähligen RT-PCRs!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Mann, ohne deren Zuspruch und Optimismus dieses Werk nicht vollendet worden wäre.

Danke Katharina für 5 Jahre Unterstützung!

9.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 7.10.2014

Johanna Hoffmann