

**Einfluss der Hyaluronsäuresynthese 3 auf
vaskuläre Pathologien wie
Atheroskleroseentwicklung und
Neointimabildung nach Gefäßverletzung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lena Sophia Kiene (geb. Dick)

aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2017

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer
2. Prof. Dr. rer. nat. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Neointimahyperplasie und glatte Gefäßmuskelzellen	2
1.2 Atherosklerose	4
1.3 Restenose nach Gefäßintervention	5
1.4 Hyaluronsäurematrix	6
1.4.1 Hyaluronsäuresynthese und Funktion	7
1.4.2 Hyaluronsäurerezeptoren	9
1.4.3 Hyaluronsäure und vaskuläre Pathologien	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten	14
2.1.1 Verwendete Tiere	14
2.1.1.1 Hyaluronsäuresynthese 3 defiziente Mäuse	14
2.1.1.2 Apolipoprotein E und Hyaluronsäuresynthese 3 doppeldefiziente Mäuse	15
2.1.2 Tierhaltung und Genehmigung	15
2.1.3 Neointimahyperplasie nach Ligatur der <i>Arteria carotis communis</i>	16
2.1.4 Einfluss einer <i>Has3</i> -Defizienz auf die Entwicklung der Atherosklerose	16
2.1.5 Blutdruckmessung	16
2.1.6 Messung der Endothelfunktion an isolierten murinen Aorten	17
2.1.7 Plasmapräparation	18
2.1.8 Bestimmung der Blutglukosekonzentration	18
2.1.9 Probenentnahme und Aufbereitung für histologische Analysen	18
2.1.10 Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen	19
2.2 Histologie	20
2.2.1 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie	20
2.2.2 Histochemische Färbungen	21
2.2.2.1 <i>En face</i> Färbung der Aorta	21
2.2.2.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)	21
2.2.2.3 Kollagen	21
2.2.3 Immunhistochemische und affinitätshistochemische Färbungen	21
2.2.3.1 Hyaluronsäure	22
2.2.3.2 Makrophagen	23
2.2.3.3 Alpha-Glattmuskelaktin	23
2.2.3.4 Proliferation	23
2.2.3.5 Apoptose	23
2.2.4 Aufnahme und Auswertung der Färbungen	24
2.2.4.1 Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen	24
2.2.4.2 Morphometrische Analyse der Neointimahyperplasie	24
2.2.4.3 Bestimmung der Plaquegröße am Aortenursprung	25
2.2.4.4 Größe des nekrotischen Kerns und der fibrotischen Kappe	25

2.2.4.5	Quantitative Auswertungen der Färbungen	25
2.3	Protein- und Lipoproteinanalytik	26
2.3.1	Multiplex Analyse zirkulierender Zytokine und Chemokine	26
2.3.2	Bestimmung des Plasmacholesterins	26
2.3.3	Endotheliale NO-Synthase (eNOS) Western-Blot	26
2.3.4	Oxyblot™	27
2.4	Zellversuche	28
2.4.1	Kultur humaner koronararterieller Glattmuskelzellen	28
2.4.2	Lentivirale Herabregulation der <i>HAS3</i>	28
2.4.3	Migration	28
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen	28
2.5.1	RNA-Isolation und reverse Transkription	28
2.5.2	Quantitative Realtime-PCR	29
2.5.3	Mikroarray Genexpressionsanalysen	31
2.6	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Einfluss einer <i>Has3</i> -Defizienz auf die Neointimahyperplasie nach Carotisligatur	33
3.1.1	Basale Charakteristika der <i>Has3</i> ^{-/-} -Maus	33
3.1.2	Morphometrische Analyse der Neointimabildung	33
3.1.3	Anreicherung von HA in der <i>Arteria carotis communis</i> nach Ligatur	36
3.1.4	Genexpression der HAS-Isoformen nach Carotisligatur	37
3.1.5	Genexpression von <i>Cd44</i> und <i>Rhmm</i> nach Carotisligatur	38
3.1.6	Differenzierungsgrad der VSMC	39
3.1.6.1	Genexpression von <i>Acta2</i> und <i>SM22α</i> nach Carotisligatur	39
3.1.6.2	Detektion glattmuskulärer Zellen in der Neointima	39
3.1.7	Untersuchung der Proliferation und Apoptoseeigung	40
3.1.8	Analyse des Transkriptom nach Carotisligatur	42
3.1.9	Nach Carotisligatur regulierte KEGG-Signalwege	44
3.1.10	Charakterisierung des Entzündungsgeschehens nach Carotisligatur	46
3.1.10.1	Genexpression von <i>Il1b</i> , <i>Tnfa</i> und <i>Ccl2</i> nach Carotisligatur	46
3.1.10.2	Gene Array Analyse der Entzündungsmarker	46
3.1.10.3	Zirkulierende Zytokine und Chemokine	48
3.1.11	Blutparameter	49
3.1.12	Endothelfunktion	49
3.1.13	Oxidativer Stress	52
3.1.14	Migration glatter Gefäßmuskelzellen	54
3.1.15	Genexpression der HA-Rezeptoren in CaSMC	56
3.2	Einfluss einer <i>Has3</i> -Defizienz auf die Entstehung der Atherosklerose	58
3.2.1	Gewichtskontrolle der Versuchstiere	58
3.2.2	Blutlipide	59
3.2.3	<i>En face</i> Färbung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta	59
3.2.4	Quantifizierung der Atherosklerose im Aortenursprung	60
3.2.5	Plaquemorphologie im Aortenursprung	61
3.2.5.1	Nekrotischer Kern und fibrotische Kappe	61
3.2.5.2	Zellichte	62
3.2.5.3	Kollagen	63
3.2.5.4	Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC)	64
3.2.5.5	Makrophagen	65
3.2.5.6	Proliferation	66
3.2.5.7	Apoptose	67

4	Diskussion	68
4.1	HA-System als therapeutische Zielstruktur bei kardiovaskulären Erkrankungen	68
4.2	<i>Has3</i> -Defizienz schützt vor Neointimahyperplasie nach Carotisligatur.....	70
4.2.1	Kompensationsmechanismen.....	70
4.2.2	VSMC-Phänotyp	70
4.2.3	Entzündung.....	72
4.2.4	Endothelfunktion	73
4.2.5	Oxidativer Stress.....	74
4.2.6	HAS3 fördert die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen	74
4.2.7	Regulation der HA-Rezeptoren durch PDGF-BB und IL-1 β	75
4.3	<i>Has3</i> -Defizienz reduziert aortale atherosklerotische Läsionen	78
4.3.1	Auswirkungen der <i>Has3</i> -Defizienz auf die Größe atherosklerotischer Läsionen in der Aorta	78
4.3.2	Plaquemorphologie im Aortenursprung	79
4.3.2.1	Struktureller Aufbau	79
4.3.2.2	Apoptose	80
4.3.2.3	Zellproliferation	81
4.3.2.4	Alpha-Glattmuskelaktin-positive Zellen	81
4.3.2.5	Kollagengehalt und -packungsdichte.....	82
4.3.2.6	Makrophagenretention.....	82
4.4	Ausblick und Limitationen	84
5	Zusammenfassung.....	86
6	Summary	87
7	Literaturverzeichnis	88
	Veröffentlichungen.....	105
	Lebenslauf.....	107
	Danksagung.....	108
	Eidesstattliche Versicherung	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arterieller Gefäßwandaufbau.	2
Abbildung 2: Die Morphologie von VSMC im differenzierten und synthetischen Phänotyp.	3
Abbildung 3: Beispiel einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion.	5
Abbildung 4: Strukturformel der Hyaluronsäure.	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hyaluronsäuresystems.	8
Abbildung 6: Schematische Übersicht der Generierung der <i>Has3</i> -defizienten Maus.	15
Abbildung 7: Schematische Übersicht der Neointimahyperplasie entlang der <i>A. carotis communis</i> nach Carotisligatur.	24
Abbildung 8: Körpergewicht.	33
Abbildung 9: Übersicht der Neointimahyperplasie entlang der <i>A. carotis communis</i> mit zunehmendem Abstand zum Referenzpunkt.	34
Abbildung 10: H&E-gefärbte Carotiden von <i>Has3</i> -defizienten und WT-Mäusen 28 Tage nach Ligatur.	34
Abbildung 11: Vergleich der Neointimahyperplasie in <i>Has3</i> -defizienten und WT-Mäusen.	35
Abbildung 12: Morphometrische Parameter der ligierten <i>A. carotis communis</i> von <i>Has3</i> -defizienten und WT-Mäusen.	35
Abbildung 13: Zelldichte in der Neointima.	36
Abbildung 14: Hyaluronsäureakkumulation in der <i>A. carotis communis</i>	36
Abbildung 15: Quantifizierung der HA-Akkumulation in der <i>A. carotis communis</i> nach Carotisligatur.	37
Abbildung 16: Genexpression der HAS-Enzyme nach Carotisligatur.	37
Abbildung 17: <i>Has1</i> und <i>Has2</i> mRNA-Expression in Carotiden <i>Has3</i> -defizienter Tiere.	38
Abbildung 18: <i>Cd44</i> und <i>Rhmm</i> mRNA-Expression in Carotiden <i>Has3</i> -defizienter Tiere.	38
Abbildung 19: mRNA-Expression von VSMC-Differenzierungsmarkern nach Carotisligatur.	39
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von alpha-Glattmuskelaktin.	40
Abbildung 21: Proliferation.	41
Abbildung 22: Apoptose.	41
Abbildung 23: Gene Array–Venn-Diagramm.	42
Abbildung 24: Gene Array–hierarchische Clusteranalyse und <i>volcano plot</i>	43
Abbildung 25: Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach Carotisligatur.	46
Abbildung 26: Übersichtsdarstellung von differentiell regulierten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren 5 Tage nach Carotisligatur.	47
Abbildung 27: Multiplex Analyse zirkulierender Zytokine und Chemokine.	48
Abbildung 28: Blutparameter.	49
Abbildung 29: Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.	49

Abbildung 30: eNOS Proteinexpression.....	50
Abbildung 31: Endothelfunktion.....	51
Abbildung 32: Oxyblot™	52
Abbildung 33: Gene Array–Oxidativer Stress.....	53
Abbildung 34: Lentivirale Herabregulation von <i>HAS3</i> in CaSMC.....	54
Abbildung 35: Migration und Proliferation nach Herabregulation der <i>HAS3</i> in CaSMC.....	55
Abbildung 36: Genexpression mit Migration assoziierter Gene nach Herabregulation der <i>HAS3</i> in CaSMC.....	55
Abbildung 37: Genregulation der HA-Rezeptoren nach PDGF-BB-Stimulation.....	56
Abbildung 38: IL-1β-stimulierte Genexpression der HA-Rezeptoren.....	57
Abbildung 39: <i>RHAMM</i> Genexpression im Zeitverlauf nach IL-1β + PDGF-BB-Stimulation..	57
Abbildung 40: Körpergewicht der Versuchstiere.....	58
Abbildung 41: Plasmacholesterol.....	59
Abbildung 42: <i>en face</i> Aufnahmen muriner Aorten.....	59
Abbildung 43: Quantitative Auswertung der <i>en face</i> Aufnahmen muriner Aorten.....	60
Abbildung 44: H&E-Färbung des Aortenursprungs.....	61
Abbildung 45: Nekrotischer Kern und fibrotische Kappe der Läsionen im Aortenursprung. ..	62
Abbildung 46: Zelldichte im Aortenursprung.....	63
Abbildung 47: Kollagenfärbung im Aortenursprung, Gesamtgehalt.....	63
Abbildung 48: Kollagenfärbung im Aortenursprung, Packungsdichte.....	64
Abbildung 49: Detektion glatter Gefäßmuskelzellen im Aortenursprung.....	65
Abbildung 50: MAC2-Färbung zur Detektion der Makrophagen im Aortenursprung.....	66
Abbildung 51: Detektion proliferierender Zellen im Aortenursprung.....	66
Abbildung 52: Detektion apoptotischer Zellen im Aortenursprung.....	67
Abbildung 53: Zusammenfassende Abbildung der Funktion von <i>HAS3</i> bei der Ausbildung einer Neointima. Modifiziert nach Puré <i>et al.</i> 2016. ¹⁷⁹	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pufferzusammensetzungen.....	18
Tabelle 2: Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie	20
Tabelle 3: Verwendete Antikörper und Bindeproteine für histochemische Färbungen	22
Tabelle 4: Pufferzusammensetzungen	27
Tabelle 5: In der qPCR verwendete Primersequenzen.	30
Tabelle 6: KEGG-Signalwege reguliert in <i>Has3</i> -defizienten und WT-Mäusen.	44
Tabelle 7: KEGG-Signalwege ausschließlich reguliert in WT-Mäusen.	45
Tabelle 8: KEGG-Signalwege ausschließlich reguliert in <i>Has3</i> -defizienten Mäusen.	45

Abkürzungsverzeichnis

18S	eukaryotische ribosomale Ribonukleinsäure
4-MU	4-Methylumbelliferon
<i>Acta2</i>	alpha-Glattmuskelaktin
Apo	Apolipoprotein
AUC	Fläche unter der Kurve
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
C57Bl/6J	Inzucht Mausstamm
CaSMC	humane koronararterielle glatte Gefäßmuskelzellen
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DMAP	<i>damage associated molecular pattern molecule</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcA	D-Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	<i>hora</i> Stunde
HA	Hyaluronsäure
HA-BP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HARE	<i>Hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS / <i>Has</i>	Hyaluronsäuresynthase
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HMW-HA	hochmolekulare Hyaluronsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HYAL	Hyaluronidase
H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung
ICD-10	<i>International classification of diseases, 10.Version</i>
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KG	Körpergewicht
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
LEE	<i>Lamina elastica externa</i>
LEI	<i>Lamina elastica interna</i>
LMW-HA	niedermolekulare Hyaluronsäure
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
M	mol/l
m/m	Massenprozent
MAC2	Galektin-3 (Lgals3)

MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MCP-1 / <i>Ccl2</i>	<i>monocyte hemoattractant protein-1</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Myh11	<i>myosin heavy chain 11</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>n. s.</i>	nicht signifikant
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Plättchen-stämmiger Wachstumsfaktor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PGE	Prostaglandin E
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RHAMM	Rezeptor für HA-vermittelte Motilität
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SM-MHC	<i>myosin heavy chain</i>
SM22 α	Transgelin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TLR	Toll-artiger Rezeptor
TNF- α / <i>Tnfa</i>	Tumornekrosefaktor α
TSG-6	Tumornekrosefaktor α -stimuliertes-Gen-6
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UDP	Uridindiphosphat
V	Volumen
V/V	Volumenprozent
vs.	versus
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Unter dem Begriff „kardiovaskuläre Erkrankungen“ fasst die ICD-10-Klassifikation der WHO eine Vielzahl an Krankheitsbildern zusammen, zum Beispiel arterielle Hypertonie, ischämische Herzkrankheiten, Schlaganfall sowie Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren.¹ Weltweit versterben nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) jährlich 17,5 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. Mit einem Anteil von 31,4 % an allen Todesfällen sind sie weltweit die häufigste Todesursache.² Kardiovaskuläre Erkrankungen verzeichnen nicht nur bemerkenswerte Steigerungsraten in Entwicklungsländern, sondern sind auch – trotz guter Umsetzung der Leitlinien der Fachgesellschaften – in Industrienationen nach wie vor die häufigste Todesursache.² Laut statistischem Bundesamt lag in Deutschland ihr Anteil im Jahre 2014 bei 39,8 %.³ Daher ist es von großem gesundheitspolitischem Interesse die bestehenden Therapiemöglichkeiten weiter zu verbessern, um akuten kardiovaskulären Ereignissen vorzubeugen.

Atherosklerotische Gefäßveränderungen stellen einen entscheidenden Faktor für die Ätiologie einiger akut lebensbedrohlicher Krankheitsbilder dar. So können pathologische Veränderungen der Gefäßwand einen akuten Gefäßverschluss zur Folge haben, aus dem ein Sauerstoffmangel im nachgeschalteten Gewebe resultiert. Beim Herzinfarkt kommt es so zu einer ischämischen Myokardnekrose. Auch dem ischämisch bedingten Schlaganfall liegen häufig atherosklerotische Gefäßveränderungen als Ursache für einen akuten Gefäßverschluss zugrunde.

Sowohl bei atherosklerotischen Läsionen als auch bei Restenosen nach Gefäßinterventionen tritt eine Neointimahyperplasie auf, die eine Verengung des Gefäßlumens zur Folge hat. Diese vaskulären Pathologien sind durch eine massive Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix (EZM) mit einer Anreicherung von Hyaluronsäure (HA) charakterisiert. Dies bewirkt eine direkte Ausdehnung des Neointimavolumens und reguliert zudem die Funktionen von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Die Migration und Proliferation von VSMC sind wichtige biologische Vorgänge bei der Ausbildung vaskulärer Läsionen, die durch HA maßgeblich gesteuert werden. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von HA die Neointimahyperplasie anregt und somit die Progression von Restenosen und atherosklerotischen Läsionen fördert. Folglich müsste sich durch eine gezielte Inhibition einzelner HA-Synthasen (HAS) die Ausbildung und Restenose atherosklerotischer Läsionen reduzieren lassen.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Hyaluronsäuresynthase 3 Hemmung auf vaskuläre Pathologien wie die Neointimabildung nach Gefäßverletzung und die Atherosklerose untersucht.

1.1 Neointimahyperplasie und glatte Gefäßmuskelzellen

Bei der Neointimahyperplasie handelt es sich um eine Akkumulation von Zellen, vor allem von VSMC, und EZM in der innersten Schicht der arteriellen Gefäßwand, der *Tunica intima*. Dies geht mit einem Verlust der physiologischen Wandstruktur einher. In gesunden Arterien sind drei Gefäßschichten konzentrisch angeordnet: Eine Endothelzellschicht bildet die *Tunica intima*. Die *Tunica media* wird aus glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) gebildet. Die außen gelegene *Tunica externa* (Adventitia) besteht aus einem fibroblastenreichen Bindegewebe (Abbildung 1).⁴

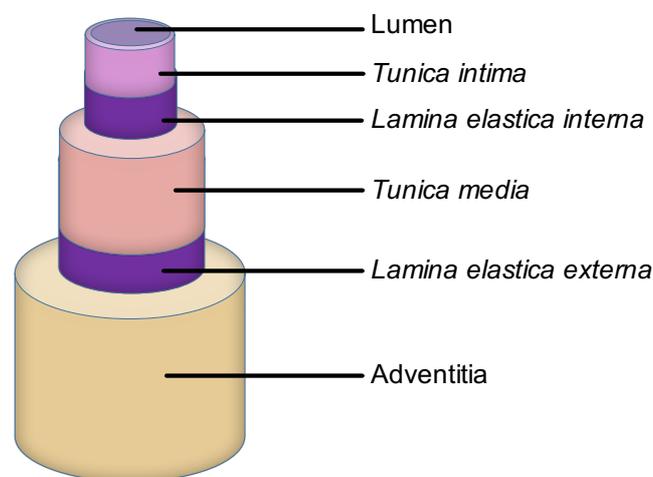


Abbildung 1: Arterieller Gefäßwandaufbau.

Die Intima besteht aus einer Endothelzellschicht, die auf einer Basalmembran aufsitzt und das Gefäß zum Lumen hin abschließt. Ringförmig angeordnete VSMC bilden die Media. Intima und Media werden durch die *Lamina elastica interna* (LEI) getrennt. Die *Lamina elastica externa* (LEE) schließt die Media nach außen ab. Um die glatte Gefäßmuskulatur herum wird das Gefäß durch eine Bindegewebsschicht geschützt, die Adventitia. Diese besteht vor allem aus Fibroblasten, die in eine reiche dicht gepackte EZM eingebettet sind. Hier verlaufen auch Nervenbahnen und versorgende Gefäße.⁴

Eine pathologische Neointimaausbildung tritt beispielsweise bei Lungenhochdruck, Atherosklerose, nach einer Angioplastie sowie bei transplantierten Organen und Venen auf.^{5,6} Ursachen können eine Verletzung, Entzündung oder Überdehnung des Gewebes sein, die VSMC zur Dedifferenzierung, Proliferation, Migration und Matrix-Synthese anregt. Physiologisch ist die Ausbildung einer Neointima z. B. beim Verschluss des *Ductus arteriosus Botalli* zu beobachten.^{7,8}

VSMC sind im Gegensatz zu Skelett- oder Herzmuskelzellen nicht terminal differenziert, sondern weisen eine bemerkenswerte Plastizität auf.⁹ In einer gesunden Arterie besteht die Media aus ruhenden kontraktilen VSMC. Dieser Phänotyp ist wichtig für die physiologische Funktion der Gefäße wie die Regulation des Gefäßtonus.⁶ Charakteristika sind eine langsame Proliferationsrate und Zellmigration sowie geringe EZM-Synthese. Als Antwort auf äußere

Einflüsse, wie bei der Atherogenese oder bei der Entwicklung von Stenosen nach Gefäßverletzungen, gehen VSMC von einem kontraktilem in einen dedifferenzierten Zustand über. Die Zellmorphologie ändert sich (Abbildung 2).^{10, 11} Die Zellen produzieren vermehrt EZM, neigen zur Proliferation und wandern gezielt in die Intima ein. Dieser Phänotyp der VSMC wird auch als „synthetisch“ bezeichnet. Die Dedifferenzierung geht mit einer Herabregulation VSMC-typischer Gene des kontraktilem Apparates, wie alpha-Glattmuskelaktin (Acta2), *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC), *myosin heavy chain 11* (Myh11) oder Transgelin (SM22 α) einher.¹² Neben dem differenzierten kontraktilem und dem proliferativen „synthetischen“ Phänotyp können VSMC auch intermediäre Zustände einnehmen. Diese Vielfalt an Phänotypen gibt VSMC die nötige Flexibilität sich an die gegebenen physiologischen und pathologischen Bedingungen anzupassen. Auch in Zellkultur verlieren VSMC ihren differenzierten Phänotyp.¹³ Die phänotypische Modulation der VSMC kann durch verschiedene Signalmoleküle, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch mechanische Kräfte beeinflusst werden. Eine Vielzahl umfangreicher Untersuchungen konnte zeigen, dass die phänotypische Umwandlung der VSMC aktiv gesteuert wird und nicht nur einen passiven Verlust der kontraktilem Eigenschaften darstellt (für eine Übersicht siehe Owens *et al.* 2004 und Alexander *et al.* 2012).^{12, 13}

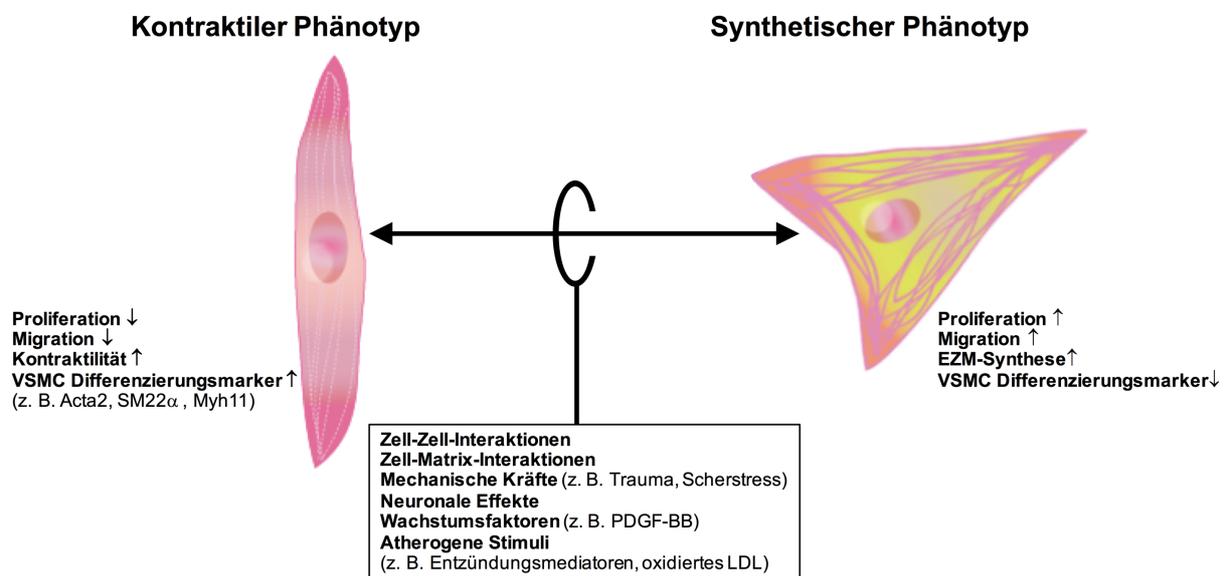


Abbildung 2: Die Morphologie von VSMC im differenzierten und synthetischen Phänotyp.

VSMC können als Antwort auf verschiedene externe Stimuli zwischen einem kontraktilem differenzierten Phänotyp und einem synthetischen Phänotyp wechseln. Eine Dysregulation dieses Prozesses ist bei verschiedenen vaskulären Erkrankungen beschrieben, wie der Neointimaausbildung und Atherosklerose (modifiziert nach Owens *et al.* 2004).¹²

1.2 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine progressive Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems bei der Lipide, Zellen und Bindegewebe in die Gefäßwand eingelagert werden.

Die „*Response-to-injury*“-Theorie geht davon aus, dass die Atherogenese von einem Endothelschaden ausgelöst wird.¹⁴ Durch die Schädigung erhöht sich die Permeabilität des Endothels, Wachstumsfaktoren werden freigesetzt und Adhäsionsmoleküle exprimiert. Verschiedene Noxen können die Dysfunktion des Endothels bewirken. Ein erhöhter *Low-density lipoprotein* (LDL)-Cholesterinspiegel stellt einen Hauptrisikofaktor dar, aber auch immunologische Prozesse, Viren, Toxine und Homocystein können die Bildung atherosklerotischer Plaques hervorrufen.^{15, 16} Betroffen sind vor allem Stellen des Gefäßbaums mit einem verwirbelten Blutfluss wie an Bifurkationen, da hier Scherkräfte auf das Endothel einwirken und dessen Permeabilität erhöhen.^{17, 18}

Die Aktivierung des Endothels bewirkt ein Einwandern von Leukozyten in die Intima und eine subendotheliale Lipidakkumulation.¹⁹ Monozyten reifen zu Makrophagen heran und phagozytieren oxidiertes LDL. Cholesterin reichert sich intrazellulär an, so genannte Schaumzellen entstehen, die einen großen Teil der Läsionen ausmachen. Dies führt zu einer unterschwellig vaskulären Entzündungsreaktion, welche die Aktivierung des Endothels und der VSMC weiter fördert. Entzündungszellen wie Monozyten/Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Mastzellen akkumulieren neben EZM und Lipiden in der Läsion.^{15, 20} In der Gefäßwand eingelagerte körpereigene Lipoproteine wie ApolipoproteinB-100 und oxidiertes LDL sind Antigene für spezifische T-Zellen und Antikörper.²¹⁻²³ Diese lösen Autoimmunreaktionen aus, die sowohl pro- als auch anti-atherogen ausfallen können.

VSMC spielen bei der Atherogenese eine wichtige Rolle.¹⁴ Das aktivierte Endothel, die Entzündungsreaktion und die Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand bewirken eine Aktivierung von VSMC zu einem synthetischen Phänotyp. VSMC migrieren aus der Media in die Intima, proliferieren und sezernieren Wachstumsfaktoren sowie EZM. Atherogene Stimuli wie oxidiertes LDL, Cholesterin, *Platelet-derived growth factor* (PDGF-BB) oder Interleukin 1 β (IL-1 β) begünstigen die Dedifferenzierung von VSMC.²⁴⁻²⁷

Eine übermäßige Proliferation, Migration und Matrixsynthese von VSMC in der Frühphase der Atherogenese fördert die Volumenausdehnung der Läsion und somit die Verengung des Gefäßlumens. Neben der Zellstruktur der Gefäßwand verändert sich auch die EZM. Hier spielen sowohl Synthese- als auch Degradationsprozesse eine zentrale Rolle für die Funktion des Gewebes. Zwischen den beiden Extremen eines differenzierten kontraktilen und eines dedifferenzierten „synthetischen“ Phänotyps, weisen VSMC einen unterschiedlichen Grad der Differenzierung in den verschiedenen Stadien der Läsionen und auch in den verschiedenen Regionen der Läsionen auf. So unterscheiden sich die VSMC der fibrotischen Kappe von den

VSMC nahe der Media. Die verschiedenen Veränderungen des Phänotyps gehen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften einher, die das Krankheitsbild auf verschiedene Art beeinflussen können.²⁸

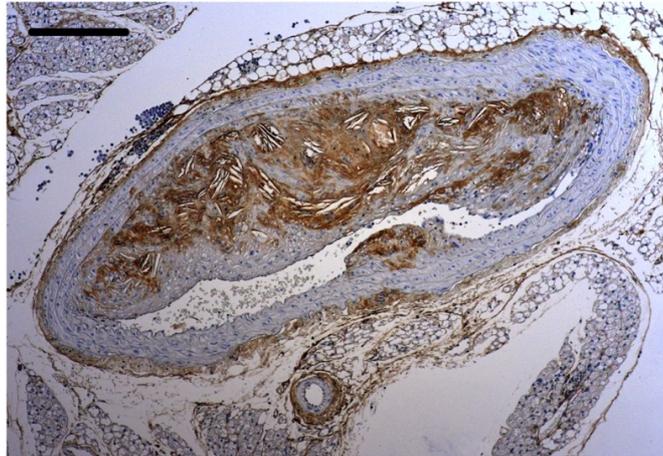


Abbildung 3: Beispiel einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion.

Hyaluronsäure-Bindeprotein-Färbung einer atherosklerotischen Läsion in der Aorta einer ApolipoproteinE-defizienten Maus (*ApoE*^{-/-}) mit großem nekrotischen Kern und Cholesterin-Ablagerungen. Maßstab balken entspricht 200 µm.

Im Zentrum fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen bildet sich ein nekrotischer Kern aus lipidreichen Makrophagen (Schaumzellen), extrazellulären Fetttropfchen und Zelltrümmern, umgeben von veränderter EZM (Abbildung 3).²⁰ Eine fibrotische Kappe, die unter anderem aus VSMC besteht, grenzt die Läsion vom Gefäßlumen ab und schützt vor Ruptur.¹³ In instabilen Läsionen ist der nekrotische Kern vergrößert und die fibrotische Kappe ausgedünnt.²⁹ Dabei ist der Anteil an VSMC im Vergleich zu Schaumzellen verringert. Reißen die Läsionen, wird pro-thrombotisches Material freigesetzt.

Trotz der Vielzahl an inflammatorischen und proliferativen Prozessen entwickelt sich eine atherosklerotische Läsion über Jahre schleichend und zunächst symptomlos. Kommt es allerdings zu einer hochgradigen Stenose oder einer Ruptur der Läsion mit nachfolgender Thrombusbildung, die einen plötzlichen Gefäßverschluss bedingen, treten gravierende und häufig akut lebensbedrohliche kardiovaskuläre Pathologien auf. So etwa Myokardinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina Pectoris und der plötzlichen Herztod.³⁰

1.3 Restenose nach Gefäßintervention

Eine Restenose ist ein erneuter Verschluss einer zuvor behandelten, meist atherosklerotischen, Gefäßokklusion. Restenosen sind häufige langfristige Komplikationen nach Koronarinterventionen wie der Ballonangioplastie.^{31, 32} Durch den Eingriff kann es zu Verletzungen des Endothels und darunterliegender Schichten der Gefäßwand kommen, was

einen strukturellen Umbau der Gefäßwand zur Folge hat. Es tragen verschiedene Mechanismen zur Restenose nach Gefäßinterventionen bei:

Akut kann es zu einem Prolaps des zerstörten Plaques kommen. Zudem bewirken eine elastische Rückstellbewegung der Gefäßwand (*elastic recoil*) sowie konstriktive Umbauprozesse eine Verengung des Gefäßdurchmessers. Auch eine erneute Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion im betroffenen Bereich ist möglich.

Häufig wird die Lumenverengung des verletzten Gefäßes durch eine Neointimahyperplasie ausgelöst. Nach dem Gefäßtrauma setzt ein Heilungsprozess ein. VSMC werden zur Proliferation angeregt und migrieren in die *Tunica Intima*.^{33, 34} Dabei ist die Synthese von EZM-Komponenten wie Hyaluronsäure (HA) gesteigert. Die Hyperplasie von VSMC in der Neointima, eine endotheliale Dysfunktion, eine lokale Entzündung sowie eine gesteigerte Synthese und überschüssige Akkumulation von EZM bewirken eine erneute Okklusion des verletzten Gefäßes.^{35, 36}

Zur Vermeidung von Restenosen hat es in den letzten Jahrzehnten deutliche technische Fortschritte gegeben. Vor allem die Verwendung von medikamentenfreisetzungsfähigen Stents hat die Häufigkeit von Restenosen reduzieren können. Hier kommen Stents zum Einsatz, die mit Arzneistoffen beschichtet sind, die die Zellproliferation hemmen, wie das Makrolid Sirolimus oder das Taxan Paclitaxel.³⁷⁻³⁹ Problematisch sind beim Einsatz von *Drug eluting stents* jedoch Thrombosen, die auftreten können, wenn die Gefäßverletzung und der Stent nur unvollständig oder verzögert reendothelialisiert werden.⁴⁰ Für medikamentenfreisetzende Stents sind eine verzögerte Heilung der Arterie sowie eine erhöhte Prävalenz von Thromben, die bis zu 5 Jahre nach der Operation auftreten können, beobachtet worden.^{41, 42} Neuere Ansätze setzen auf medikamentenbeschichtete Ballonkatheter oder bioresorbierbare Stents.

Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist notwendig, um neue Ansätze zur Vermeidung post-angioplastischer Komplikationen zu finden.

1.4 Hyaluronsäurematrix

EZM, die reich an HA sind, schaffen ein ideales Milieu, um die Migration und Proliferation von Zellen zu fördern.⁴³ HA ist ein lineares Glykosaminoglykan, das aus alternierend β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidisch verknüpfter D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin aufgebaut ist (Abbildung 4). HA ist im Unterschied zu anderen Glykosaminoglykanen nicht sekundär durch Sulfatierungen modifiziert. Im Gegensatz zum simplen chemischen Aufbau der HA steht die Komplexität ihrer biologischen Funktion: Als Bestandteil der Peri- und Extrazellulärmatrix reguliert HA das Mikroumfeld der Zellen. HA beeinflusst das Gewebe zum einen durch seine physikochemischen Eigenschaften. Durch seine Größe und seine negative Ladung ist das Polysaccharid im Stande eine sehr große Menge Wasser zu binden. Dies schafft ein gut hydratisiertes Milieu, in dem Zellen proliferieren und migrieren können.⁴⁴

HA ist viskos und gibt dem Gewebe eine gute Elastizität und Druckbeständigkeit. Neben ihrer strukturgebenden Funktion ist HA über HA-Rezeptoren auch direkt signalgebend und kann so den Zellphänotyp beeinflussen. Dadurch ist HA in einer Vielzahl pathologischer Prozesse involviert. Eine Anreicherung von HA in der EZM ist bei einer Reihe bedeutender Krankheitsbilder zu finden, beispielsweise malignen Tumoren, Autoimmunerkrankungen und vaskulären Pathologien.⁴⁵⁻⁴⁷

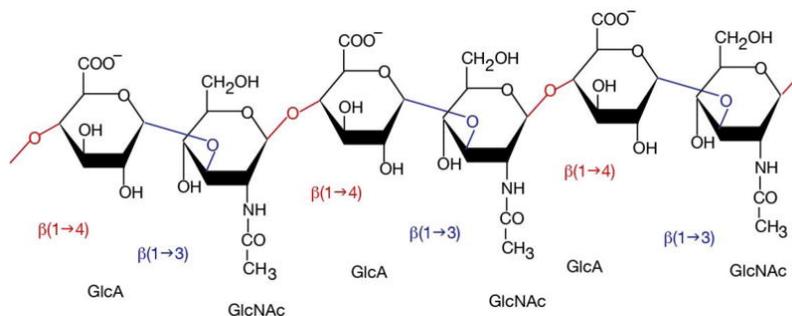


Abbildung 4: Strukturformel der Hyaluronsäure.

Die Glukosederivate D-Glukuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) alternieren in β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidischer Verknüpfung.⁴⁸

1.4.1 Hyaluronsäuresynthese und Funktion

HA wird durch transmembranäre Synthesen, die Hyaluronsäuresynthase-Isoenzyme HAS1, 2 und 3 synthetisiert und dabei direkt in den Extrazellulärraum extrudiert (Abbildung 5).^{43, 49-52}

Das HA-Polymer wird alternierend aus den zytosolischen Substraten UDP- α -D-Glukuronsäure und UDP- α -N-Acetyl-D-Glukosamin gebildet. Die Struktur der von den verschiedenen HAS-Isoenzymen synthetisierten HA unterscheidet sich nicht. Mit $1-10 \times 10^6$ Da hat HA ein hohes Molekulargewicht. Mit ihrer *in vitro* Arbeit von 1999 stellen Itano *et al.* die Hypothese auf, dass die HAS-Isoformen HA von verschiedener Kettenlänge bilden.⁵³ Für HAS1 und HAS3 wurden HA-Polymere kürzerer Kettenlänge beschrieben, während von HAS2-überexprimierenden Zellen lange Ketten gebildet wurden. HA wird durch abbauende Enzyme, den Hyaluronidasen, gespalten.⁵⁴ Diese hydrolysieren die β -1,4-glykosidischen Verbindungen zwischen N-Acetyl-D-Glukosamin und D-Glukuronsäure, so dass sich kurzkettenige HA-Fragmente bilden. Bestimmend für die biologische Funktion von HA ist sowohl die Kettenlänge als auch der Interaktionspartner.⁵⁵⁻⁵⁷ Hochmolekulare HA hat eine Vielzahl an Funktionen, die vor allem dem Erhalt der physiologischen Gewebsstruktur dienen. Niedermolekulare HA-Fragmente jedoch werden als pro-angiogen, entzündungsfördernd und stimulierend auf das Immunsystem beschrieben.^{48, 58} Niedermolekulare HA ist in vielen pathologischen Prozessen, wie Gewebsverletzungen oder Entzündungen, zu beobachten,

vermutlich bedingt durch eine veränderte Expression der HA-Synthasen sowie der HA-abbauenden Enzyme.⁵⁹

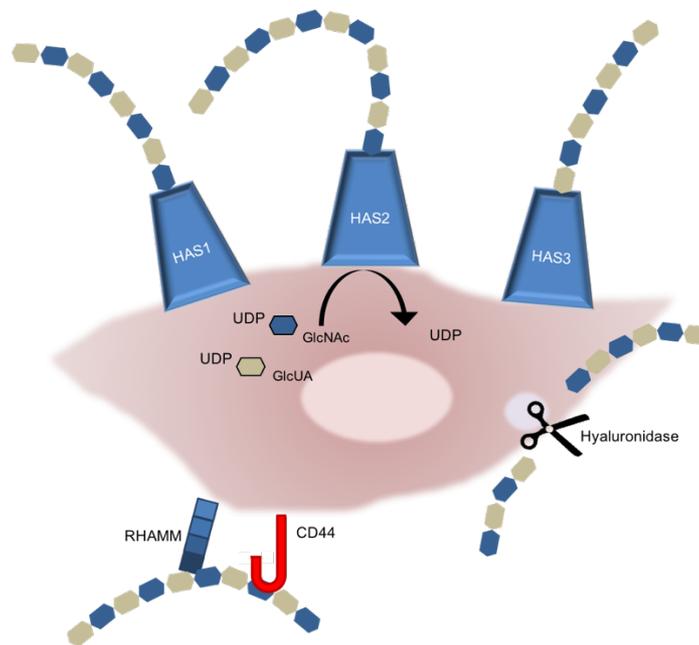


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hyaluronsäuresystems.

Membranständige HAS-Isoenzyme synthetisieren HA aus UDP- α -D-Glukuronsäure (UDP-GlcUA) und UDP- α -N-Acetyl-D-Glukosamin (UDP-GlcNAc) unter Abspaltung von Uridindiphosphat (UDP). HA bindet an HA-Rezeptoren wie RHAMM und CD44 und aktiviert zelluläre Signalwege. Die HA-Polymere werden durch Hyaluronidasen zu kürzeren Ketten verstoffwechselt.

Im Fokus der folgenden Untersuchungen ist die HAS3. Lokalisation der *HAS3* im humanen Genom ist das Chromosom 16q22.1, in der Maus das Chromosom 8.⁶⁰ Es sind drei Spleißvarianten der humanen *HAS3* in der NCBI *Gene*-Datenbank beschrieben, die zwei Proteine codieren.⁶¹ Die längere Isoform HAS3a wird von zwei der Transkriptionsvarianten gebildet. Isoform b ist kürzer und hat den gleichen N-Terminus wie Isoform a jedoch einen anderen C-Terminus (NCBI, Gen-ID: 3038, NM_001199280.1, NM_005329.2, NM_138612.2, letzte Aktualisierung 6. September 2017; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3038>).

Eine genetische Deletion von *Has2* im Mausmodell führt zu Anomalien in der vaskulären und kardialen Entwicklung, so dass diese Tiere bereits embryonal versterben (E 9.5–10).⁶² Aufgrund dieses deutlichen Einflusses, den die *Has2* bereits auf die Embryonalentwicklung hat, ist die HAS2 nur bedingt als therapeutische Zielstruktur geeignet. Mausmodelle mit einer Deletion der *Has1* und/oder *Has3* hingegen sind lebensfähig.⁶³

Die Expression der *HAS*-Isoenzyme wird auf Ebene der Genregulation durch akute Stimuli wie die Exposition der Zellen mit Entzündungs- und Wachstumsfaktoren beeinflusst.⁶⁴ Beispielsweise wird die HA-Synthese durch PDGF, TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β), IL-1 β , IL-6, Interferon γ (INF γ) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α)

reguliert.⁶⁵⁻⁷¹ Auch durch Lokalhormone wie Prostaglandine kann die Genexpression der HAS-Enzyme gesteuert werden.^{8, 65, 72} Dabei sind die drei Isoformen verschieden reguliert. Die relativen Expressionen unterscheiden sich je nach Gewebe und Krankheitsbild. Auf diese Art kann sich die HA-Matrix an physiologische und pathologische Gegebenheiten anpassen und unterstützt Umwandlungen im Gewebe.

1.4.2 Hyaluronsäurerezeptoren

HA kann an HA-Bindeproteinen binden und über diese zelluläre Funktionen beeinflussen. Wichtige Rezeptoren für HA sind CD44 und der Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (RHAMM, häufig auch mit HMMR abgekürzt).⁷³ Weitere Beispiele sind Hyaladherine, wie TSG6 (Tumornekrosefaktor-alpha-stimuliertes-Gen-6), Versican, Tenascin C oder auch die HA-Rezeptoren endothelialer Lymphgefäßrezeptor 1 (LYVE-1), der HA-Rezeptor für Endozytose (HARE) und die Toll-artigen-Rezeptoren (TLR) -2 und -4.⁷⁴⁻⁷⁶ Durch Bindung an diese kann HA verschiedene Signalwege modifizieren und so Prozesse wie Proliferation, Migration und Inflammation beeinflussen.⁴³ Beispielsweise kann HA in VSMC Signalwege über RHAMM und CD44 aktivieren und so die Proliferations- und Migrationsrate steigern wie *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zeigen.⁷⁷⁻⁷⁹

CD44 ist der Hauptrezeptor für HA und ubiquitär exprimiert.⁸⁰ Von CD44 gibt es verschiedene Isoformen, die sich durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen unterscheiden.⁸¹ Die Expressionsprofile der Isoformen variieren je nach Gewebetyp und Differenzierungsstadium der Zellen.^{82, 83} Der Grad der posttranslationalen Modifikationen beeinflusst die Affinität zu HA.⁸⁴ CD44 ist an einer Vielzahl an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt wie Proliferation, Adhäsion, Migration, Hämatopoese sowie Aktivierung, *Homing* und Extravasation von Lymphozyten.⁸⁵ CD44 selbst hat keine intrinsische Kinase-Aktivität und muss daher mit anderen Rezeptoren interagieren, um Signalwege zu modulieren.⁸⁶ Neben dem transmembranären CD44 ist auch lösliches CD44 in Serum und Lymphe beschrieben, welches der Ektodomäne des Rezeptors entspricht.⁸⁷

Der Rezeptor RHAMM reguliert die HA-vermittelte Motilität der Zellen. Eine Expression von RHAMM ist ubiquitär zu finden, vor allem aber in Geweben, in denen eine ausgeprägte Zellteilung und Migration stattfindet.^{88, 89} Eine RHAMM-Expression ist beispielsweise bei der Wundheilung beschrieben; die Migration und Proliferation von Zellen ist für den Wundverschluss essentiell.^{90, 91} Verschiedene Tumoren zeigen eine deutliche RHAMM-Überexpression.⁹²⁻⁹⁴ Im Zellzyklus ist *RHAMM* differentiell reguliert mit einem Maximum in der G2/M Phase.⁹⁵ Es sind vier verschiedene Spleißvarianten des humanen *RHAMM*-Gens beschrieben (NCBI, Gen-ID: 3161, letzte Aktualisierung 3. September 2017; NM_001142556.1, NM_001142557.1, NM_012484.2, NM_0122485.2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3161>).⁶¹

RHAMM ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, wo es in Kontakt mit EZM-Molekülen wie HA steht.⁸⁸ Aber auch intrazellulär ist RHAMM detektierbar, im Nukleus, assoziiert an Interphasen- und Mitosen-Mikrotubuli und dem Zentrosom.^{96, 97} Je nach Lokalisation in der Zelle erfüllt RHAMM unterschiedliche Funktionen, die es alleine oder nach Bindung an HA ausüben kann.⁹⁸ Intrazelluläres RHAMM fördert die Stabilität der Mitosespindeln.⁹⁹ An der Zelloberfläche kann RHAMM mit integralen Tyrosinkinaserzeptoren oder Nicht-Tyrosinkinaserzeptoren interagieren. Beispiele sind PDGF-Rezeptor, TGF- β -Rezeptor 1, CD44 und CD44-EGFR-Komplexe.^{90, 100, 101} Die Signalgebung durch RHAMM ist insofern besonders, als dass nach Bindung von HA einige Signalwege direkt aktiviert werden, RHAMM jedoch auch als Co-Faktor die Aktivität anderer Rezeptoren reguliert. Zelloberflächen-RHAMM bildet mit CD44 und HA Komplexe, die mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und deren Liganden interagieren. Diese aktivieren die ERK1,2-MAP-Kinase-Signalkaskaden und stimulieren so die Zellmotilität.¹⁰²⁻¹⁰⁴

1.4.3 Hyaluronsäure und vaskuläre Pathologien

HA ist ein physiologischer Bestandteil der Gefäßwand. Im gesunden Gefäß ist sie vor allem in der Glykokalyx des Endothels und in der Adventitia detektierbar. Bei Gefäßerkrankungen kommt es zu strukturellen Veränderungen der EZM, was auch zu einer veränderten Zellfunktion beiträgt. So sind bei atherosklerotischen Plaques sowie in der Neointima von durch Restenose okkludierten Gefäßen eine vermehrte Synthese und Akkumulation von HA beobachtet worden.^{46, 72, 105-108} Bei Gefäßverletzungen und im Entzündungsgeschehen wird verstärkt HA von höherer Molekularmasse zu kurzketziger HA fragmentiert.^{57, 59}

HA entfaltet vielfältige biologische Wirkungen auf die an vaskulären Erkrankungen beteiligten Zelltypen. Beispielsweise reguliert HA die Rekrutierung von Immunzellen.⁴⁸ Auch für die Funktion der Glykokalyx von Endothelzellen ist HA entscheidend.^{69, 109-111} Zudem beeinflusst HA die phänotypische Aktivierung von VSMC sowie die Ausbildung einer Neointima.^{79, 107, 112}

Für die Pathogenese der Atherosklerose wie auch der Stenose nach Gefäßverletzung ist die Ausbildung einer Neointima ein entscheidender Schritt. Vor allem in der Frühphase der Entwicklung von Gefäßläsionen konnte ein Anstieg der HA-Menge im Umfeld von migrierenden und proliferierenden VSMC beobachtet werden.^{107, 113-115} Dieses veränderte Zellumfeld beeinflusst im Umkehrschluss wieder den Differenzierungsgrad der VSMC.¹² So moduliert HA die Zellproliferation und –migration von VSMC.^{79, 116, 117}

Pro-atherosklerotische Stimuli fördern die HA-Synthese in VSMC, so dass sich ausgeprägte perizelluläre HA-Mäntel bilden.^{71, 72} Beispielsweise induzieren IL-1 β , oxidiertes LDL und Cholesterin die Genexpression von HAS3 in VSMC.^{71, 118} Durch die vermehrte extra- und perizelluläre HA wird die Zelladhäsion reduziert, es bildet sich eine für die Zellmigration durchlässige EZM.^{68, 79} HA fördert den pro-migratorischen und pro-proliferativen Phänotyp der

VSMC nicht nur über seine physikochemischen Eigenschaften, sondern ist über die HA-Rezeptoren RHAMM und CD44 auch direkt signalgebend.¹¹⁹ In Versuchen, bei denen die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM blockiert wurden, konnte eine verminderte Proliferation und Migration von VSMC sowie eine reduzierte Hyperplasie der Neointima beobachtet werden.^{116, 120, 121} Der deutliche Einfluss der HA-Matrix auf den proliferativen und migratorischen Phänotyp der VSMC macht eine Beteiligung an der Pathogenese der Neointimahyperplasie wahrscheinlich.

Auch die vaskuläre Entzündung wird von der HA-Matrix reguliert.⁴⁸ *In vitro*-Studien zeigen, dass Monozyten HA-abhängig an die EZM gebunden werden.^{122, 123} Oxidiertes LDL fördert die Bildung einer EZM, die Monozyten HA-abhängig binden kann.¹²⁴ HA-Fragmente können die entzündliche Antwort anregen, beispielsweise über ihre Funktion als DMAP (*damage associated molecular pattern molecule*).¹²⁵⁻¹²⁷

Die Signalgebung von HA über CD44 scheint sich verstärkend auf die Atherosklerose auszuwirken, wie die verringerte Entzündung und Atherosklerose in *ApoE/Cd44*-doppeldefizienten Tieren zeigt.^{56, 128} So ist auch eine erhöhte Expression von CD44 in humanen Atheromen, abdominellen Aortenaneurysmen und neointimalen Hyperplasien beobachtet worden.^{77, 129} Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus C57BL/6J-Mäusen, bei denen in einem Restenose-Modell der Femoralarterie eine vermehrte Neointimahyperplasie bei ubiquitärem CD44 Knock-out gezeigt wurde.¹³⁰

RHAMM ist im Kontext der Atherosklerose wenig untersucht. Eine Arbeit aus dem Jahr 2013 von Silverman-Gavrila *et al.* zeigt, dass RHAMM bei der Neointimahyperplasie wichtig für die Teilungsgenauigkeit der Zellen ist.¹³¹ Eine konstriktive Gefäßverengung nach Carotisligatur kann durch eine genetische Deletion von RHAMM reduziert werden.¹³² RHAMM wurde vermehrt in neu gebildeten Blutgefäßen in der Intima fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen detektiert.¹³³

Der Effekt einer chronischen pharmakologischen Inhibierung der HA-Synthese mit 4-Methyumbelliferon [4-MU, 10 mg·g⁻¹·d⁻¹] auf die Atherosklerose wurde in *ApoE*-defizienten Tieren, gefüttert mit einer Western-Diät, untersucht. Interessanterweise wurde hier eine verstärkte Atherosklerose beobachtet.¹⁰⁹ Dies widerspricht der Hypothese, dass HA durch seine migrations- und proliferationsfördernden Eigenschaften pro-atherosklerotisch wirkt. Dieses Ergebnis wurde mit der Funktion von HA als Bestandteil der schützenden Glykokalyx des Endothels erklärt. Diese wird durch die Synthesehemmung gestört. So entsteht eine Angriffsfläche für eine verstärkte Leukozytenadhäsion mit nachfolgender Entzündung. In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von 4-MU auf die Ausbildung einer Neointima untersucht. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. In einer anderen Arbeit wurde die Neointimahyperplasie unter 4-MU-Behandlung [6 mg·g⁻¹·d⁻¹] in C57BL/6J-Wildtypen, gefüttert mit normalem Futter, untersucht. In diesem nicht

pro-atherosklerotischen Modell wurde eine reduzierte Hyperplasie der Neointima beobachtet.¹¹⁹

In vitro konnte gezeigt werden, dass in VSMC alle drei Isoformen an der HA-Synthese beteiligt sind. HAS2 scheint dabei den größten Teil der HA zu synthetisieren.¹³⁴ Derzeit ist nicht bekannt, ob die drei HAS-Isoenzyme und die von ihnen synthetisierte HA jeweils verschiedene Funktionen in VSMC ausüben und somit vaskuläre Pathologien unterschiedlich beeinflussen. Dies lässt sich nur durch eine selektive genetische Modulation einzelner Synthesen untersuchen.

Bisher liegen Untersuchungen vor, die mit einem Mausmodell mit einer VSMC-spezifischen Überexpression der *Has2* arbeiten. Um den Einfluss der HAS2 auf das Krankheitsbild der Atherosklerose zu untersuchen, wurden Mäuse verwendet, die zudem *ApoE*-defizient sind und somit atherosklerotische Läsionen ausbilden. Hier wurden vermehrt atherosklerotische Läsionen und eine erhöhte Gefäßsteifigkeit beobachtet.¹³⁵ Eine nachfolgende Studie verwendet das Modell der VSMC-spezifischen Überexpression von *Has2* in C57BL/6J-Mäusen, um die Rolle der HA für die Neointimaentwicklung zu untersuchen.¹¹⁹ Hier konnte eine vermehrte Neointimahyperplasie nach einer Gefäßverletzung durch Manschetten-Ligatur beobachtet werden. Isolierte aortale VSMC dieses Mausmodells zeigten eine erhöhte Proliferations- und Migrationsrate. Ein Kritikpunkt an diesen Untersuchungen ist die unphysiologische Überproduktion von HA in der Media, die nicht das tatsächliche Geschehen im Krankheitsbild widerspiegelt. Für HAS1 und HAS3 gibt es noch keine *in vivo* Untersuchungen zur Funktion bei der Neointimaentwicklung oder Atherosklerose. Über die Funktion von HAS3 in VSMC ist bisher wenig bekannt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der Hyaluronsäuresynthase 3 assoziierten Hyaluronsäurematrix auf die Neointimalhyperplasie und die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen untersucht werden. Dabei stehen die folgenden Fragestellungen im Vordergrund:

Wie beeinflusst die genetische Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 die Ausbildung der Neointimahyperplasie in einem murinen Modell der Carotisstenose?

Welche Mechanismen liegen diesen Veränderungen zugrunde?

Welche Auswirkungen hat die genetische Deletion der Hyaluronsäuresynthase 3 auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in einem Mausmodell der Atherosklerose?

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Verwendete Tiere

2.1.1.1 Hyaluronsäuresynthase 3 defiziente Mäuse

Hyaluronsäuresynthase 3 defiziente Mäuse (*Has3*^{-/-}) wurden von der Firma genOway (Lyon, Frankreich) generiert. Die Genfunktion der murinen *Has3* wurde gestört, indem das Exon 2, welches das Startcodon enthält, herausgeschnitten wurde (Abbildung 6). Dazu wurde zunächst eine humanisierte *HAS3 knock-in* Maus generiert, indem die cDNA Sequenz der humanen *HAS3* an Stelle des Exon 2 des murinen Gens eingebaut wurde. Die humane *HAS3* cDNA Sequenz war mit einer validierten FRT-Neomycin-FRT-loxP Kasette (5') und einer einzelnen loxP Stelle (3') flankiert. Die Tiere hatten zunächst einen gemischten genetischen Hintergrund aus 129v und C57BL/6J, da die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen aus 129v-Mäusen durchgeführt wurde, die anschließend in Blastozysten aus C57BL/6J-Mäusen eingesetzt wurden. Diese Mäuse wurden im nächsten Schritt mit Mäusen mit einer konstitutiven *Flp*-Rekombinase verpaart, so dass das FRT-Neomycin-FRT Konstrukt herausgeschnitten wurde. Dadurch erhielt man Mäuse, deren humanisiertes Exon 2 mit loxP-Stellen flankiert ist, die gefloxt *hHAS3 knock-in* Maus (*hHAS3-knock-in*^{flox/flox}). Anschließend wurden diese Tiere mit Mäusen gekreuzt, die konstitutiv die Cre-Rekombinase enthalten (genOway, Lyon, Frankreich), so dass die eingebaute humane *HAS3*-Sequenz an den gefloxten Enden herausgeschnitten und abgebaut wurde. Als Resultat erhielt man *Has3*-defiziente Mäuse mit einem konstitutiven ubiquitären Knock-out der *Has3*.¹³⁶ Die Mäuse wurden mit Hilfe einer beschleunigten kongen Strategie über mindestens sechs Generationen zurückgekreuzt, bis Mikrosatelliten-Analysen einen homogenen C57BL/6J-Hintergrund (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich) gezeigt haben.

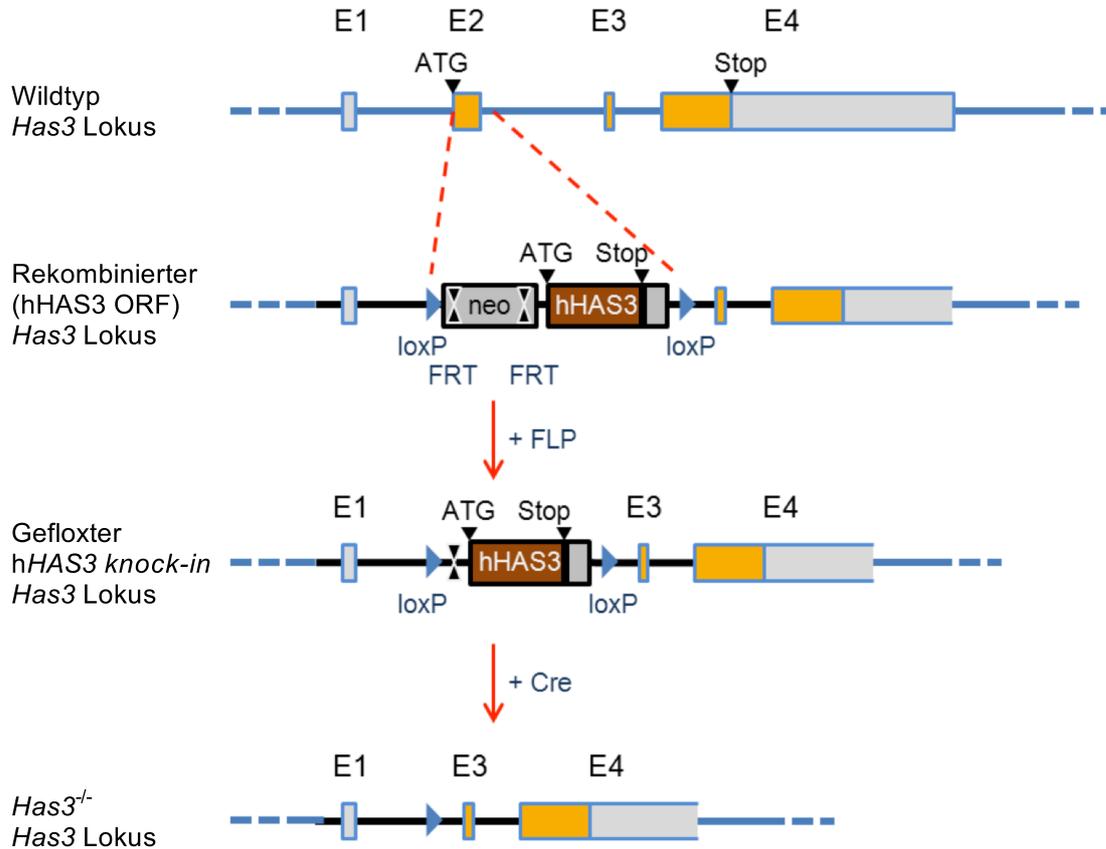


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Generierung der *Has3*-defizienten Maus.
Modifiziert nach genOway.

2.1.1.2 Apolipoprotein E und Hyaluronsäuresynthase 3 doppeldefiziente Mäuse

Als murines Tiermodell der Atherosklerose wurden Apolipoprotein E-defiziente (*ApoE*^{-/-}) Mäuse verwendet.¹³⁷ Die Tiere wurden über die Firma Taconic (Hudson, NY, USA) bezogen und in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet. Der genetische Hintergrund der Tiere ist C57BL/6J. Um die Rolle der HAS3 in der Atherogenese zu untersuchen, wurde die *ApoE*^{-/-}-Maus mit *Has3*^{-/-}-Mäusen verpaart. So erhielt man Mäuse mit einer Defizienz sowohl für das *ApoE*-Gen als für das *Has3*-Gen (*ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}).

2.1.2 Tierhaltung und Genehmigung

Zucht und Tierhaltung sowie Durchführung der Tierversuche erfolgten unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden mit Futter der Firma Ssniff (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert und hatten Zugang zu Futter und entkeimten Trinkwasser *ad libitum*. Mäuse wurden in einem 12 h Tag/Nacht

Rhythmus gehalten. Entsprechende Genehmigungen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen nach § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 lagen vor (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A269, 84-02.04.2013.A434).

2.1.3 Neointimahyperplasie nach Ligatur der *Arteria carotis communis*

Die Ligatur der *Arteria carotis communis* ist ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der Neointimaentwicklung nach Gefäßverletzung *in vivo*.^{138, 139} Es wurden weibliche *Has3^{-/-}*-Mäuse in einem Alter von 21 Wochen verwendet und mit Wurfgeschwistern oder gleichaltrigen C57BL/6J-Mäusen der hauseigenen Zucht des ZETT verglichen. Die Tiere wurden mit einem Mäuse-Haltungsfutter der Firma Ssniff gefüttert. Für die Dauer des Eingriffs wurden die Tiere mit Ketamin (100 mg/kg, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Xylazin (5 mg/kg, Bayer AG, Leverkusen) anästhesiert. Nach einem Hautschnitt von ca. 1,5 cm Länge wurde das Gefäß mit Hilfe eines Stereomikroskops vorsichtig freigelegt. Unterhalb der Bifurkation, an der sich die *Arteria carotis communis* in die *Arteria carotis interna* und die *Arteria carotis externa* aufzweigt, wurde das Gefäß mit einem nicht resorbierbaren 0.6 Perma Hand Seide Faden (Ethicon, Norderstedt) permanent ligiert. Die Wunde wurde schichtweise verschlossen. Die Tiere erhielten perioperativ sowie am nächsten Morgen das Analgetikum Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg Körpergewicht, Temgesic®, Reckitt Benckiser, Berkshire, Großbritannien). Um vor Wärmeverlust zu schützen, wurden die Mäuse während des Eingriffs und der Aufwachphase auf eine Wärmeplatte gelegt. Im postoperativen Verlauf wurden die Tiere täglich kontrolliert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Tagen bzw. 28 Tagen wurden die Tiere für nachfolgende Analysen getötet.

2.1.4 Einfluss einer *Has3*-Defizienz auf die Entwicklung der Atherosklerose

Ab einem Alter von 8 Wochen wurden männliche *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Mäuse und *ApoE^{-/-}*-Kontrolltiere mit einer Western-Diät (S8200-E015, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert, um die Entwicklung der Atherosklerose in diesem Tiermodell zu fördern. Mit 21 % (m/m) Butterfett und 0,15 % (m/m) Cholesterin handelt es sich um eine fett- und cholesterinreiche Diät.¹⁰⁹ Die Versuchstiere wurden nach einem Fütterungszeitraum von 15 Wochen im Endalter von 23 Wochen zur Probenentnahme getötet.

2.1.5 Blutdruckmessung

Zur Messung des Blutdrucks wurde das Gerät BP-2000 (Visitech Systems, Apex, USA) verwendet. Bei dieser nicht invasiven Methode ist keine Narkotisierung der Versuchstiere erforderlich.¹⁴⁰ Mit einem fotoplethysmographischen Sensor wurde die Pulswelle des

Blutflusses in der Schwanzvene erfasst. Mit einer Druckmanschette wurde das die Vene umgebende Gewebe kontinuierlich komprimiert. In der Systole lag ein vollständiger Verschluss des Gefäßes vor, so dass nur noch eine kleine Pulswellenamplitude gemessen wurde. Der an diesem Punkt in der Manschette gemessene Druck entspricht dem systolischen Blutdruck. Die Tiere waren auf einer mit 36 °C beheizten Wärmeplatte platziert, um eine gute Durchblutung der Schwanzvene zu gewährleisten. Die Messungen erfolgten in ruhiger Umgebung immer zur gleichen Tageszeit mit jeweils drei Messzyklen von je zehn Einzelmessungen. Anschließend wurden die Mittelwerte bestimmt. Um valide Ergebnisse zu erhalten, wurden die Tiere zunächst an sieben aufeinanderfolgenden Tagen an die Messung gewöhnt. Die im Anschluss gewonnenen Mittelwerte der Messtage 8 – 10 wurden für die statistische Auswertung verwendet.

2.1.6 Messung der Endothelfunktion an isolierten murinen Aorten

Die Endothelfunktion der thorakalen Aorta von weiblichen *Has3^{-/-}*- und WT-Mäusen wurde im Organbad untersucht. Dazu wurde die thorakale Aorta entnommen, sorgfältig von adhärentem Gewebe und Blutresten befreit und in zwei 5 mm lange Ringe geschnitten. Diese Ringe wurden zwischen zwei Edelstahlhaken gespannt und im Organbad, gefüllt mit 10 mL Krebs-Henseleit-Puffer (Tabelle 1), platziert. Der untere Haken war fest im Organbad fixiert, der obere Haken an einen isometrischen Kraftaufnehmer angeschlossen. Der Nullwert der Vorspannung betrug 1 g. Das Organbad wurde konstant bei 37 °C gehalten und mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) begast. Veränderungen des Gefäßtonus wurden über einen Verstärker registriert und mit einem Flachbrettschreiber aufgezeichnet. Nach einer Äquilibrationsphase wurde zunächst die Funktionalität der Aortenringe durch Kontraktion mit 80 mM KCl (Merck KGaA, Darmstadt) überprüft.

Die Endothelfunktion der Aortenringe wurde durch kumulative Zugabe von Acetylcholin [0,01–10 µM] nach einer submaximalen Präkontraktion mit Phenylephrin [0,2 µM] untersucht.^{141, 142} Bei einer intakten Endothelfunktion wird nach Stimulation mit Acetylcholin Stickstoffmonoxid (NO) von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) freigesetzt, was eine Gefäßrelaxation bewirkt.

Die endothelunabhängige Gefäßrelaxation wurde durch Zugabe steigender Konzentrationen des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) [0,01–10 µM] untersucht, nach vorheriger Kontraktion mit Phenylephrin [10 µM].

Die Messung der Endothelfunktion wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tatsiana Suvorava unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Tabelle 1: Pufferzusammensetzungen.

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Krebs-Henseleit (modifiziert)	145,85 mM Natrium 5,87 mM Kalium 1,60 mM Calcium 1,18 mM Magnesium 127,14 mM Chlorid 25,00 mM Hydrogencarbonat 1,18 mM Dihydrogenphosphat 1,18 mM Sulfat 5,50 mM Glucose Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,05 eingestellt. Durch die Carbogenbegasung während des Organbadversuchs erhält der Puffer einen physiologischen pH-Wert von 7,4.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.7 Plasmapräparation

Blutproben wurden mittels Herzpunktion aus der rechten Kammer entnommen und mit 100 mM EDTA in isotonischer NaCl-Lösung antikoaguliert. Zur Plasmagewinnung wurden die Proben für 15 min bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei 15700 x g für 5 min zentrifugiert. Die Plasmaproben wurden aliquotiert und für spätere Analysen bei -20 °C gelagert.

2.1.8 Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die Blutglukosekonzentration wurde nach 6-stündiger Nahrungskarenz gemessen. Dazu wurde ein Blutstropfen durch einmaliges Anritzen der Schwanzvene gewonnen. Gemessen wurde in Dreifachbestimmung mit dem Blutzuckermessgerät Accu-Chek® Compact Plus (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz).

2.1.9 Probenentnahme und Aufbereitung für histologische Analysen

Die Versuchsgruppe zur Untersuchung der Neointimaentwicklung wurde zunächst mit Ketamin und Xylazin in ein tiefes Narkosestadium versetzt und mit Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) perfundiert. Dazu wurde der linke Herzventrikel mit einer Schmetterlingskanüle punktiert und das Gefäßsystem bei gleichmäßigem Höhendruck zunächst mit 5 mL PBS und dann mit 10 mL Roti®-Histofix 4 % perfundiert. Dabei schlägt das Herz aufgrund der tiefen Narkose noch. Um einen Überdruck im Gewebe zu vermeiden, wurden die Femoralarterien beidseitig mit einem Schnitt geöffnet, so dass ein Abfluss des Perfusats gewährleistet war. Anschließend wurde die linke Carotis sowie die rechte Carotis als Kontrollgefäß sorgfältig freigelegt und am Aortenbogen und der Bifurkation abgetrennt.

Für die Untersuchungen zur Atherosklerose wurden die Mäuse getötet und der Brustkorb geöffnet. Nach Entnahme der Blutprobe wurde auch hier, wie beschrieben, das Gefäßsystem perfundiert, um die fragilen atherosklerotischen Läsionen *in situ* zu fixieren. Die Aorta wurde grob von anhaftendem Gewebe befreit und die gesamte Aorta beginnend an den Abgängen der *Arteria femoralis* bis einschließlich des Aortenbogens herauspräpariert. Das Herz wurde vor dem Aortenbogen von der Aorta getrennt.

Die entnommenen Präparate wurden anschließend für 12 h bei 4 °C in Roti®-Histofix 4 % nachfixiert und bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden maschinell im Autotechnikon (Sakura Tissue Tek VIP, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für anschließende Färbungen wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar) 5 µm dicke serielle Gewebsschnitte erstellt. Damit sich die Schnitte während der Färbungen nicht von den Objektträgern lösen, wurden die Präparate vor der Lagerung für eine Stunde bei 60 °C hitzefixiert. Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger entparaffiniert, indem sie zunächst dreimal für 15 min in Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) und anschließend für jeweils 2 min mit absolutem Ethanol, 95 % (V/V) Ethanol und 70 % (V/V) Ethanol gewaschen wurden. Vor Beginn der Färbungen wurden die Schnitte zweimal für 5 min in PBS hydriert. Nach erfolgter Färbung wurde das Gewebe sofern nicht anders angegeben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % (V/V) Ethanol, 96 % (V/V) Ethanol, Ethanol absolut, für jeweils 2 min) sowie Roticlear® (5 min) behandelt und wasserfrei mit Roti®-Mount-Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt.

2.1.10 Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen

Fünf Tage nach Ligatur der *Arteria carotis communis* wurden die Tiere mit CO₂ getötet und das Fell mit Isopropanol 70 % (V/V) desinfiziert. Für die Präparation wurde RNase freies Besteck verwendet. Um Blutreste zu entfernen, wurde die *Arteria femoralis* beidseitig durchtrennt und 1 mL steriles PBS langsam in den linken Herzventrikel injiziert. Im Anschluss wurde zügig die linke und rechte Carotis jeweils am Aortenbogen und hinter der Carotisbifurkation durchtrennt und in RNAlater® (Qiagen, Hilden) überführt. Unter vollständiger Bedeckung mit RNAlater® wurde adhärentes Wundgewebe sorgfältig entfernt. Anschließend wurden die Proben aus RNAlater® genommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2 Histologie

2.2.1 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie

Tabelle 2: Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ pH7,4	
Trispuffer TB	50 mM Tris-HCl, pH 7,6	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blockierlösung	20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl 10 % FCS 1 % bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1 % BSA-Lösung	1 g BSA in 100 mL PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3 % H ₂ O ₂ in PBS	10 mL 30 % H ₂ O ₂ 90 mL PBS	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaunlösung	Hämalaunlösung, sauer nach Meyer, gebrauchsfertig	Merck KGaA, Darmstadt
0,1 % Eosin-Lösung	0,1 g Eosin Y Dinatrium-Salz 0,05 g Eisessig in 100 mL Aqua dest.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Picro-Siriusrot-Lösung	0,1g Siriusrot (Direkt Rot 80) in 100 mL 1,2 % (m/V) Pikrinsäurelösung	Fluka, Buchs, Schweiz Waldeck GmbH & Co KG Münster
Coelestinblau-Lösung	5 g Ammoniumeisen-III-sulfat 100 mL Aqua dest. 0,5 g Coelestinblau 14 mL Glycerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ölrot O-Lösung	35 mL 0,5 %-ige Ölrot O-Lösung in Methanol 10 mL 1 M NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Merck KGaA, Darmstadt

2.2.2 Histochemische Färbungen

2.2.2.1 *En face* Färbung der Aorta

Zur Untersuchung lipidreicher atherosklerotischer Läsionen wurden die entnommenen Aorten im Ganzen mit dem Azofarbstoff Ölrot O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) behandelt. Dieser Farbstoff färbt Lipide rot an. Zunächst wurde unter dem Stereomikroskop anhaftendes periaortales Fettgewebe sorgfältig entfernt. Nach einem fünfminütigen Waschschrift in 78 % (V/V) Methanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) wurden die fixierten Aorten für 90 min in der Ölrot O Färbelösung inkubiert. Für die Ölrot O Färbelösung wurden 35 mL einer 0,5 % (m/V) Ölrot O-Methanollösung mit 10 mL 0,1 M NaOH gemischt. Nach der Färbung wurden die Präparate erneut mit 78 % (V/V) Methanol gewaschen, um nicht eingelagerten Farbstoff zu entfernen. Auf einer Durchlichtquelle wurden die aufgeschnittenen Aorten anschließend mit einem Stereomikroskop der Firma Zeiss (Stemi 2000C, Carl Zeiss AG, Oberkochen) und angeschlossener Kamera (Canon Power Shot G6, Canon inc., Tokio, Japan) fotografiert.

2.2.2.2 Hämatoxylin und Eosin

Um eine Übersicht der Morphologie der Gewebsschnitte zu erhalten, wurden die Präparate mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) angefärbt. Der Farbstoff Hämatoxylin bindet nach Oxidation zum Hämalan an basophile Strukturen, wie die DNA des Zellkerns. Die organische Säure Eosin hingegen färbt azidophile Strukturen wie Proteine des Zytoplasmas. Nach Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe wurden zunächst die Kerne mit Hämalan-Lösung nach Meyer (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt. Nach kurzer Behandlung mit 0,1 % (V/V) HCl (Merck KGaA, Darmstadt) und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min wurden die Schnitte mit einer 1 % (m/V) Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefärbt.

2.2.2.3 Kollagen

Zur Darstellung des kollagenreichen Bindegewebes wurde die Picro-Sirusrot Färbung nach Puchtler *et al.* verwendet.¹⁴³ Kernfärbung erfolgte mit Coelestinblau-Lösung. Kollagenreiche Strukturen des Gewebes färben sich durch den Polyazofarbstoff rot, das Parenchym gelb. Die Betrachtung der Färbung unter polarisiertem Licht gibt Aufschluss über die Dichte der Faseranordnung. Locker angeordnete Fasern erscheinen grün, dicht angeordnete leuchten rot.

2.2.3 Immunhistochemische und affinitätshistochemische Färbungen

Paraffinschnitte wurden zunächst rehydriert und im Anschluss für 1 h in BSA-haltiger Blockierlösung (siehe Tabelle 2) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zur Markierung der Antigene wurden die histologischen Schnitte für 12 h bei 4 °C mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mit den

in Tabelle 3 angegebenen Verdünnungen in 1 % BSA in PBS. Als Negativkontrolle wurde ein konsekutiver Schnitt nur mit 1 % BSA in PBS behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den in Tabelle 3 angegebenen Sekundärantikörpern. Für die Detektion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Zytomed, Berlin) wurden Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Zweitantikörper verwendet. Diese Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion mit DAB, die ein bräunliches Signal ergibt. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte vor Detektion in 3 % H₂O₂ in PBS inkubiert. Bei DAB-Färbungen erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun-Lösung. Mit DAB gefärbte Schnitte wurden wasserfrei mit Roti®-Mount-Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt. Alternativ wurden auch Zweitantikörper verwendet, die direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Der Fluoreszenzfarbstoff zur Kernfärbung war hier direkt in das Eindeckmedium Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) integriert.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper und Bindeproteine für histochemische Färbungen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Biotinyliertes HA-Bindeprotein	Rind	1:200	Calbiochem, Merck KGaA, Deutschland
Streptavidin, HRP-konjugiert	<i>Streptomyces avidinii</i>	1:200	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, s5512
anti-BrdU	Ratte	1:50	abcam, Cambridge, Großbritannien, ab6326 (BU1/75 (ICR1))
Rhodamine Red™-X	Esel	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA
anti-alpha-Glattmuskelaktin	Kaninchen	1:200	abcam, Cambridge, Großbritannien, ab5694
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-2004
anti-Mac-2 (Galectin-3)	Ratte (IgG2a)	1:600	Cedarlane, Burlington, Canada CL8942AP
anti-Ratte-IgG2a	Ziege	1:100	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, NB7126

2.2.3.1 Hyaluronsäure

HA wurde mit einer affinitätshistochemischen Färbung detektiert, bei der ein biotinyliertes HA-Bindeprotein verwendet wurde. Die Detektion erfolgte mittels HRP-konjugiertem Streptavidin, einem Protein, das eine nicht-kovalente Bindung mit Biotin eingeht. Um ein spezifisches Signal zu erzielen, mussten zunächst die endogenen Biotin-Strukturen blockiert

werden. Hierzu wurde ein Avidin-Biotin-Blockiersystem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerprotokoll benutzt. Die Detektion erfolgte mit DAB.

2.2.3.2 Makrophagen

Immunhistochemische Färbung mit DAB wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.2.3.3 Alpha-Glattmuskelaktin

Immunhistochemische Färbung mit DAB wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.2.3.4 Proliferation

Proliferierende Zellen wurden mit einer immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung detektiert. Dazu wurde den Tieren 18 h und 1 h vor Probenentnahme der Antimetabolit 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU [50 mg/kg KG], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i.p. injiziert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das bei der Zellteilung in neu synthetisierte DNA aufgenommen wird. Mittels immunhistochemischer Antikörper gegen BrdU können proliferierende Zellen detektiert werden.¹⁴⁴ Durch die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin können Quervernetzungen die Epitope der Antigene maskieren. Daher wurden die Schnitte zunächst für 25 min in Zitratpuffer (pH 6, Zytomed, Berlin) gekocht, um eine bessere bzw. spezifischere Bindung des Primärantikörpers an das Antigen zu erreichen. Um den Zellkern aufzuschließen, wurden die Schnitte vor Inkubation mit dem Primärantikörper für 15 min mit einer 0,5 %igen (V/V) Triton-X-100 Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS behandelt. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) angefärbt. Die Proliferationsrate wurde als Verhältnis der BrdU-positiven Nuklei zur Gesamtanzahl der Zellkerne in der Neointima dargestellt. Die Auswertung erfolgte manuell.

2.2.3.5 Apoptose

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit TMR-Red* der Firma Roche Diagnostics, Basel, Schweiz verwendet. Dieses Kit basiert auf der TUNEL-Methode (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), bei der DNA-Strangbrüche, die während der Apoptose entstehen, mit einer Fluoreszenzfärbung markiert werden. Dazu wurden Paraffinschnitte zunächst mit Proteinase K [5 µg/mL] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vorbehandelt und anschließend nach Herstellerprotokoll gefärbt. Um unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren, wurde die Enzym-Lösung 1:3 mit TUNEL-Verdünnungspuffer (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) verdünnt. Die Auswertung erfolgte manuell. Dabei wurden die TUNEL-positiven Zellkerne als Verhältnis zur Gesamtzellkernzahl bestimmt. Es wurden ausschließlich TUNEL-positive Zellen gewertet, die mit einem DAPI-Signal kolokalisiert waren.¹⁴⁵

2.2.4 Aufnahme und Auswertung der Färbungen

2.2.4.1 Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen

Alle lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem AxioImager.M2 Mikroskop mit AxioCam und der AxioVS40V 4.8.2.0 Software (alles von Carl Zeiss AG, Oberkochen) in den angegebenen Vergrößerungen durchgeführt. Ein Polarisationsfilter wurde verwendet, um die Packungsdichte der Kollagenfasern in den Siriusrot gefärbten Plaques des Aortenursprungs darzustellen.

2.2.4.2 Morphometrische Analyse der Neointimahyperplasie

Von der Ligatur aus betrachtet nimmt die Dicke der gebildeten Neointima kontinuierlich ab, so dass eine morphometrische Analyse an verschiedenen Stellen erforderlich ist (Abbildung 7). Die Carotiden wurden senkrecht in Paraffin eingebettet und konsekutiv mit einer Schichtdicke von 5 μm über 1000 μm proximal zur Ligatur geschnitten. Als Referenzpunkt dient der erste Schnitt nach der Ligatur, der frei von Nahtmaterial ist. Morphometrische Untersuchungen wurden 28 Tage nach Carotisligatur durchgeführt. Hierzu wurde alle 50 μm ein Schnitt mit H&E gefärbt und morphometrisch die Fläche der Media, der Neointima und des Lumens sowie die Gefäßgröße (Umfang der *Lamina elastica externa*, LEE) bestimmt (AxioVision Software, Carl Zeiss AG, Oberkochen). Die Fläche unter der Kurve (AUC), die die Neointimafläche aufgetragen gegen die Distanz zum Referenzpunkt beschreibt, sowie das mittlere Verhältnis der Neointimafläche zur Mediafläche wurden verwendet, um das Ausmaß der Neointimahyperplasie zwischen den *Has3*^{-/-} und den entsprechenden Kontrolltieren zu vergleichen.

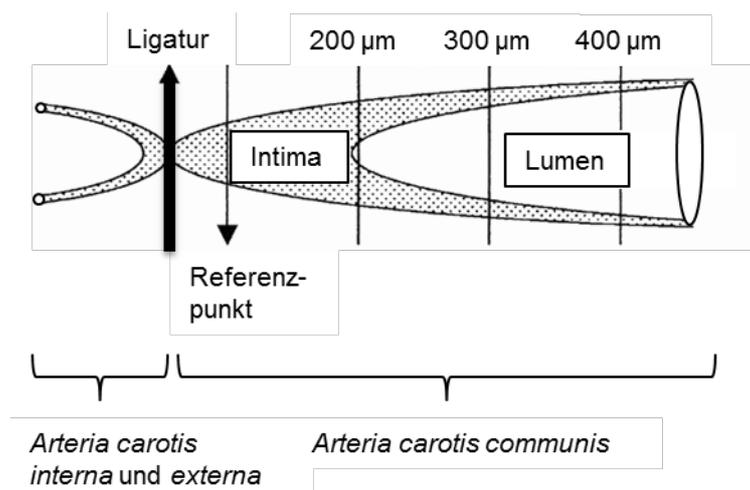


Abbildung 7: Schematische Übersicht der Neointimahyperplasie entlang der *A. carotis communis* nach Carotisligatur.

Modifiziert nach de Waard *et al.* 2002.¹⁴⁶

2.2.4.3 Bestimmung der Plaquegröße am Aortenursprung

Um das Ausmaß der Atherosklerose zu bestimmen, wurde die Fläche der atherosklerotischen Läsionen in Querschnitten des Aortenursprungs ermittelt. Drei Schnitte mit einem Abstand von 50 µm, alle mittig im Aortenursprung gelegen, wurden histologisch beurteilt und die Fläche des gesamten Aortenursprungs sowie die Fläche der atherosklerotischen Plaques an allen drei Aortenklappen mit der AxioVision Software (Carl Zeiss AG, Oberkochen) vermessen. Die *Lamina elastica interna* und das Gefäßlumen stellten dabei die äußeren Begrenzungen der Läsionen dar. Die Plaquegröße berechnet sich aus der Summe der drei Plaqueflächen an den Aortenklappen relativ zur Gesamtgefäßfläche des Aortenursprungs luminal zur *Lamina elastica interna*. Die normalisierte Plaquefläche wurde in drei Schnittebenen untersucht und gemittelt.

2.2.4.4 Größe des nekrotischen Kerns und der fibrotischen Kappe

Die Fläche der nekrotischen Areale sowie die fibrotische Kappe wurden an H&E-gefärbten Plaques des Aortenursprungs gemessen. Der nekrotische Kern wurde als zellkernfreie Flächen in der atherosklerotischen Läsion definiert und mit der AxioVision Software (Carl Zeiss AG, Oberkochen) vermessen. Flächen unter 3000 µm² wurden ausgeschlossen, da diese häufig in H&E-Färbungen beobachtet werden und es unwahrscheinlich ist, dass es sich um nekrotische Areale handelt. Die Summe aller nekrotischen Flächen wurde pro Ursprung ermittelt.¹⁴⁵

Die Dicke der fibrotischen Kappe wurde am größten nekrotischen Areal eines jeden Aortenursprungs bestimmt. Dazu wurde der Abstand von der äußeren Kappe des Plaques zum nekrotischen Kern gemessen.¹⁴⁵

2.2.4.5 Quantitative Auswertungen der Färbungen

Für die quantitative Auswertung der Farbsignale wurde die ImageJ 1.45s Software (National Institutes of health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. Das Zusatzprogramm *Colour deconvolution* (<http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>) ermöglicht, die Färbungen in verschiedene Farbkanäle zu trennen und die einzelnen Farbsignale, z. B. Kernfärbung und Zielstruktur, einzeln auszuwerten. Mindestens drei Bilder einer Färbung wurden betrachtet, um einen Schwellenwert festzulegen, ab dem das Signal einer Färbung als spezifisch angesehen wurde. So konnte der Einfluss von Hintergrundsignal minimiert werden. Der Schwellenwert wurde für alle Schnitte einer Färbung konstant gehalten. Das zu untersuchende Bildareal wurde manuell markiert und die Fläche, die positiv für das angefärbte Antigen ist, als prozentualer Wert dieser Fläche dargestellt (*Area fraction*).

2.3 Protein- und Lipoproteinanalytik

2.3.1 Multiplex Analyse zirkulierender Zytokine und Chemokine

Die Plasmakonzentrationen zirkulierender Zyto- und Chemokine wurden mit dem *Bio-Plex® Multiplex Immunoassay System*, einer kommerziell erhältlichen Multiplexanalyse der Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA), bestimmt. Diese Testmethode ermöglicht eine Vielzahl an Analyten in einer geringen Probenmenge gleichzeitig zu bestimmen. Unter Verwendung des *Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assays* (Bio-Rad Laboratories Inc.) wurden Interleukin (IL)-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17a, Eotaxin, *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), Interferon γ (IFN- γ), *platelet-derived growth factor-inducible protein KC* (KC), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α , MIP-1 β , CCL-5 (RANTES) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) bestimmt. Zur Analyse wurde ein *Bioplex 200 suspension array System* (Bio-Rad Laboratories Inc.) nach Herstellerprotokoll verwendet. Proteinkonzentrationen wurden mit entsprechend optimierten Standardkurven durch die *Bio-Plex Manager Software* Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.) berechnet. Werte unterhalb der Detektionsgrenze wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Multiplex-Messungen wurden von Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum, Düsseldorf, durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung des Plasmacholesterins

Plasmaspiegel von Gesamtcholesterin, *Low-density-lipoprotein* (LDL), *Very-low-density-lipoprotein* (VLDL)- und *High-density-lipoprotein* (HDL)-Cholesterin wurden unter Verwendung des *HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit* (Biovision, Milpitas, CA, USA) nach Herstellerprotokoll bestimmt.

2.3.3 Endotheliale NO-Synthase (eNOS) Western-Blot

Die Analyse der Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erfolgte mittels Western-Blot-Methode. Dazu wurden thorakale Aorten von *Has3^{-/-}*- und WT-Mäusen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, homogenisiert und in Lysepuffer dispergiert. Die Proteinkonzentration der Aortenlysate wurde mit einer kalorimetischen Methode nach Bradford bestimmt.¹⁴⁷ Die Messung der Extinktion bei 595 nm erfolgte mit einem Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer, Beckman, Krefeld). Das Lysat wurde im Anschluss 1:1 mit Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Durch eine SDS-PAGE bei 140 V wurden die Proteine aufgetrennt. Mittels eines Semidry-Blot-Systems (Peglab, Erlangen) wurden die Proteine bei 90-100 mA auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 μ m, Roche

Diagnostics, Basel, Schweiz) übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu maskieren, wurde die PVDF Membran für 3 h in 6 % (m/V) Milchpulver in TBST blockiert. Die Membran wurde für 12 h bei 4 °C mit dem Primärantikörper gegen eNOS (1:1000 verdünnt in 1 % (m/V) Milchpulver in TBST, BD Biosciences, Maus, #610297, Franklin Lakes, NJ, USA) inkubiert. Als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen Aktin verwendet (1:5000 verdünnt, Kaninchen, A2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zur Detektion wurden Sekundärantikörper gekoppelt mit einem Infrarotfarbstoff verwendet (IRDye 800CW Ziege-anti-Maus IgG, IRDye 680RD Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1:5000, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Das LI-COR Odyssey Infrarot Bildgebungs-System (*application software version 3.0*, LI-COR) wurde zur Detektion und Quantifizierung verwendet. Die Western-Blot Analyse der eNOS wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tatsiana Suvorava unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Tabelle 4: Pufferzusammensetzungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	5 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2,5 mM Na ₂ P ₂ O ₄ 1 mM β-Glycerolphosphat 5 mM NaF 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid Proteaseinhibitoren (je 10 µg/mL Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin)
Probenpuffer	50 mM Tris-HCl 2 % (m/V) SDS 10 % (m/V) Glyzerin 0,005 % (m/V) Bromphenolblau 120 µl β-Mercaptoethanol + 880 µl Puffer
TBST pH = 7,6	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween® 20

2.3.4 Oxyblot™

Das Oxyblot™-System (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) wurde nach Herstellerangaben verwendet, um Proteinmodifikationen, bedingt durch oxidative Reaktionen in Lysaten thorakaler *Has3^{-/-}*- und WT-Aorten, mittels Immunblots zu detektieren. Das LI-COR Odyssey Infrarot-Bildgebungs-System (*application software version 3.0*, LI-COR) wurde zur Detektion und Quantifizierung verwendet.

2.4 Zellversuche

2.4.1 Kultur humaner koronararterieller Glattmuskelzellen

Für *in vitro* Versuche wurden humane koronararterielle Gefäßmuskelzellen (CaSMC) der Firma PromoCell GmbH (Heidelberg) verwendet. Als Haltungsmedium wurde *Smooth Muscle Cell Growth Medium-2* (PromoCell) mit 5 % (V/V) FCS nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid kultiviert. Zellen zwischen Passage 3 und 9 wurden für Versuche verwendet. Um den Zellzyklus zu synchronisieren, wurden die Zellen vor den Versuchen für 48 h in serumfreiem *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g Glucose und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.4.2 Lentivirale Herabregulation der *HAS3*

Die humane *HAS3v1* und *HAS3v3* (codieren beide für *HAS3a*) wurde in humanen CaSMC mit Hilfe des *Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit* (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) nach Herstellerangaben herabreguliert. Zielsequenz war 5´-AGTGGCTCTACAACTCTCT-3´ (HSH008725-4-HIV-H1). Als Kontrolle diente sh scr (CSHCTR001-HIVH1).

2.4.3 Migration

Um die Fähigkeit der CaSMC zur Migration zu untersuchen, wurde eine modifizierte Boydenkammer verwendet.¹⁴⁸ Eine Polycarbonat-Membran (Porengröße 10 µm, NeuroProbe, Cabin John, MD, USA) wurde nach Herstellerangaben mit Kollagen Typ-I beschichtet (PureCol®, *Bovine Collagen Solution, Type I*, SanDiego, CA, USA). Die unteren Kammern der Microchemotaxiskammer (*48-well micro chemotaxis chamber*, NeuroProbe) wurden mit DMEM mit oder ohne PDGF-BB [10 ng/mL] Stimulanz befüllt und luftblasenfrei mit der Membran bedeckt. CaSMC wurden trypsiniert, in Serum-freiem DMEM resuspendiert und mit 250000-333333 Zellen/cm² in die oberen Löcher der Kammer ausgesät. Die Zellen konnten für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ migrieren und wurden dann für 5 min in Methanol fixiert. Die migrierten Zellen wurden mit *Coomassie brilliant blue G-250* angefärbt. Das LI-COR Odyssey Infrarot Bildgebungs-System (*application software version 3.0*, LI-COR) wurde zur Detektion und Quantifizierung verwendet.

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 RNA-Isolation und reverse Transkription

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolge mit der Phenol-Chloroform-Methode.¹⁴⁹ Zur Lyse der untersuchten Zellen bzw. des untersuchten Gewebes wurde je 1 mL TriFast™-Reagenz (peqGOLD TriFast™, PEQLAB GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben verwendet. Gewebeproben wurden zunächst in TriFast™-Reagenz mechanisch mit Hilfe des

gentleMACS™ Dissociator (miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) zerkleinert. Nach Lyse wurde die Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation bei 15.700 x g für 15 min wurde die wässrige Phase abgenommen und zu gleichen Teilen mit Isopropanol (VWR Chemicals) versetzt. Die Gesamt-RNA wurde für 12 h bei -20 °C gefällt. Zur Aufreinigung wurde das RNA-Pellet in 75 % (V/V) Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die so erhaltene RNA wurde je nach zu erwartender Ausbeute in 15 µl oder 20 µl RNase freiem Wasser (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) 5 min bei 65 °C unter Schütteln gelöst. Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorptionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mit einem Nanodrop-1000 (PEQLAB) fotometrisch bestimmt. 1 µg der Gesamt-RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben.

2.5.2 Quantitative Realtime-PCR

Die Expression der zu untersuchenden Zielgene wurde mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR) bestimmt. Dazu wurde das ABI 7300 Real-Time PCR System oder das StepOnePlus™ Real-Time-PCR System (beides Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Pro Reaktion wurde ein Ansatz mit Platinum®SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit ROX-Referenzfarbstoff, Primerlösung und cDNA-Lösung verwendet. Im Reaktionsansatz lagen die Primer in einer Konzentration von 0,625 µM vor, cDNA wurde in einer Konzentration von 2,083 ng/µL verwendet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung vermessen und der Mittelwert bestimmt. Lagen große Abweichungen zwischen den parallelen Ansätzen vor, so wurden die Werte von der Analyse ausgeschlossen. Eine Schmelzkurvenanalyse nach Beendigung der qPCR gab Aufschluss über die PCR-Bedingungen und über die Spezifität der Reaktion. Proben, die mehrere oder abweichende Maxima in der Schmelzkurvenanalyse zeigten, wurden ausgeschlossen. Zur Berechnung der relativen Genexpressionen wurde der C_q-Wert (*quantification cycle*) verwendet, der Wert an dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über einen Schwellenwert ansteigt. Als Referenzgen diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) oder *18S*. Die relative mRNA-Expression wurde bezogen auf das Referenzgen und zu Kontrollproben nach der Formel $2^{(-\Delta\Delta C_q)}$ berechnet.^{150, 151} Primersequenzen (siehe Tabelle 5) wurden aus der Literatur übernommen oder mit Hilfe Software Primer3Plus und NCBI-Primer-BLAST generiert.¹⁵²⁻¹⁵⁹ Die Oligonukleotide wurden über Invitrogen (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA) bezogen.

Tabelle 5: In der qPCR verwendete Primersequenzen.

Zielgen	Sequenz	Spezies
<i>GAPDH</i>	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'	human
<i>ACTN1</i>	5'-GCCCTAACTCAGAAGCGAAG-3' 5'-ACAGCTGGTCAATGGTCTCC-3'	human
<i>CD44</i>	5'-GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG-3' 5'-CGCAGATCGATTTGAATATAACC-3'	human
<i>CFL1</i>	5'-GCAAGAAGGAGGATCTGGTG-3' 5'-ACCTCCTCGTAGCAGTTTGC-3'	human
<i>COL1A1</i>	5'-CTGGCAAGAGTGGTGATCGT-3' 5'-ACCCTTTATGCCTCTGTCGC-3'	human
<i>COL3A1</i>	5'-AACACGCAAGGCTGTGAGACT-3' 5'-GCCAACGTCCACACCAAATT-3'	human
<i>HAS3</i>	5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3' 5'-CCCACTAATACTACTGCACAC-3'	human
<i>ITGA4</i>	5'-TGGACAATCTAAAGCACAGCA-3' 5'-GCACGTTTCAGGCTCATTTT-3'	human
<i>ITGB1</i>	5'-CCCTGAAAGTCCCAAGTGTCA-3' 5'-TCTACCAACACGCCCTTCATT-3'	human
<i>LYVE-1</i>	5'-ACTTCCATCTGGACCACGAG-3' 5'-ATGACACCTGGATGGAAAGC-3'	human
<i>MMP9</i>	5'-GGTGCCTTTGGACACGCACGA-3' 5'-GGCACTGCCAAAGCAGGACG-3'	human
<i>PDGF-B</i>	5'-CCGCTCCTTTGATGATCTCCA-3' 5'-CTTCTTCCACGAGCCAAGCT-3'	human
<i>PDGFRA</i>	5'-TGGGAGTTTCCAAGAGATGG-3' 5'-CCGTGGGTTTTAGCATCTTC-3'	human
<i>PDGFRB</i>	5'-TCTCAGGCCACGATGAAAGT-3' 5'-CATGATCTTCAGCTCCGACA-3'	human
<i>PXN</i>	5'-GGACTACCACAACCTCTTCTCC-3' 5'-GACCAAAGAAGGCTCCACAC-3'	human
<i>RHAMM</i>	5'-GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG-3' 5'-CCATCATACCCCTCATCTTTGTT-3'	human
<i>Gapdh</i>	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3' 5'-AAGATGGTGTGATGGGCTTCCCG-3'	murin

Zielgen	Sequenz	Spezies
<i>Acta2</i>	5'-CAGGCATGGATGGCATCAATCAC-3' 5'-ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTCG-3'	murin
<i>Cd44</i>	5'-GACCGGTTACCATAACTATTGTC-3' 5'-CATCGATGTCTTCTTGGTGTG-3'	murin
<i>Has1</i>	5'-TATGCTACCAAGTATACCTCG-3' 5'-TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC-3'	murin
<i>Has2</i>	5'-CAAAAATGGGGTGGAAAGAG-3' 5'-ACAGATGAGGCAGGGTCAAG-3'	murin
<i>Has3</i>	5'-CTCAGTGGACTACATCCAGG-3' 5'-GACATCTCCTCCAACACCTC-3'	murin
<i>Rhamm</i>	5'-GCAGAAGGAGGAGCAGAGTG-3' 5'-GGCGTGAGCAGCAATATGT-3'	murin
<i>SM22α</i>	5'-TCTAATGGCTTTGGGCAGTT-3' 5'-GCAGTTGGCTGTCTGTGAAG-3'	murin
<i>18S</i>	5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'	human/murin

2.5.3 Mikroarray Genexpressionsanalysen

Bei weiblichen 21 Wochen alten *Has3*^{-/-}-Mäusen und Kontrolltieren wurde fünf Tage nach Ligatur eine genomweite Transkriptionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die von adhärentem Gewebe befreiten linken und rechten Carotiden zunächst mit dem *GentleMACS*TM *Dissociator* (miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) zerkleinert und anschließend die Gesamt-RNA unter Verwendung des *RNeasy Microarray Tissue Kit* (Qiagen) isoliert. Die Qualität der RNA wurde in einer photometrischen Nanodrop Messung (Nanodrop ND2000, PEQLAB) und mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Alle Proben, die für den Gene Array verwendet wurden, zeigten RNA-Integritäts-Nummern (RIN) von hoher Qualität (mittlerer RIN Wert lag bei 7,6). Mit einer fluorimetrischen Qubit Messung wurde die RNA quantifiziert (Thermo Fisher Scientific). Zur Synthese Biotin-markierter cDNA wurde das *WT Plus Reagent Kit* der Firma Affymetrix nach Herstellerprotokoll verwendet (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Dazu wurden 100 ng Gesamt-RNA umgeschrieben. Nach Amplifikation durch *in vitro* Transkription und *2nd cycle* Synthese wurde die cDNA fragmentiert und durch eine terminale Transferase mit Biotin markiert. Diese terminal markierte cDNA wurde mit einem *Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Gene Expression Microarray* für 16 h bei 45 °C hybridisiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit einem Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugat und die Aufnahme nach dem Protokoll

des Herstellers. Die Datenanalyse der Affymetrix CEL Dateien wurde mit der Software GeneSprints GX (Version 12.5, Agilent Technologies) durchgeführt.¹⁶⁰ Die differentielle Geneexpression, im Vergleich ligiert gegen unligiert, wurde mit einem moderaten t-Test bestimmt. Die sich ergebenden p-Werte wurden mittels Benjamini-Hochberg-FDR auf multiples Testen korrigiert. Mittels Euklidischer Ähnlichkeitsmaße und des Ward-Verfahrens wurden hierarchische Clusteranalysen differentiell exprimierter Gene erstellt. Eine Analyse der differentiell regulierten Gene mit einem korrigierten p-Wert < 0,001 hinsichtlich funktioneller KEGG-Signalwege (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) erfolgte mit der DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) Software (Version 6.7).^{161, 162} Der Datensatz wurde im *National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus* hinterlegt (Zugangsnummer: GSE70410).

Die genomweite Transkriptionsanalyse wurde in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Köhrer von Herrn Dr. René Deenen durchgeführt.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche wurde mit der Graph PadPrism 6 Software Version 6.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Alle Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Werte für α unterhalb des Signifikanzniveaus p von 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Die Analyse der statistischen Signifikanz zwischen zwei Versuchsgruppen wurde mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test durchgeführt. Unterschiede zwischen mehr als zwei Datensätzen wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und nachfolgendem Dunnett-Test für multiple Vergleiche überprüft. Die qPCR-Daten nach Carotisligatur wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und des *post hoc* Tests nach Dunn verglichen. Das Körpergewicht unter Fütterung einer Western-Diät im Zeitverlauf wurde mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Um von einer Normalverteilung ausgehen zu können, wurden die qPCR Daten der *in vitro* Versuche für die parametrische Auswertung logarithmiert. Um statistische Ausreißer in den Stichproben zu identifizieren und von der Analyse auszuschließen, wurde der Ausreißertest nach Grubbs verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss einer *Has3*-Defizienz auf die Neointimahyperplasie nach Carotisligatur

Das Modell der Ligatur der *Arteria carotis communis* wurde verwendet, um zu untersuchen, welche Funktionen HAS3 auf die Ausbildung einer Neointima hat. Bei diesem von Kumar und Lindner 1997 erstmalig beschriebenen Mausmodell kommt es innerhalb weniger Wochen zur Neointimahyperplasie, getrieben vor allem durch migrierende und proliferierende VSMC.¹³⁸

3.1.1 Basale Charakteristika der *Has3*^{-/-}-Maus

Has3-defiziente Mäuse zeigten keine Entwicklungsstörungen und eine normale Überlebensrate. Für die folgenden Versuche wurden adulte Weibchen verwendet. Diese unterschieden sich im Körpergewicht nicht von WT-Kontrollen (Abbildung 8).

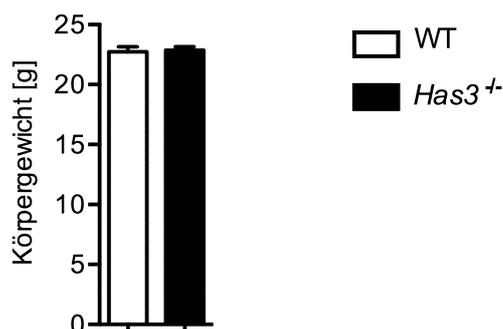


Abbildung 8: Körpergewicht.

Körpergewicht adulter Weibchen, gemessen am Ende des Untersuchungszeitraums. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 32, 35.

3.1.2 Morphometrische Analyse der Neointimabildung

Die Tiere wurden 28 Tage nach dem Eingriff für histologische und morphometrische Untersuchungen getötet und die ligierte *A. carotis communis sinistra* sowie die nicht ligierte *A. carotis communis dextra*, die als Kontrolle dient, entnommen. Über eine Länge von 1000 μ m wurde alle 50 μ m ein Schnitt mit H&E angefärbt, um zelluläre Strukturen sowie die Schichten der *Lamina elastica* darzustellen. Die *Lamina elastica interna* (LEI) grenzt die Zellen der neu gebildeten Neointima von den Zellen der Media ab. Als Referenzpunkt (0 μ m) diente der erste Schnitt nach dem Ligaturknoten, bei dem die Media nicht mehr durch Fadenreste verformt war. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, war 28 Tage nach Ligatur eine deutliche VSMC-reiche Neointima ausgebildet.

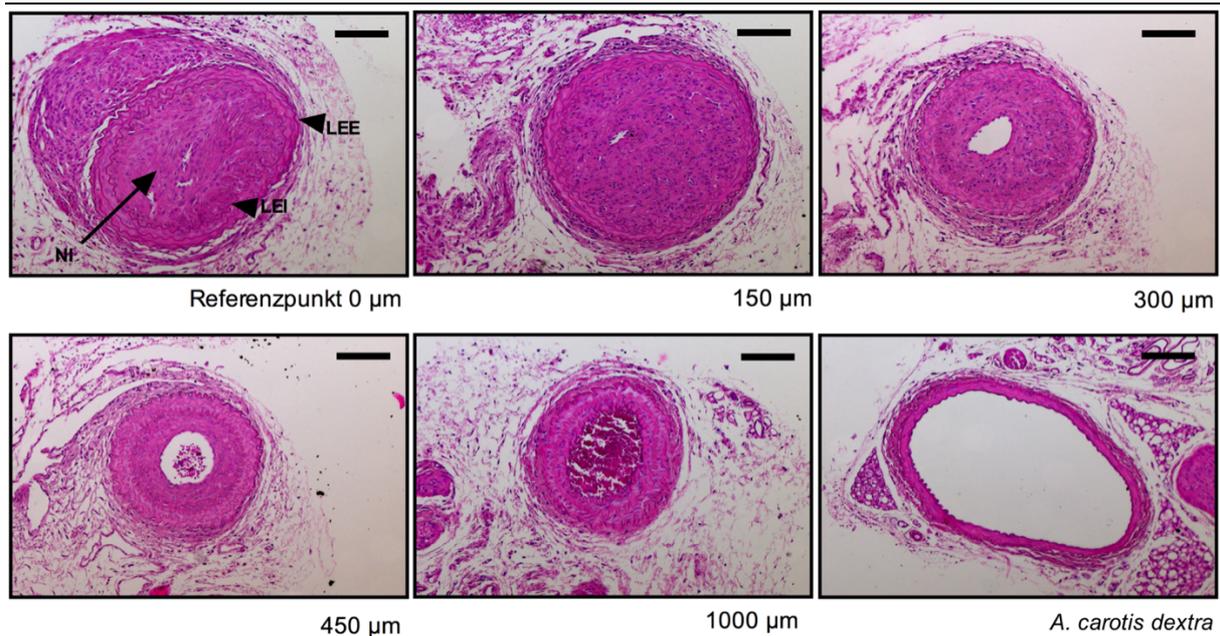


Abbildung 9: Übersicht der Neointimahyperplasie entlang der *A. carotis communis* mit zunehmendem Abstand zum Referenzpunkt.

Beispielhafte Aufnahmen einer H&E gefärbten *A. carotis sinistra* eines WT-Weibchens 28 Tage nach Ligatur. LEE, *Lamina elastica externa*, LEI, *Lamina elastica interna*, NI, Neointima. Der Referenzpunkt ist der erste Schnitt, in dem die Media frei von Nahtmaterial ist. Als unligierte Kontrolle ist die *A. carotis dextra* im Querschnitt dargestellt. 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm. Dargestellt sind für n = 9 repräsentative Aufnahmen.

In der morphometrischen Untersuchung konnte klar gezeigt werden, dass *Has3*-Defizienz vor Hyperplasie der Neointima nach Carotisligatur schützt. Wie in der repräsentativen H&E-Färbung 150 µm proximal zum Referenzpunkt deutlich zu erkennen, war in Carotiden von *Has3*-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT die Entwicklung der Neointima weniger stark ausgeprägt (Abbildung 10).

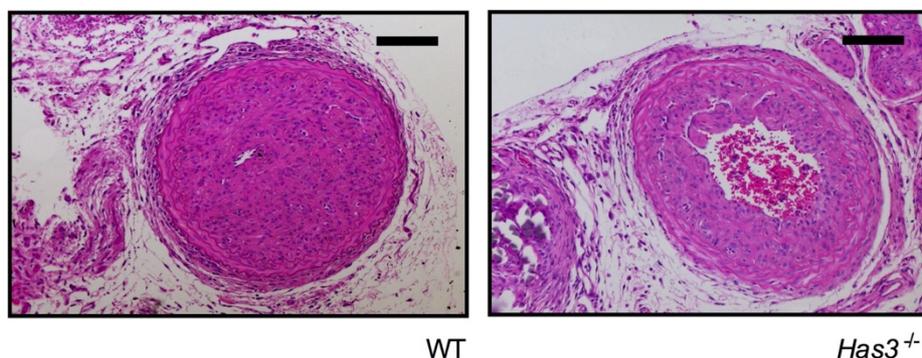


Abbildung 10: H&E-gefärbte Carotiden von *Has3*-defizienten und WT-Mäusen 28 Tage nach Ligatur.

Die Schnitte zeigen die Schnittebene 150 µm proximal zum Ligaturknoten; 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm. Dargestellt sind für n = 9 repräsentative Aufnahmen.

Die Fläche der Neointima wurde über 1000 μm proximal zum Referenzpunkt in 50 μm Intervallen quantifiziert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 11A dargestellt. Die Kurve beschreibt die Neointimafläche im Abstand zum Ligaturknoten und zeigt eine deutlich verringerte Neointimahyperplasie über den Verlauf der Gefäßverletzung in *Has3*-defizienten Carotiden im Vergleich zum WT. Die Fläche unter der Kurve (Abbildung 11B) zeigt eine Reduktion der Neointima um 41 % (WT: $2,587 \times 10^7 = 100\%$, *Has3*^{-/-}: $1,528 \times 10^7 = 59\%$).

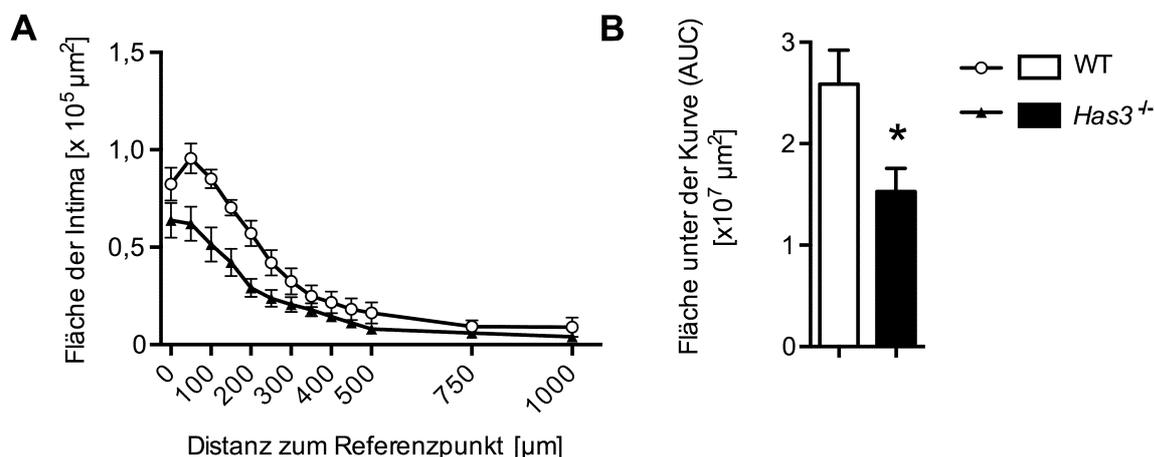


Abbildung 11: Vergleich der Neointimahyperplasie in *Has3*-defizienten und WT-Mäusen.

A, Entwicklung der Neointimafläche, untersucht vom Referenzpunkt bis 1000 μm proximal zur Ligatur. **B**, Fläche unter der Kurve; n = 9, dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, *p < 0,05 vs. WT.

Auch das Verhältnis von Neointima zu Media war in *Has3*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen deutlich reduziert (Abbildung 12A). Der äußere Gefäßumfang (Umfang der *Lamina elastica externa* (LEE)) war reduziert (Abbildung 12D), was auf ein konstriktives Remodelling hindeutet, allerdings war das mittlere Gefäßlumen unverändert (Abbildung 12C). Auch im Vergleich der mittleren Flächen der Media wurden keine Unterschiede beobachtet (Abbildung 12B). Als Kontrolle wurde auch die Morphologie der unligierten *A. carotis dextra* betrachtet. Diese zeigte in beiden Genotypen keine Gefäßveränderungen (Daten nicht gezeigt).

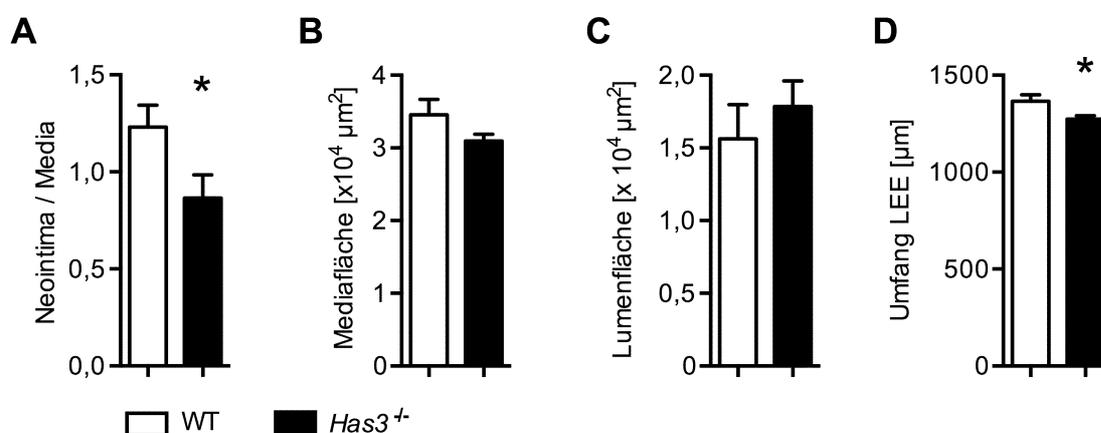


Abbildung 12: Morphometrische Parameter der ligierten *A. carotis communis* von *Has3*-defizienten und WT-Mäusen.

Angegeben sind die mittleren Werte über die ersten 1000 μm . **A**, Neointima Media Ratio **B**, Mediafläche **C**, Fläche des Gefäßlumens **D**, Umfang der LEE. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 9, *p < 0,05 vs. WT.

In *Has3*-defizienten Tieren nahm bei der Neointimaentwicklung im Vergleich zu WT sowohl die Zellzahl als auch die Extrazellulärmatrix proportional ab, wie die unveränderte Zelldichte zeigte (Abbildung 13).

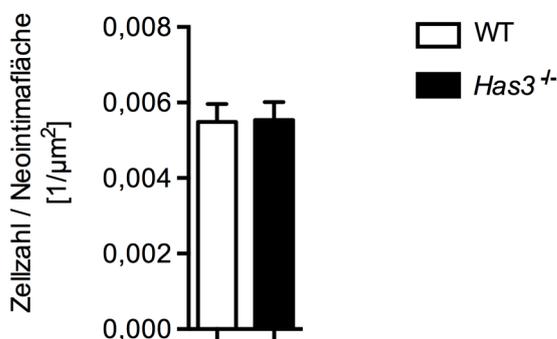


Abbildung 13: Zelldichte in der Neointima.

Nuklei pro Neointimafläche, dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 9.

3.1.3 Anreicherung von HA in der *Arteria carotis communis* nach Ligatur

Um zu untersuchen, wie sich die Defizienz der *Has3* auf die Akkumulation von HA in den durch Ligatur entstandenen Läsionen auswirkt, wurden die Carotiden 28 Tage nach Ligatur durch eine affinitätshistochemische Färbung mit HA-BP angefärbt.

Abbildung 14A zeigt die HA-BP Färbung eines unverletzten Gefäßes eines WT. Hier war die HA-Expression (braun) vornehmlich auf die Adventitia und die Glykokalyx des Endothels beschränkt. Nach Ligatur produzieren die Zellen vermehrt HA, vor allem im Bereich der neu gebildeten Intima, wie die Färbung einer ligierten WT-Carotis zeigt (Abbildung 14B). In Tieren mit einer genetischen Deletion von *Has3* war diese Anreicherung von HA vermindert, wie in der schwächeren Färbung für HA im Bereich der Neointima erkennbar ist (Abbildung 14C). Das Signal für HA wurde in ligierten Carotiden in der Neointima und der Media einzeln sowie gemeinsam in beiden Regionen quantifiziert (Abbildung 15). Die HA-Akkumulation war vor allem im Bereich der Media signifikant reduziert (Abbildung 15C).

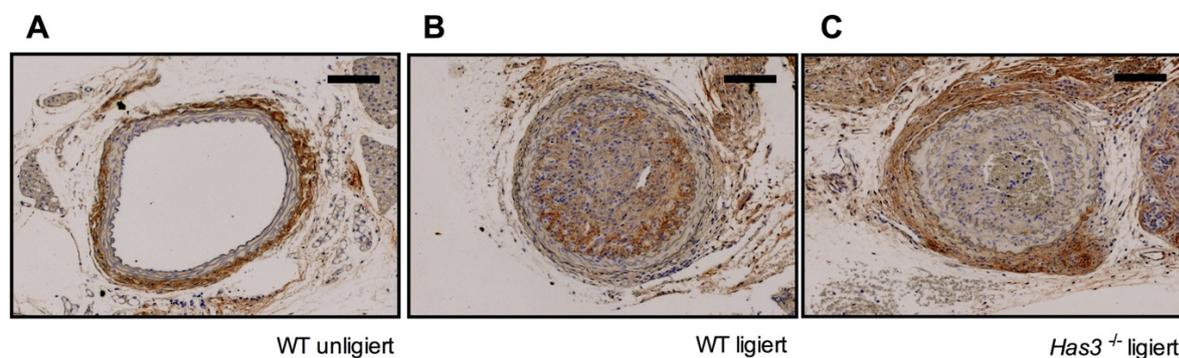


Abbildung 14: Hyaluronsäureakkumulation in der *A. carotis communis*.

Exemplarische Bilder von n = 9 mit HA-BP angefärbten Carotiden. **A**, Unligierte und **B**, ligierte *A. carotis communis* aus WT-Tieren, **C**, ligiertes Gefäß eines *Has3*-defizienten Tieres. 200-fache Vergrößerung, Maßstab balken 100 µm.

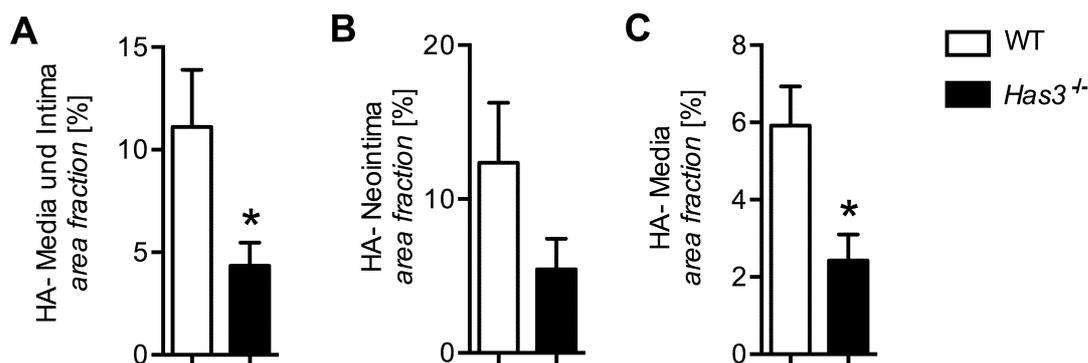


Abbildung 15: Quantifizierung der HA-Akkumulation in der *A. carotis communis* nach Carotisligatur.

Quantifizierung der für HA positiv gefärbten Bereiche (braun) in Neointima und Media (A), sowie in Neointima (B) und Media (C) separat. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 9$, * $p < 0,05$ vs. WT.

3.1.4 Genexpression der HAS-Isoformen nach Carotisligatur

Mittels qPCR wurde in Proben aus WT-Tieren die mRNA-Expression der *Has1*, -2 und -3 im Zeitverlauf nach Ligatur im Vergleich zu unligierten Kontrollen gemessen. Die Ergebnisse für *Has1* (Abbildung 16A) zeigen 5 Tage nach Ligatur einen deutlichen Anstieg der Genexpression um den Faktor 12 im Vergleich zu nicht operierten Gefäßen. Auch 14 Tage nach Ligatur war die Genexpression von *Has1* um den Faktor 12 signifikant erhöht. Analog zeigte das Isoenzym *Has2* ein ähnliches Regulationsprofil (Abbildung 16B). 5 Tage nach Ligatur war eine deutliche Hochregulation zu beobachten, auf das 7-fache der nicht ligierten Gefäße. Diese Hochregulation hielt nach 14 Tagen weiterhin an. Im Gegensatz dazu war die Genexpression der *Has3* 5 Tage nach Ligatur im Vergleich zu unligierten Kontrollen herabreguliert. Diese Reduktion war jedoch transient; die Genexpression war 14 Tage nach Ligatur wieder signifikant höher als 5 Tage nach Ligatur (Abbildung 16C).

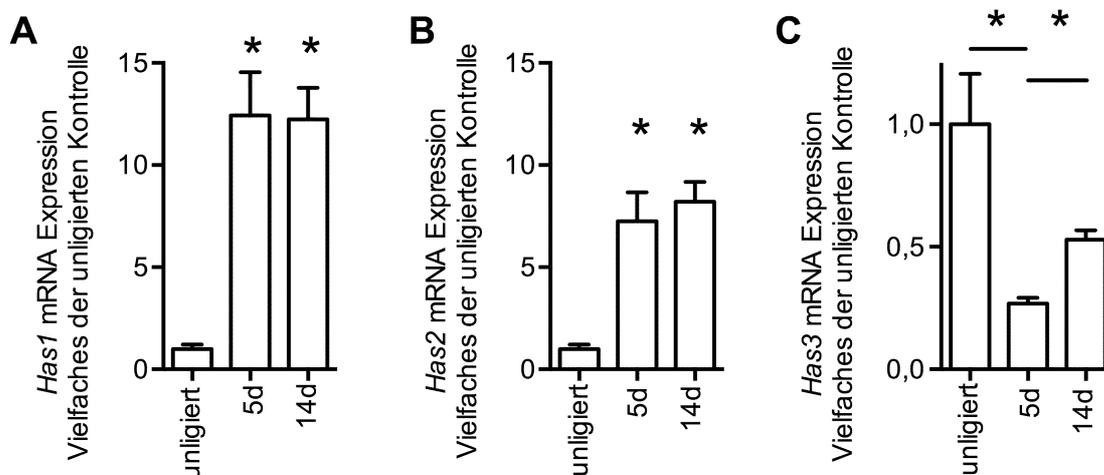


Abbildung 16: Genexpression der HAS-Enzyme nach Carotisligatur.

Die mRNA-Expression von *Has1* (A), *Has2* (B) und *Has3* (C) wurde in WT-Mäusen in unligierten Gefäßen, 5 Tage nach Ligatur und 14 Tage nach Ligatur, mittels qPCR untersucht. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7-9$, * $p < 0,05$, Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Test nach Dunn.

Es wurde keine kompensatorische Gegenregulation als Antwort auf die *Has3*-Defizienz beobachtet. *Has3*-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu WT-Tieren basal und 5 Tage nach Carotisligatur keinen Unterschied in der Genexpression von *Has1* oder *Has2* (Abbildung 17). In Proben *Has3*-defizienter Tiere war keine *Has3*-mRNA detektierbar (Daten nicht gezeigt).

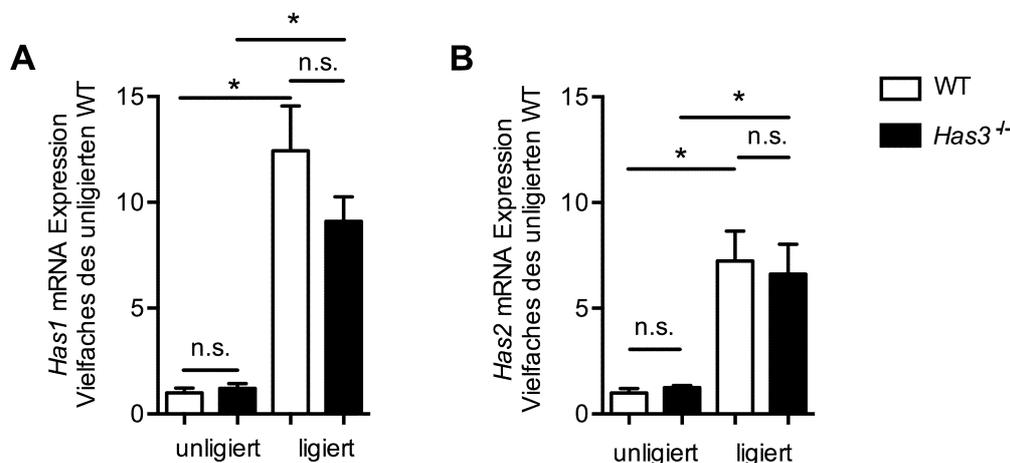


Abbildung 17: *Has1* und *Has2* mRNA-Expression in Carotiden *Has3*-defizienter Tiere.

Has1 (A) und *Has2* (B) Genexpression in *Has3*-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen, dargestellt relativ zur Genexpression im unligierten WT. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7-9$, n.s.: nicht signifikant, $*p < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen unligierten Kontroll-Carotis, Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Test nach Dunn.

3.1.5 Genexpression von *Cd44* und *Rhmm* nach Carotisligatur

Für die HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhmm* ist eine Funktion bei vaskulären Pathologien und bei der Wundheilung beschrieben.^{77, 129, 132, 133} Aus diesem Grund wurde deren mRNA-Expression in Carotiden *Has3*-defizienter und WT-Mäuse basal und 5 Tage nach Ligatur gemessen (Abbildung 18). In beiden Genotypen war nach Ligatur ein signifikanter Anstieg sowohl der mRNA-Expression von *Cd44* als auch von *Rhmm* zu beobachten. Es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen den verglichenen Genotypen.

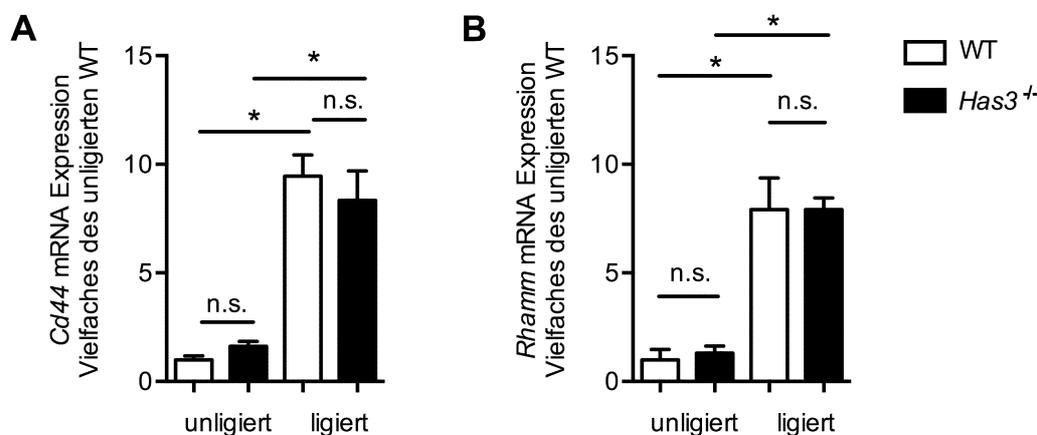


Abbildung 18: *Cd44* und *Rhmm* mRNA-Expression in Carotiden *Has3*-defizienter Tiere.

Cd44 (A) und *Rhmm* (B) Genexpression in *Has3*-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen, dargestellt relativ zur Genexpression im unligierten WT. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 8-11$, n.s.: nicht signifikant, $*p < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen unligierten Kontroll-Carotis, Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Test nach Dunn.

3.1.6 Differenzierungsgrad der VSMC

3.1.6.1 Genexpression von *Acta2* und *SM22 α* nach Carotisligatur

VSMC sind nicht terminal differenziert, sondern können als Antwort auf Veränderungen in ihrem lokalen Umfeld, z. B. nach Gefäßverletzung, ihren Phänotyp anpassen. Der dedifferenzierte Phänotyp der VSMC zeichnet sich durch eine erhöhte Proliferation, Migration und Synthese von EZM-Bestandteilen aus.¹² Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der VSMC-Differenzierung den beobachteten Phänotyp beeinflussen haben, wurden die mRNA-Expression der VSMC-Differenzierungsmarker *Acta2* und *SM22 α* 5 Tage nach Ligatur mittels qPCR untersucht (Abbildung 19). Es zeigte sich eine massive Herabregulation der VSMC-Differenzierungsmarker *Acta2* und *SM22 α* . Dies weist auf einen pro-migratorischen und pro-proliferativen Phänotyp der VSMC hin. Es war jedoch kein Unterschied im Ausmaß der Herabregulation zwischen den Genotypen zu beobachten.

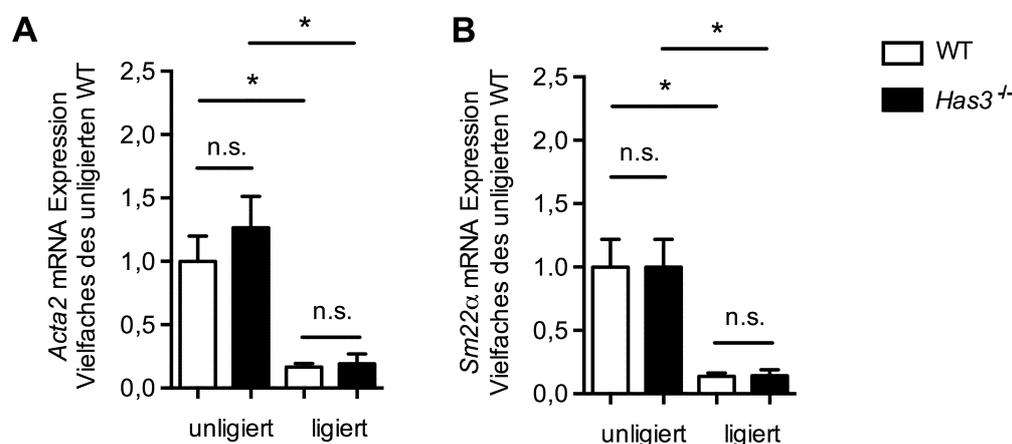


Abbildung 19: mRNA-Expression von VSMC-Differenzierungsmarkern nach Carotisligatur. *Acta2* (A) und *Sm22 α* (B) Genexpression in *Has3*-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen, dargestellt relativ zur Genexpression im unligierten WT. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 8–9, n.s.: nicht signifikant, *p < 0,05 im Vergleich zur jeweiligen unligierten Kontroll-Carotis analysiert unter Verwendung des Kruskal-Wallis Test mit einem *post hoc* Test nach Dunn.

3.1.6.2 Detektion glattmuskulärer Zellen in der Neointima

Im Anschluss wurden VSMC in der Neointima immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen alpha-Glattmuskelaktin angefärbt. Hier zeigte sich 28 Tage nach Ligatur ein deutliches Signal für alpha-Glattmuskelaktin im Bereich der Neointima (Abbildung 20A). Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt ein Großteil der VSMC in der Neointima bereits redifferenziert war. Die Quantifizierung alpha-Glattmuskelaktin-positiver Bereiche in der Neointima zeigte keine Unterschiede im Vergleich der *Has3*-defizienten Carotiden zu WT-Kontrollen (Abbildung 20B).

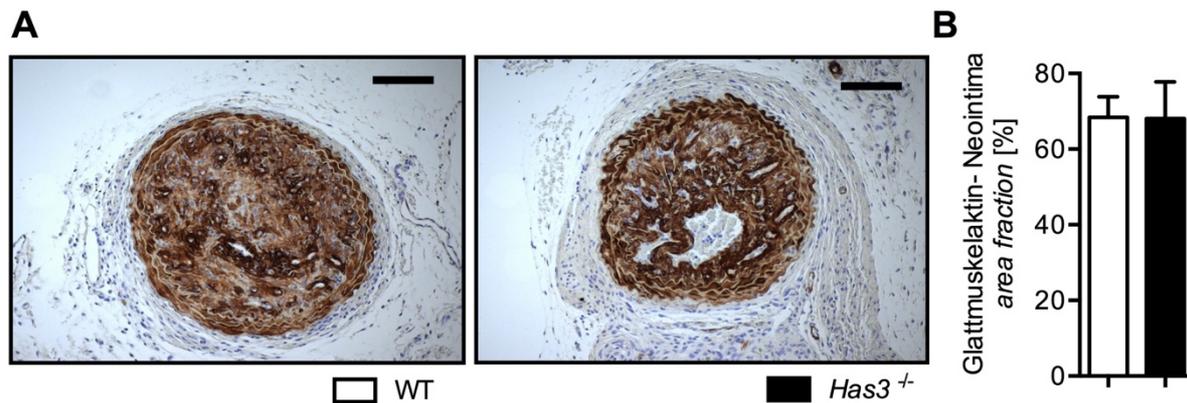


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von alpha-Glattmuskelaktin.

A, Beispielhafte Bilder einer alpha-Glattmuskelaktin-Färbung der *A. carotis communis* 28 d nach Ligatur, 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 μm . **B**, Quantifizierung der für alpha-Glattmuskelaktin positiv gefärbten Bereiche (braun) in der Neointima, dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 9, 8$.

3.1.7 Untersuchung der Proliferation und Apoptoseneigung

Während der Entstehung der Neointimahyperplasie kommt es zu einer vermehrten Proliferation von VSMC, die dann in das Gefäßlumen einwandern. Daher kam die Frage auf, inwiefern die beobachteten Unterschiede in der Neointimahyperplasie bei *Has3*-defizienten Tieren durch Unterschiede in der Proliferationsrate begründet sind. Für diesen Versuch wurden 5 Tage nach Ligatur Proben entnommen, da hier laut Kumar und Lindner ein großer Anteil proliferierender Zellen in Media und Intima zu beobachten ist.¹³⁸ Jeweils 18 h und 1 h vor der Probenentnahme wurde den Tieren das Thymidin-Analogon BrdU i.p. injiziert. BrdU wird bei DNA-Neubildung in die DNA inkorporiert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen BrdU konnten so proliferierende Zellkerne visualisiert werden (gelb, Abbildung 21A). Die Proliferationsrate in der Neointima wurde als Verhältnis der BrdU-positiven Kerne zur Gesamtzellkernzahl dargestellt (Abbildung 21B). Hier deutete sich lediglich ein Trend zu einer verminderten Proliferationsrate in der Neointima von *Has3*-defizienten Mäusen an, jedoch waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

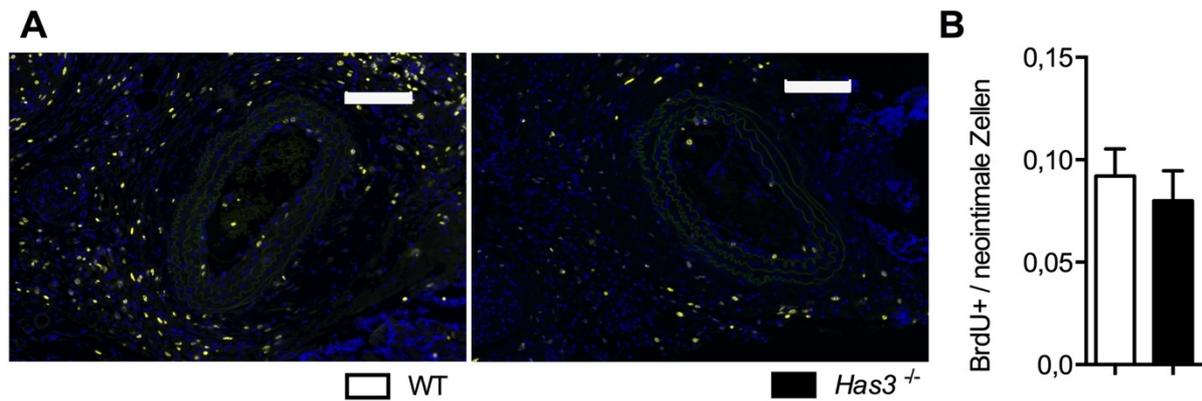


Abbildung 21: Proliferation

A, Exemplarische Bilder einer immunhistochemischen Färbung von inkorporiertem BrdU (gelb) 5 d nach Ligatur. In Grün erkennbar ist die Autofluoreszenz der *Lamina elastica* die der besseren Orientierung dient. Zellkerne sind blau dargestellt. 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. **B**, Die Proliferationsrate wurde bestimmt als das Verhältnis BrdU-positiver Zellkerne zur Gesamtzellkernzahl der Neointima; dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 11.

Als nächstes wurde die Apoptoserate der Zellen in der Neointima untersucht, um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp durch Unterschiede im programmierten Zelltod hervorgerufen wurde. Dies wurde mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit TMR-Red* der Firma Roche Diagnostics an Carotiden, die 5 Tage nach Ligatur entnommen wurden, durchgeführt. Dieses auf der TUNEL-Methode basierende Kit detektiert DNA-Strangbrüche, die bei der Apoptose entstehen. So werden Apoptose-positive Zellkerne im Gewebe mit einem Fluoreszenzfarbstoff rot markiert (Abbildung 22A). Die Apoptoserate in der Neointima (Abbildung 22B) war in *Has3*-defizienten Tieren nach Carotisligatur unverändert.

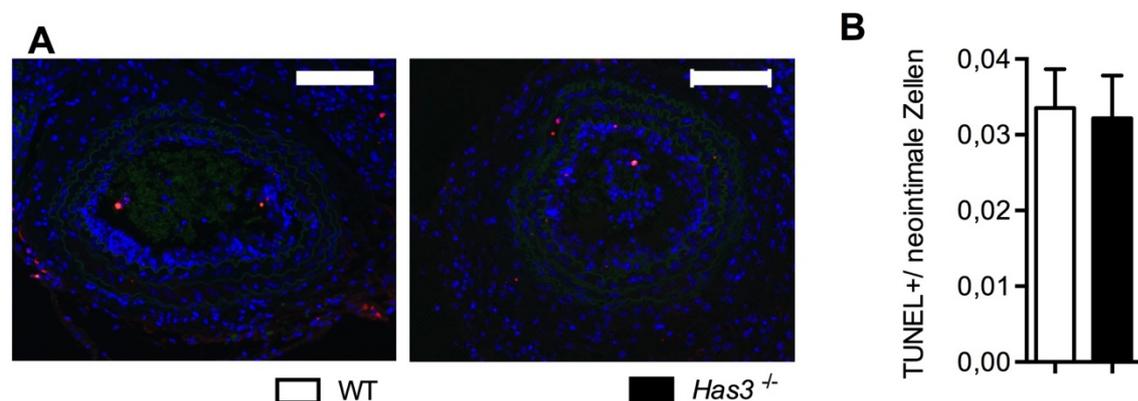


Abbildung 22: Apoptose.

A, Beispielbilder der TUNEL-Färbungen in murinen Carotiden. Apoptotische Zellkerne sind rot angefärbt, die *Lamina elastica* grün und die Zellkerne blau, 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. **B**, Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellkernzahl der Neointima, dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 13.

3.1.8 Analyse des Transkriptomts nach Carotisligatur

Um die zugrundeliegenden Mechanismen detaillierter aufzuschlüsseln, wurden Veränderungen des Transkriptomts in der Carotis nach Ligatur in beiden Genotypen genomweit mit einem Gene Array analysiert. Als Zeitpunkt der Probenentnahme für Untersuchungen der mRNA wurden 5 Tage nach Ligatur gewählt, da für diesen Zeitpunkt in der Literatur eine hohe Proliferationsrate beschrieben ist, während Einflüsse des invasiven Eingriffs selbst bereits abgeklungen sind.¹³⁸ In jedem Genotyp wurden die ligierten Carotiden mit unligierten Kontrollcarotiden verglichen. 8006 Transkripte waren in WT-Mäusen nach Carotisligatur differentiell im Vergleich zu unligierten Kontrollcarotiden reguliert (Abbildung 23). Auffällig war, dass in *Has3*-defizienten Mäusen unter gleichen experimentellen Bedingungen nur 3635 Transkripte durch die Ligatur beeinflusst waren. Dies weist auf eine deutlich abgemilderte transkriptionelle Antwort auf die Carotisligatur in *Has3*-defizienten Mäusen hin. Dies lässt sich auch in der hierarchischen Cluster Analyse und den *volcano plots* beobachten (Abbildung 24).

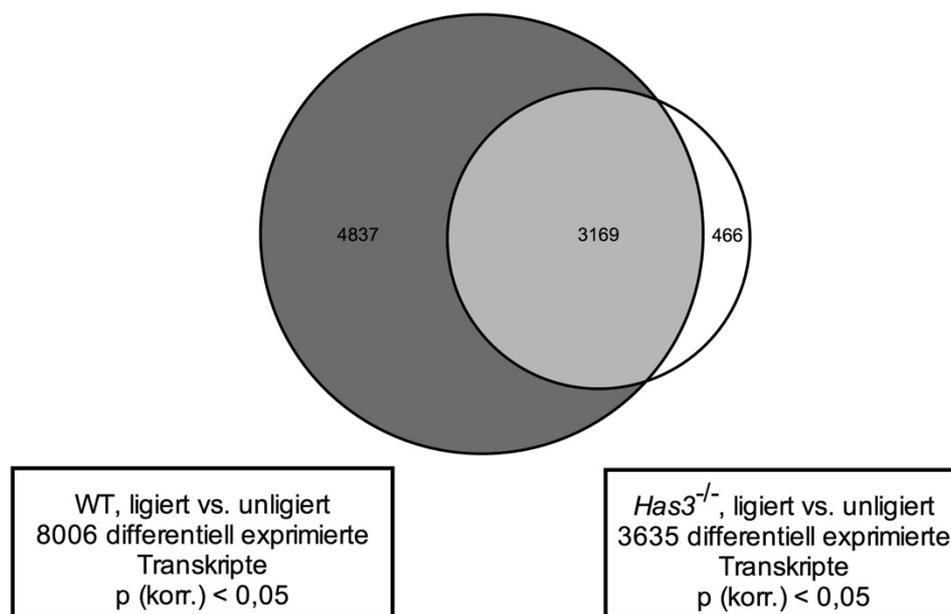


Abbildung 23: Gene Array–Venn-Diagramm.

Vergleich des Transkriptomts der ligierten Gefäße zu unligierten Kontrollen in *Has3*^{-/-}- und WT-Mäusen 5 Tage nach Carotisligatur. Das Genexpressionsprofil wurde mit einem genomweiten Microarray untersucht. Darstellung der Anzahl differentiell exprimierter Gene von *Has3*-defizienten und WT-Mäusen im Venn-Diagramm. Die Messung und Analyse des Gene Arrays erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Karl Köhrer und Herrn Dr. René Deenen am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die differentiell regulierten Transkripte wurden statistisch mit einem moderaten t-Test analysiert und mit Benjamini-Hochberg FDR auf multiples Testen korrigiert; n = 3, 4, p (korr.) < 0,05.

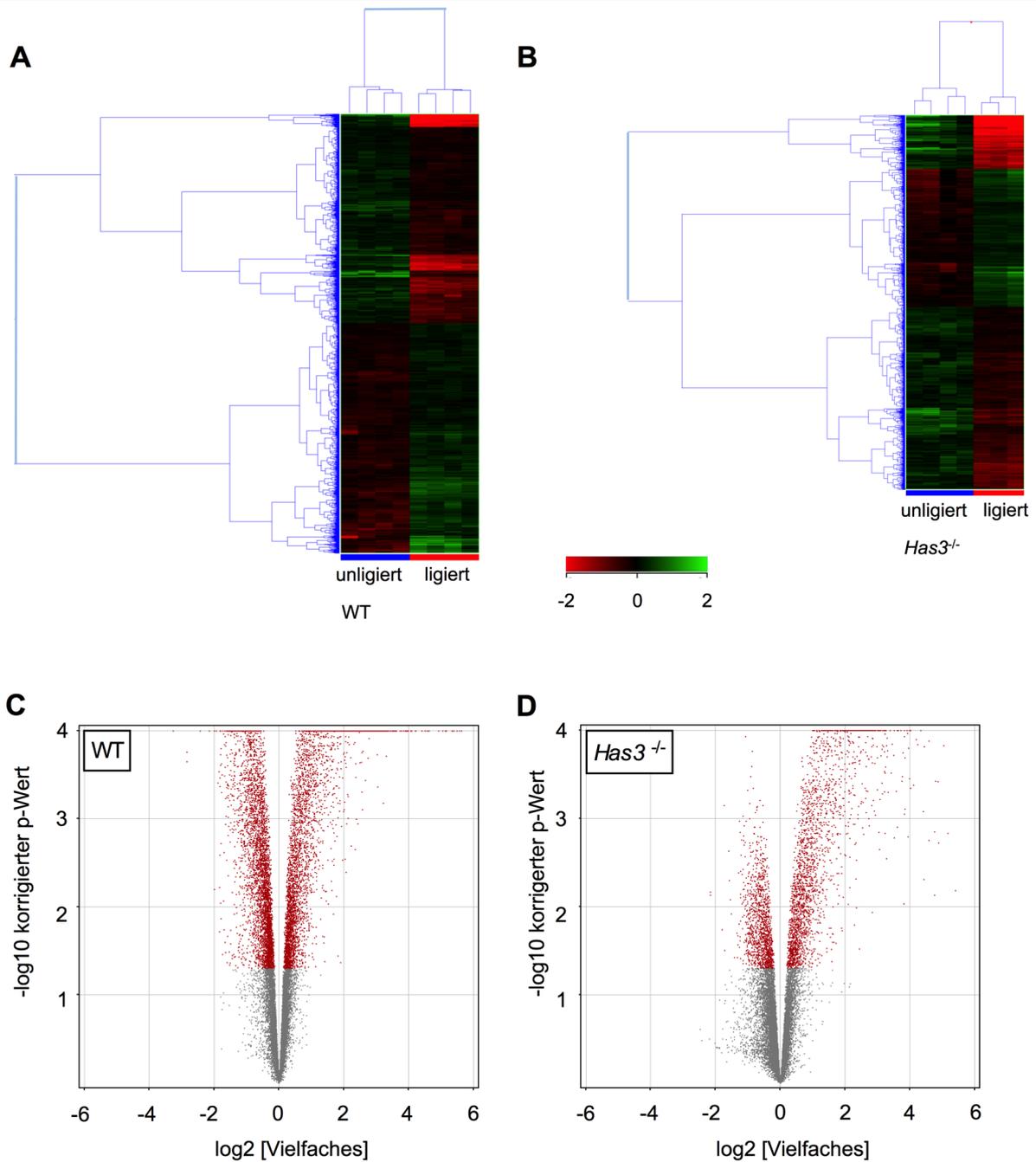


Abbildung 24: Gene Array–hierarchische Clusteranalyse und volcano plot.

A, B, Darstellung der Anzahl differentiell exprimierter Gene von WT (8006 Transkripte) und *Has3*-defizienten-Mäusen (3635 Transkripte) in einer hierarchischen Clusteranalyse. **C, D**, volcano plots zeigen das Vielfache der Regulationen und die Signifikanzniveaus der detektierten Gene. Signifikant regulierte Gene ($p(\text{korr.}) < 0,05$) sind in Rot dargestellt. Die differentiell regulierten Transkripte wurde statistisch mit einem moderaten t-Test analysiert und mit Benjamini-Hochberg FDR auf multiples Testen korrigiert, $n = 3, 4$, $p(\text{korr.}) < 0,05$.

3.1.9 Nach Carotisligatur regulierte KEGG-Signalwege

Die Datensätze der Gene Array Analyse wurden im Folgenden hinsichtlich der KEGG-Signalwege untersucht, die in Antwort auf Ligatur signifikant reguliert waren (p (korr.) $< 0,001$). In Tabelle 6 sind Signalwege dargestellt, die in beiden Genotypen nach Ligatur signifikant reguliert waren. Es handelt sich vornehmlich um Signalwege aus dem Bereich immunologischer Reaktionen, wie beispielsweise *Chemokin-Signalweg* (mmu04062), *Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion* (mmu04060), *transendotheliale Leukozytenmigration* (mmu04670) und *B-Lymphozytrezeptor-Signalweg* (mmu04662) sowie *Apoptose* (mmu04210). Eine Vielzahl an KEGG-Signalwegen waren ausschließlich in WT-Carotiden nicht aber in Gefäßen *Has3*-defizienter Mäuse nach Ligatur reguliert (Tabelle 7). Auffällig waren hier vor allem verschiedene Signalwege, die im Kontext des VSMC-Phänotyps und der EZM-Signalgebung stehen sowie allgemein Signalwege, die zu einem aktivierten Phänotyp führen. Dies waren beispielsweise *Regulation des Aktin-Zytoskeletts* (mmu04810), *VSMC-Kontraktion* (mmu04270), *Kalzium-Signalweg* (mmu04020), *fokale Adhäsion* (mmu04510), *EZM-Rezeptor-Interaktion* (mmu04512), *Phosphatidylinositol-Signalsystem* (mmu04070), *Inositolphosphat Metabolismus* (mmu00562) und *MAPK-Signalweg* (mmu04010). Diese Mechanismen, die mit einer phänotypischen Aktivierung von VSMC in Verbindung stehen, schienen in *Has3*-defizienten Mäusen abgemildert zu sein, was eine verminderte Migration der VSMC bewirken könnte.

Tabelle 6: KEGG-Signalwege reguliert in *Has3*-defizienten und WT-Mäusen.

Funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene ($n = 3, 4$, p (korr.) $< 0,001$) hinsichtlich der KEGG-Signalwege. Dargestellt sind die transkriptionellen Signalwege die sowohl in *Has3*^{-/-}- als auch in WT-Mäusen nach Ligatur reguliert waren.

Signalweg	angereicherter p-Wert
Lysosom	4,44E-09
Chemokin-Signalweg	1,30E-07
Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion	2,01E-07
Toll-ähnlicher Rezeptor Signalweg	2,37E-07
Fc gamma R-vermittelte Phagozytose	3,07E-07
Transendotheliale Leukozytenmigration	8,67E-07
B-Lymphozytrezeptor-Signalweg	1,69E-05
NOD-artiger Rezeptor-Signalweg	7,34E-05
Apoptose	1,94E-04
Jak-STAT-Signalweg	1,35E-03
Natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität	3,33E-03
Zytosolische DNA-detektierender Signalweg	4,83E-03
Fc Ypsilon RI Signalweg	9,02E-03
Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)	1,26E-02

Tabelle 7: KEGG-Signalwege ausschließlich reguliert in WT-Mäusen.

Funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene ($n = 4$, p (korr.) $< 0,001$) hinsichtlich der KEGG-Signalwege. Dargestellt sind die transkriptionellen Signalwege, die ausschließlich in WT nach Ligatur reguliert waren, nicht jedoch in *Has3*-defizienten Mäusen.

Signalweg	angereicherter p-Wert
Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	4,44E-09
Regulation des Aktin-Zytoskeletts	1,30E-07
Dilatierte Kardiomyopathie	2,01E-07
Fokale Adhäsion	2,37E-07
Hämatopoetische Zellabstammung	3,07E-07
EZM-Rezeptor-Interaktion	8,67E-07
Arrhythmogene rechts ventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)	1,69E-05
Axonale Wegfindung (<i>axon guidance</i>)	7,34E-05
VSMC-Kontraktion	1,94E-04
Tumor-Signalwege	1,35E-03
Phosphatidylinositol-Signalsystem	3,33E-03
Kalzium-Signalweg	4,83E-03
<i>Adherens Junction</i>	9,02E-03
MAPK-Signalweg	1,26E-02
Neurotrophin-Signalweg	1,35E-02
<i>Gap Junction</i>	1,46E-02
Virale Myokarditis	1,77E-02
Endozytose	1,96E-02
Langzeit-Potenzierung (Synapsen)	2,01E-02
Prionenerkrankungen	2,18E-02
Progesteron-vermittelte Eizellreifung	2,65E-02
Inositolphosphat Metabolismus	2,73E-02

Tabelle 8: KEGG-Signalwege ausschließlich reguliert in *Has3*-defizienten Mäusen.

Funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene ($n = 3$, p (korr.) $< 0,001$) hinsichtlich der KEGG-Signalwege. Dargestellt sind die transkriptionellen Signalwege, die ausschließlich in *Has3*-defizienten Carotiden nach Ligatur reguliert waren, nicht jedoch in WT-Mäusen.

Signalweg	angereicherter p-Wert
Systemischer <i>Lupus erythematoses</i>	1,30E-03
Graft-versus-Host-Reaktion	2,89E-03
Primäre Immundefizienz	3,70E-03
Komplement- und Koagulationskaskaden	4,23E-03
Intestinales Immunnetzwerk für IgA Produktion	7,40E-03
Asthma	4,96E-02

3.1.10 Charakterisierung des Entzündungsgeschehens nach Carotisligatur

3.1.10.1 Genexpression von *Il1b*, *Tnfa* und *Ccl2* nach Carotisligatur

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern der beobachtete Phänotyp durch Unterschiede in der Immunantwort begründet ist. Generell ist bei normal cholesterämischen Mäusen die Ausbildung einer Neointima nach Carotisligatur ein Modell, was vor allem durch Migration und Proliferation von VSMC getrieben wird.¹³⁸ Allerdings kommt es durch den Eingriff selbst zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die die Ausbildung einer Neointima beeinflussen kann. Daher wurden die Genexpressionen der Entzündungsmarker *Il1b*, *Tnfa* und *Ccl2* (MCP-1) in der Carotis 5 Tage nach Ligatur mittels qPCR untersucht (Abbildung 25). Die Expressionen von *Il1b* und *Tnfa* in der Carotis stiegen 5 Tage nach Ligatur massiv an. Auch für *Ccl2* war ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Diese Hochregulationen unterschieden sich in beiden Genotypen signifikant von der jeweiligen unligierten Kontrolle. Ein Unterschied zwischen *Has3*-defizienten und WT-Tieren konnte jedoch nicht festgestellt werden.

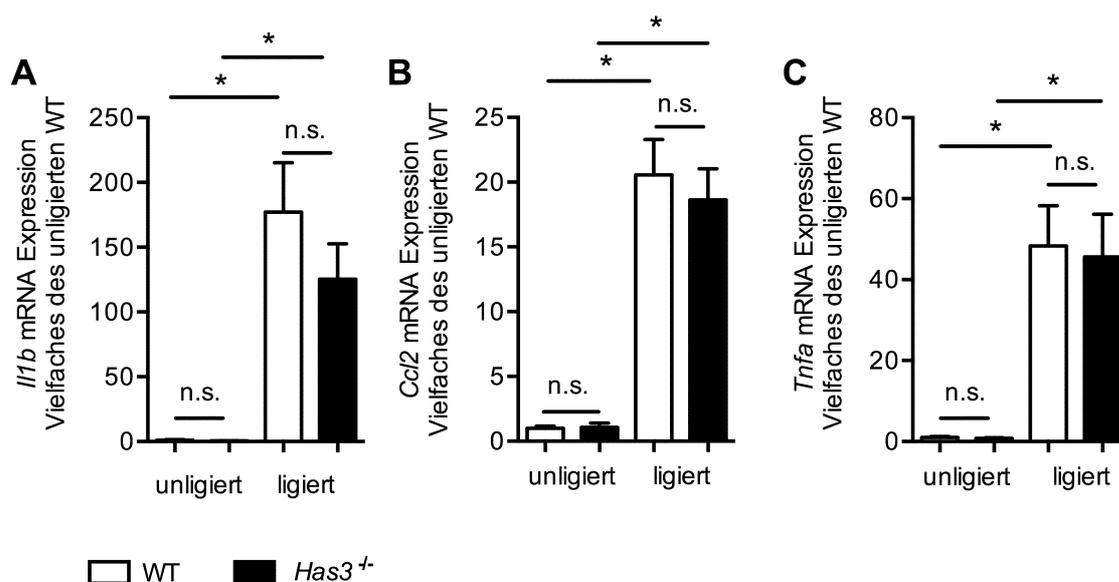


Abbildung 25: Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach Carotisligatur.

mRNA-Expression der Entzündungsmarker *Il1b* (A), *Ccl2* (B) und *Tnfa* (C), dargestellt als ein Vielfaches zur Genexpression in der unligierten Carotis von WT-Mäusen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 4–11, n.s.: nicht signifikant, *p < 0,05 im Vergleich zur jeweiligen unligierten Kontroll-Carotis, Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Test nach Dunn.

3.1.10.2 Gene Array Analyse der Entzündungsmarker

Auch die Ergebnisse des Gene Arrays wurden hinsichtlich markanter Gene, die im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen reguliert sind, ausgewertet. In beiden Genotypen war eine Hochregulation verschiedener Zytokine, Chemokine und ihrer Rezeptoren zu beobachten; ein Unterschied zwischen den Genotypen zeigte sich allerdings nicht (Abbildung 26).

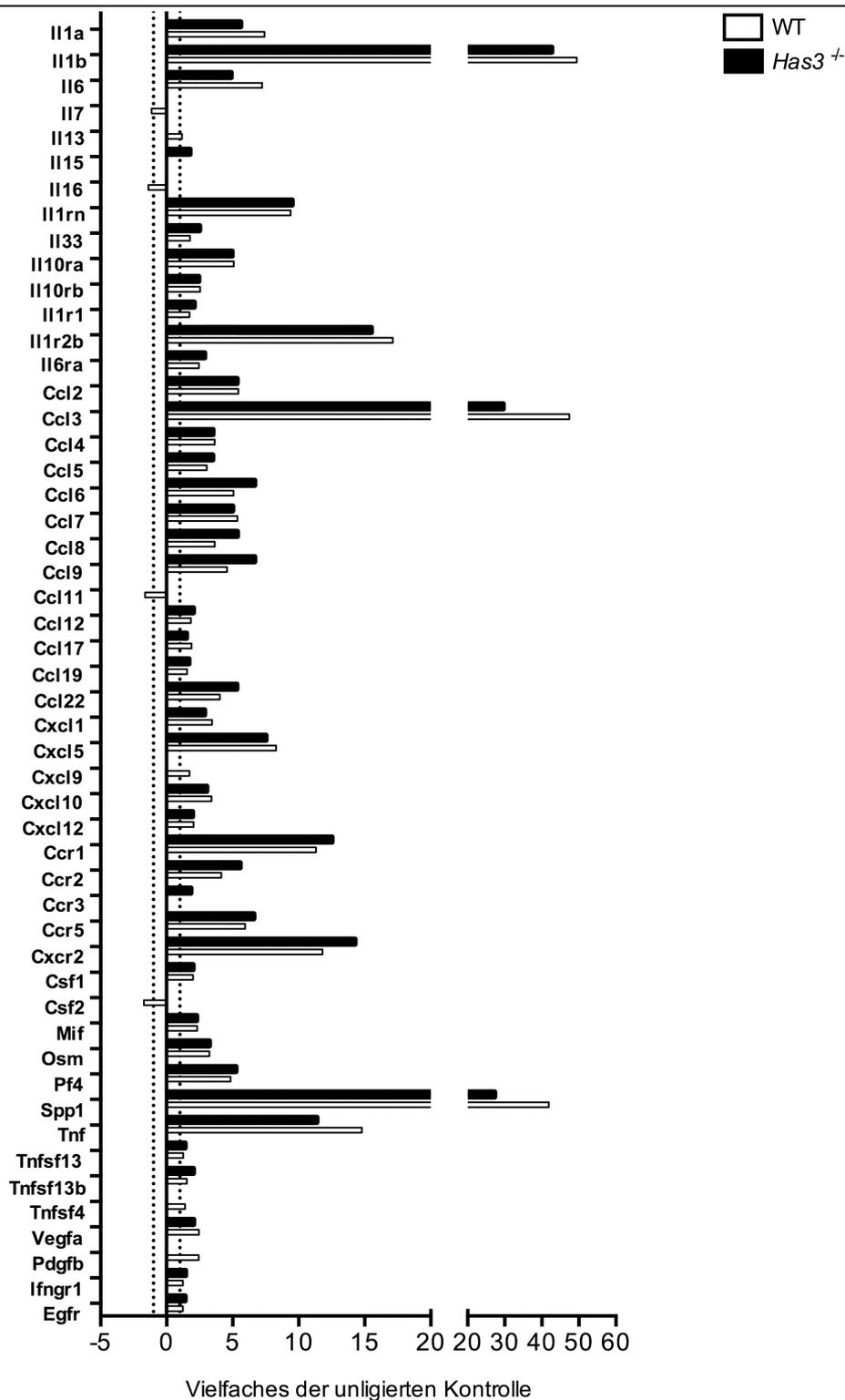


Abbildung 26: Übersichtsdarstellung von differenziell regulierten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren 5 Tage nach Carotisligatur.

Nach Ligatur im Gene Array differenziell regulierte Transkripte wurden im Hinblick auf markante Gene inflammatorischer Reaktionen analysiert. Die differenziell regulierten Transkripte wurden statistisch mit einem moderaten t-Test analysiert und mit Benjamini-Hochberg FDR auf multiples Testen korrigiert; p (korr.) $< 0,05$. Daten sind Mittelwerte, $n = 3, 4$, normalisiert auf die unligierten Kontroll-Carotiden.

Ein ähnliches Bild war in der Analyse der KEGG-Signalwege zu beobachten. Neun KEGG-Signalwege, die inflammatorische Gene enthalten, waren sowohl in WT als auch in *Has3*-defizienten Mäusen nach Carotisligatur reguliert (*Chemokin Signalweg* (mmu04062),

Zytokin-Zytokinrezeptor Interaktion (mmu04060), Toll-like Rezeptor Signalweg (mmu04620), Fc gamma R-vermittelte Phagozytose (mmu04666), transendotheliale Leukozytenmigration (mmu04670), B-Lymphozytrezeptor Signalweg (mmu04662), NOD-artiger Rezeptor Signalweg (mmu04621), Natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität (mmu04650), Fc Ypsilon RI Signalweg (mmu04664), Tabelle 6). Allerdings waren auch drei KEGG-Signalwege mit inflammatorischen Genen ausschließlich in WT-Mäusen reguliert (*Virale Myokarditis* (mmu05416), *Prionenerkrankungen* (mmu05020), *T-Zell Rezeptor Signalwege* (mmu04660), Tabelle 7). Umgekehrt jedoch waren auch einige der KEGG-Signalwege mit Entzündungsgenen ausschließlich in *Has3*-defizienten Mäusen reguliert (*Systemischer Lupus erythematodes* (mmu05322), *Graft-versus-Host-Reaktion* (mmu05332), *Primäre Immundefizienz* (mmu05340), *Intestinales Immunnetzwerk für IgA Produktion* (mmu04672), *Asthma* (mmu05310), Tabelle 8). Die Ergebnisse der Gene Arrays und der nachfolgenden KEGG-Signalweganalyse geben somit keinen eindeutigen Hinweis auf Unterschiede in der Immunantwort zwischen den Genotypen.

3.1.10.3 Zirkulierende Zytokine und Chemokine

Neben der Untersuchung der lokalen Genexpression der Zytokine und Chemokine im Gefäß wurden die Plasmakonzentrationen zirkulierender Zytokine und Chemokine 5 Tage nach Carotisligatur mit einer Multiplex-Analyse bestimmt (Abbildung 27). Auch hierbei bestätigte sich die Beobachtung aus den Daten der Genexpression, dass keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen waren. Mit IL-13 und GM-CSF war jeweils ein primär proinflammatorischer und ein primär antiinflammatorischer Stimulus signifikant reguliert. Die Daten der Plasmauntersuchung geben keine Hinweise darauf, dass Veränderungen in der Entzündungsantwort Ursache für den beobachteten Phänotyp sind.

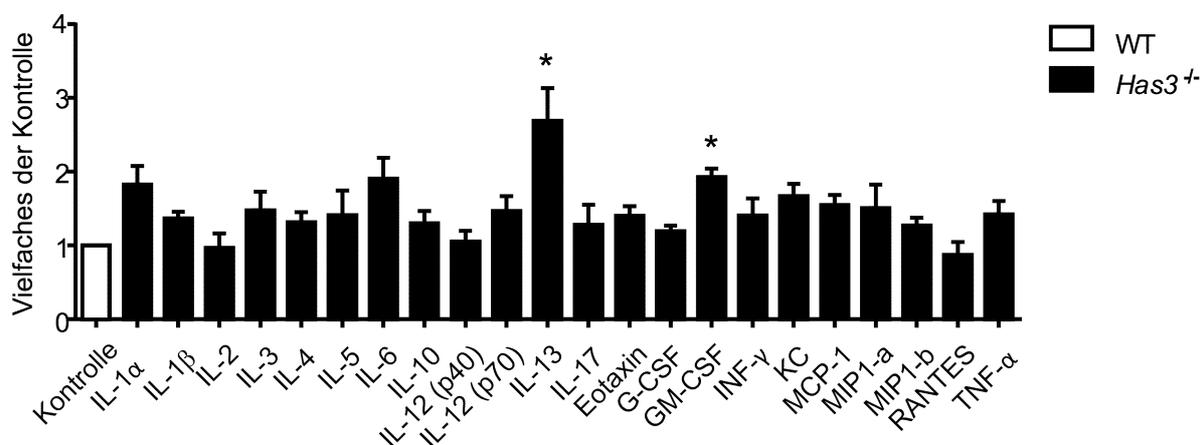


Abbildung 27: Multiplex Analyse zirkulierender Zytokine und Chemokine.

5 Tage nach Ligatur wurden im Plasma *Has3*-defizienter Mäusen und WT-Kontrollen zirkulierende Zyto- und Chemokine mittels Multiplex-Analyse analysiert. Die Multiplex-Messungen wurden von Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum, Düsseldorf durchgeführt. Daten sind dargestellt als ein Vielfaches der WT-Kontrollen; gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 5, 4, *p < 0,05 analysiert mit Kruskal-Wallis Test und einem *post hoc* Test nach Dunn.

3.1.11 Blutparameter

Die Blutglukosespiegel wurden nach 6-stündiger Nahrungskarenz gemessen. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten (Abbildung 28A). Im Plasma waren die Werte für Gesamtcholesterin unverändert (Abbildung 28B).

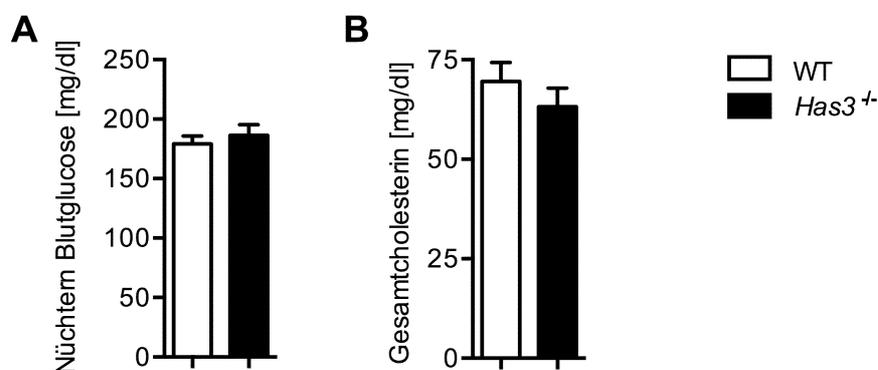


Abbildung 28: Blutparameter.

A, 6 h Nüchternblutglukose; n = 8, 6, **B**, Gesamtcholesterin, n = 6, 3. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM.

3.1.12 Endothelfunktion

Es ist denkbar, dass basale Veränderungen der Endothelfunktion zu einer unterschiedlichen Neointimaentwicklung beitragen. HA als essentieller Bestandteil der endothelialen Glykokalyx trägt zur Integrität des Endothels bei.¹⁰⁹ Die genetische Deletion der *Has3* könnte die Endothelfunktion beeinflusst haben, so dass die ligandengesteuerte Vasodilatation und der Blutdruck in den Knock-out Tieren verändert ist. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst die Herzfrequenz und der systolische Blutdruck mittels Schwanzplethysmographie *in vivo* bestimmt. Hier zeigten sich keine Veränderungen zwischen den Gruppen (Abbildung 29).

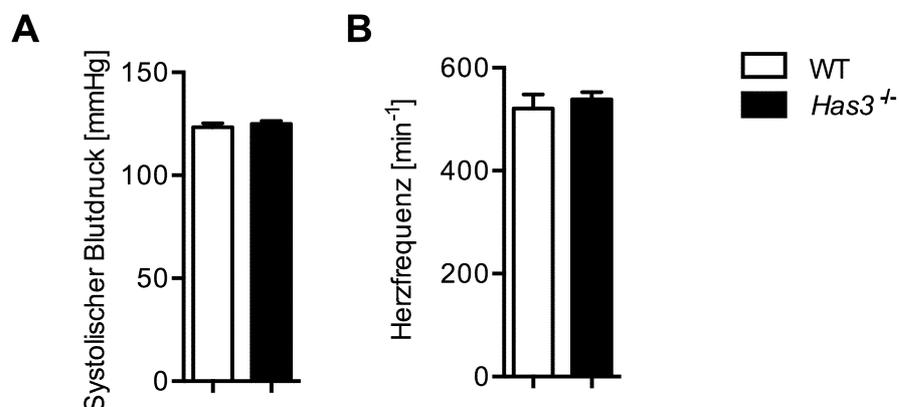


Abbildung 29: Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.

Gezeigt ist der systolische Blutdruck (**A**) und die Herzfrequenz (**B**), gemessen an der Schwanzvene mit einem fotoplethysmographischen Sensor. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 5.

An Aorten *Has3*-defizienter Mäuse wurde die Endothelfunktion näher betrachtet. Zunächst wurde die Proteinexpression der eNOS mit einer Western-Blot Analyse von lysierten Aorten untersucht (Abbildung 30A). Die densitometrische Quantifizierung der Banden, normalisiert auf Aktin, zeigte keine Unterschiede in der Proteinexpression der eNOS (Abbildung 30B).

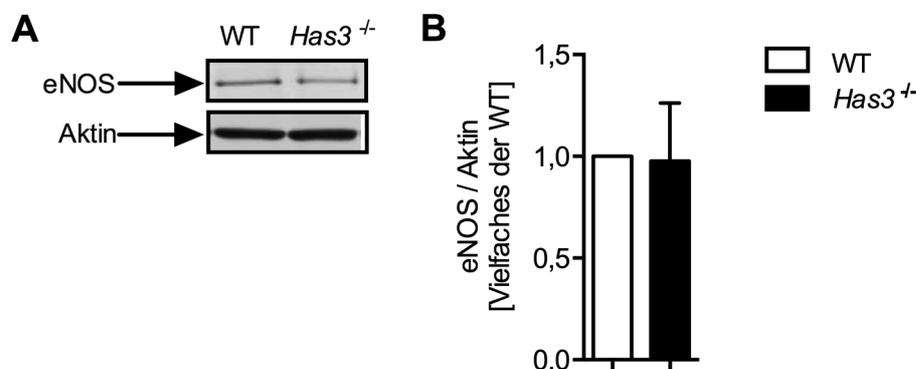


Abbildung 30: eNOS Proteinexpression.

eNOS Proteinexpression in Aorten von *Has3*-defizienten und WT-Mäusen. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots (A) und die densitometrische Quantifizierung (B), normalisiert auf Aktin; n = 4, 5. Die Western-Blot Analyse der eNOS wurde von Frau Dr. Tatsiana Suvorava unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Zudem wurde die Endothelfunktion *ex vivo* in Organbadversuchen mit isolierten thorakalen Aorten untersucht. Durch die Zugabe steigender Konzentrationen des Liganden Acetylcholin wurde zunächst die endothel-abhängige Vasorelaxation nach halbmaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin analysiert (Abbildung 31A). Hier waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten. Auch die endothel-unabhängige Antwort auf den exogenen NO-Donor SNAP zeigte keine Unterschiede (Abbildung 31B). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Defizienz der *Has3* keinen Einfluss auf die Sensitivität des vaskulären NO-cGMP-Signalwegs hat. Zudem wurde die Kontraktion der Gefäße nach Zugabe des α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin untersucht (Abbildung 31C). Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Antwort.

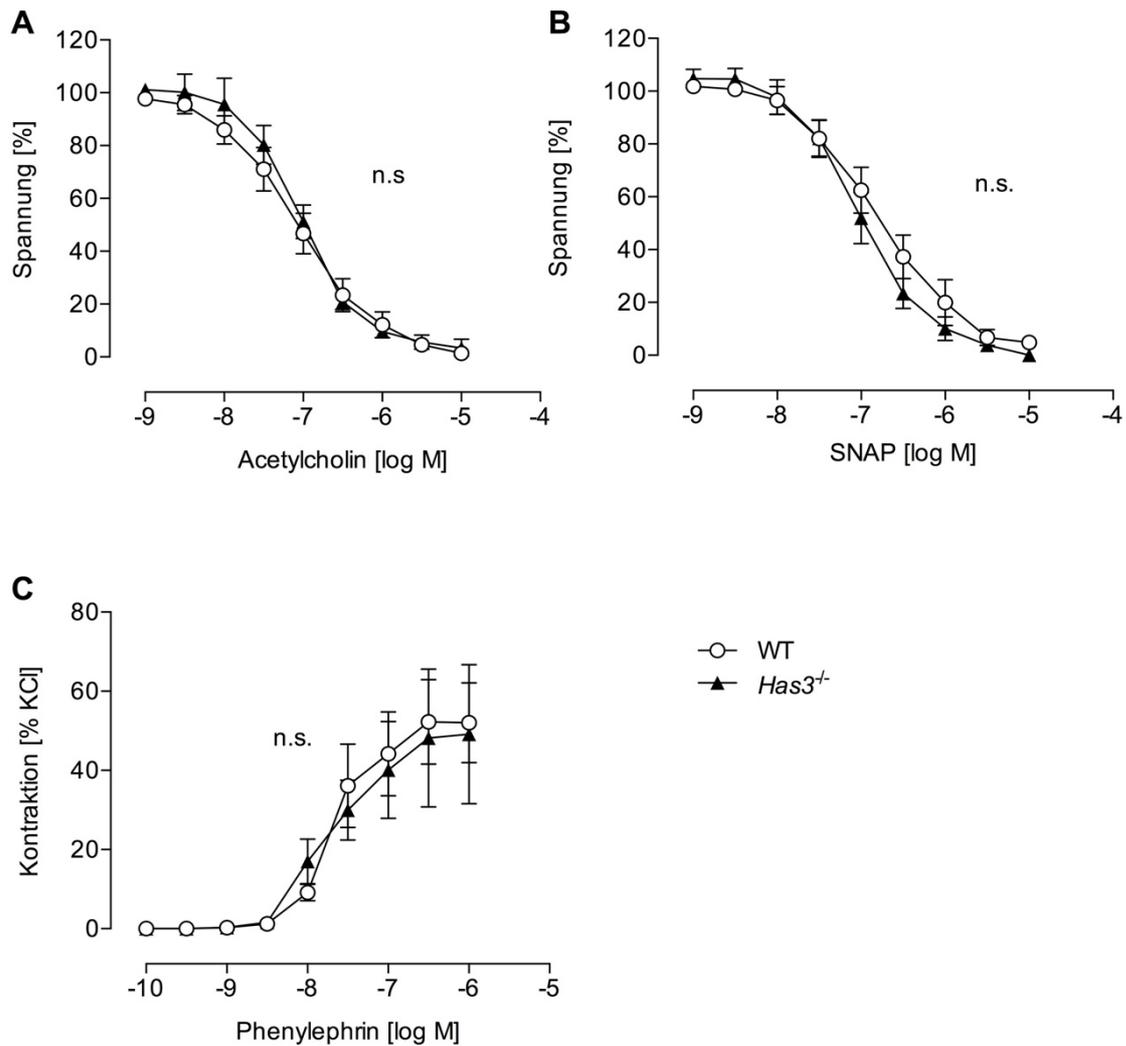


Abbildung 31: Endothelfunktion.

Konzentrations-Wirkungskurven der durch **A**, Acetylcholin-induzierten endothelabhängigen Vasorelaxation, **B**, der endothelunabhängige Vasorelaxation durch SNAP und **C**, der kontraktilen Antwort auf Phenylephrin, prozentual dargestellt zur maximalen Kontraktion nach KCl-Gabe. Die Untersuchung der Endothelfunktion wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tatsiana Suvorava unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 3-4, nicht signifikant (n.s.).

3.1.13 Oxidativer Stress

Eine Hypothese ist, dass eine veränderte Antwort auf oxidativen Stress Ursache für die verminderte Neointimahyperplasie ist. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch Umweltfaktoren oder während des Zellmetabolismus entstehen, können die Funktionalität von Proteinen durch oxidative Modifikationen verändern und so Gefäßveränderungen beeinflussen.^{163, 164} Daher wurden oxidative Proteinmodifikationen in Lysaten thorakaler Aorten mit der Oxyblot™-Methode analysiert. Bei dieser Methode werden mittels Immunblot Carbonylgruppen detektiert, die als Marker von oxidativen Veränderungen der Proteine dienen. Abbildung 32 zeigt die Oxyblot™-Analyse von *Has3*-defizienten Aorten im Vergleich zu Proben von WT-Tieren. Die densitometrische Quantifizierung der Carbonylgruppen ergab keine Hinweise auf veränderte oxidative Proteinmodifikationen.

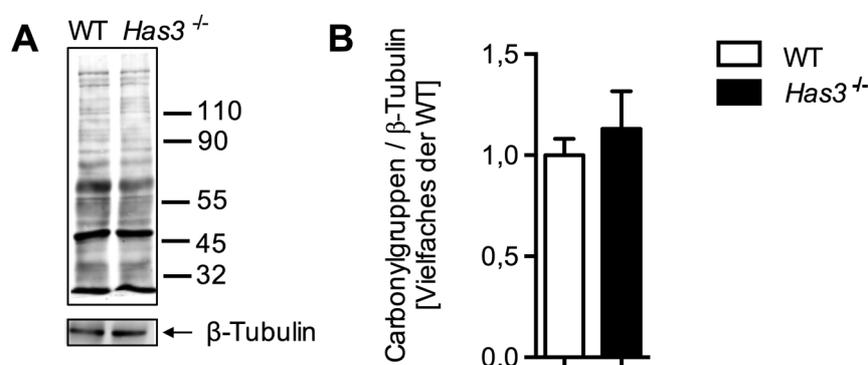


Abbildung 32: Oxyblot™

A, Beispielhafte Immunblots von Carbonylgruppen als Marker für oxidative Proteinmodifikationen und **B**, die densitometrische Quantifizierung der Signale normalisiert auf β-Tubulin, Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt, n = 4.

Die Ergebnisse des Gene Arrays wurden hinsichtlich einiger markanter Gene, die häufig im Zusammenhang mit oxidativem Stress verändert sind, analysiert. Wie in Abbildung 33 zu erkennen, gab es auch hier keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen, was die Ergebnisse des Oxyblots™ unterstützt. Im Einklang dazu ergaben auch die KEGG-Signalweganalysen keinen Hinweis auf eine veränderte Antwort auf oxidativen Stress (Tabelle 6–7).

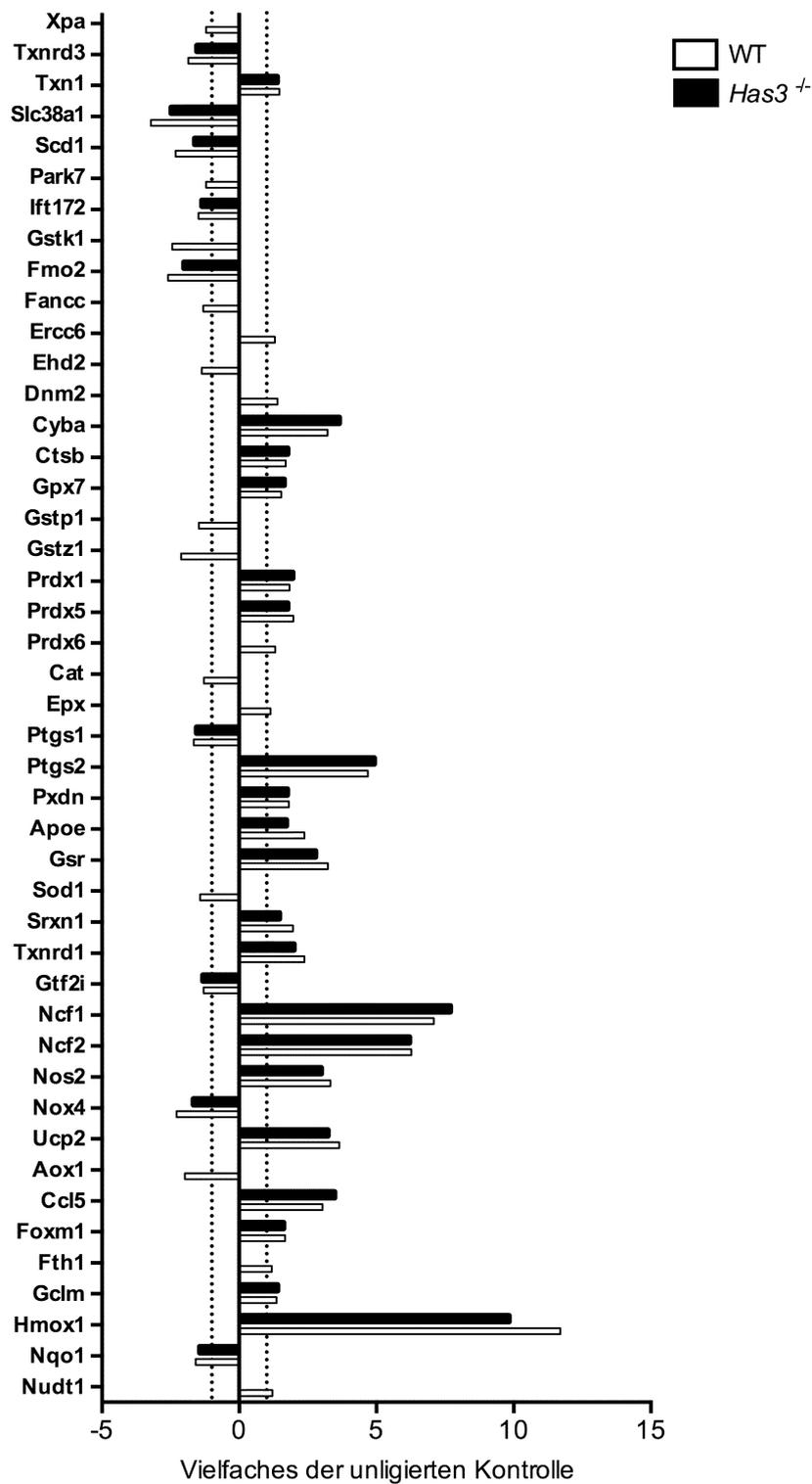


Abbildung 33: Gene Array–Oxidativer Stress

Analyse der Gene Array Daten im Hinblick auf Schlüsselgene des oxidativen Stresses, die nach Ligatur in *Has3*^{-/-}- und WT-Carotiden reguliert waren. Dargestellt sind Mittelwerte, n = 3–4, statistische Analyse nach Normalisierung auf die jeweilige unligierte Kontrolle unter Verwendung des moderierten t-Tests, Ergebnisse wurden mit Benjamini-Hochberg FDR auf multiples Testen korrigiert, p (korr.) < 0,05.

3.1.14 Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die beobachteten Unterschiede primär in einer veränderten Migration der Zellen begründet sind. Ein deutliches Indiz für diese Hypothese ist die Beobachtung im Gene Array, dass die *Pdgf-b* Genexpression nach Carotisligatur in WT-Mäusen signifikant hochreguliert war; ein Effekt, der bei *Has3*-defizienten Mäusen nicht zu finden war (NCBI GEO GSE70410). PDGF-BB ist bekannt für seinen Einfluss auf die VSMC-Migration und auf die Ausbildung einer Neointima.^{165, 166} PDGF-BB fördert die Synthese von EZM; beispielsweise regt PDGF-BB in VSMC die Ausbildung einer perizellulären HA-Matrix an, die wiederum die Zellmigration fördert.⁷⁹

Die Zellmigration der VSMC lässt sich histologisch nur schwer quantifizieren, da es keine spezifischen Marker gibt. Um die *in vivo* erhobenen Daten zu verifizieren, wurden *in vitro* Experimente mit humanen CaSMC durchgeführt. Zunächst wurde mittels lentiviraler *sh-HAS3* die *HAS3* mRNA-Expression reduziert (Abbildung 34A). Auch in CaSMC war die *PDGF-B* Genexpression nach lentiviraler Herabregulation der *HAS3* signifikant reduziert, wie die qPCR Analyse zeigte (Abbildung 34B). Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen aus der Genearray Analyse der murinen Proben.

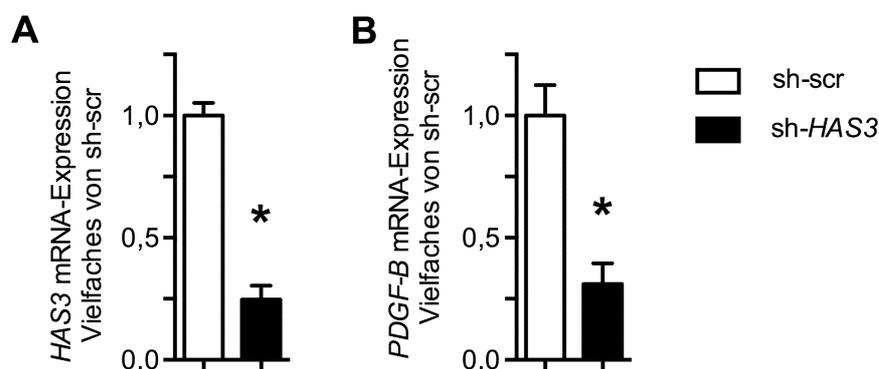


Abbildung 34: Lentivirale Herabregulation von *HAS3* in CaSMC.

A, *HAS3* Genexpression in CaSMC unter Verwendung von *sh-HAS3* im Vergleich zu unspezifischer Kontroll-shRNA. (*sh scr*). **B**, *PDGF-B* mRNA-Expression. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (*scrambled*, *sh-scr*).

In *sh-HAS3* Zellen war die Migrationsrate signifikant reduziert, wie Versuche zeigen, in denen die Zellmigration unter PDGF-BB Stimulation nach lentiviraler Herabregulation der *HAS3* in CaSMC in einer Mikrochemotaxiskammer betrachtet wurden (Abbildung 35A). Im Einklang mit den *in vivo* Ergebnissen zeigte die Proliferationsrate unter PDGF-BB keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 35B).

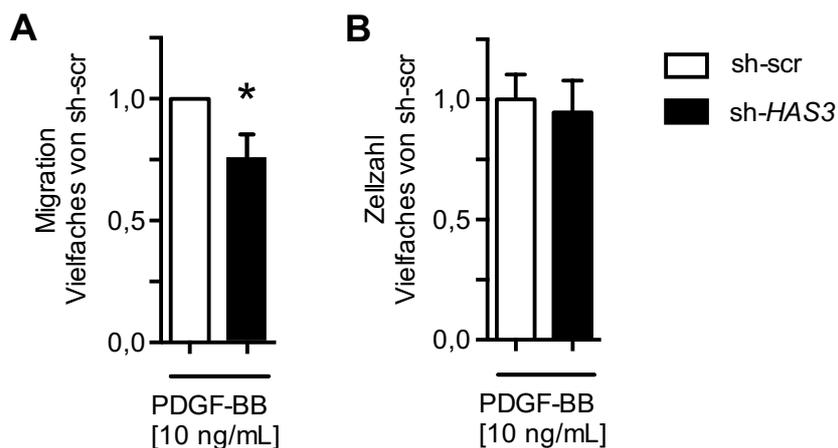


Abbildung 35: Migration und Proliferation nach Herabregulation der *HAS3* in CaSMC.

A, Untersuchung der Mikrochemotaxis unter PDGF-BB Stimulation in einer modifizierten Boyden-Kammer auf Kollagen-Typ-1 beschichteten Membranen. **B**, Proliferationsrate unter PDGF-BB Stimulation bestimmt mittels Zellzählung, dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 3-6$, $*p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (*scrambled*, sh-scr).

Die veränderte Zellmigration infolge lentiviraler Herabregulation der *HAS3* wurde im nächsten Schritt detaillierter betrachtet. CaSMC wurden mit PDGF-BB stimuliert, um die Zellmigration anzuregen. Im Anschluss wurde die mRNA-Expression einer Auswahl markanter Gene aus dem Kontext der Migration mittels qPCR analysiert. Deren Genexpression war in sh-*HAS3* deutlich geringer als in den Kontrollzellen (Abbildung 36). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den zuvor erhobenen Daten der Gene Array Analyse. Die Analyse der KEGG-Signalwege deutete auf eine abgemilderte migratorische Antwort auf die Carotisligatur in *Has3*-defizienten Tieren hin.

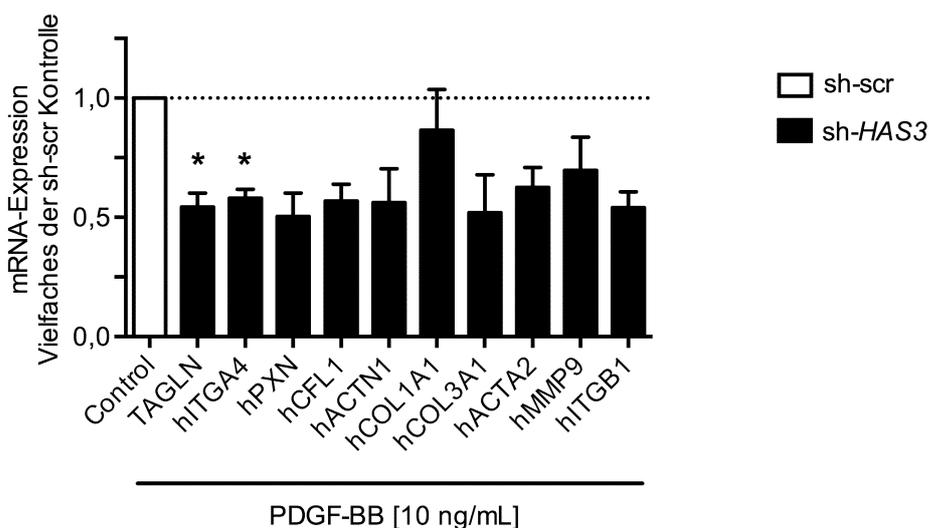


Abbildung 36: Genexpression mit Migration assoziierter Gene nach Herabregulation der *HAS3* in CaSMC.

mRNA-Expression in mit sh-*HAS3* behandelten CaSMC unter Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zu sh-scr bestimmt mit qPCR. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 3-4$, $*p < 0,05$, im Vergleich zu sh-scr, analysiert mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse und nachfolgendem Dunnett-Test für multiple Vergleiche.

3.1.15 Genexpression der HA-Rezeptoren in CaSMC

Um zu evaluieren, welchen Einfluss der pro-migratorische Stimulus PDGF-BB und das pro-entzündliche IL-1 β auf die Genexpression der Hyaluronsäurerezeptoren *CD44*, *RHAMM*, *LYVE-1* und *HARE* haben, wurden CaSMC in einem Zeitgang stimuliert und das mRNA-Expressionsmuster der HA-Rezeptoren mittels qPCR quantifiziert. *HARE* konnte durch die verwendete qPCR-Methode in CaSMC nicht detektiert werden.

Die Stimulation mit dem pro-migratorischen Wachstumsfaktor PDGF-BB ergab eine maximale Hochregulation der Genexpression von *RHAMM* zu den späten Zeitpunkten 18 h und 24 h (Abbildung 37A). Die frühen Zeitpunkte waren unverändert. Die mRNA-Expression von *CD44* war durch PDGF-BB Stimulation nur marginal erhöht; nach 24 h war die Expression um den Faktor $1,3 \pm 0,1$ signifikant erhöht (Abbildung 37B).

Der Hyaluronsäurerezeptor *LYVE-1* war in CaSMC zu einem höheren Cq-Wert detektierbar als *CD44* und *RHAMM*, was auf eine geringere Genexpression hindeutet, die durch die Stimulation mit PDGF-BB nicht beeinflusst wurde (Abbildung 37C).

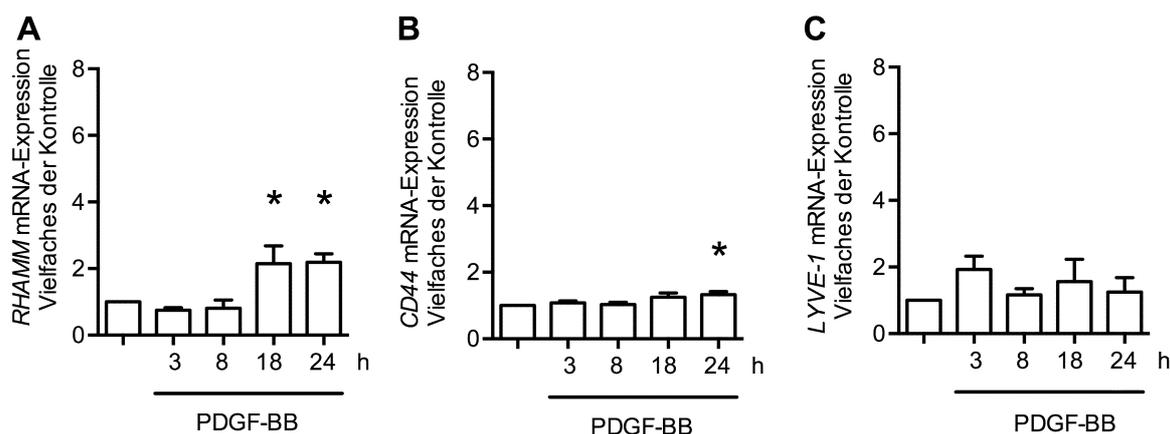


Abbildung 37: Genregulation der HA-Rezeptoren nach PDGF-BB-Stimulation.

CD44, *RHAMM* und *LYVE-1* mRNA-Expression in CaSMC im Zeitverlauf nach PDGF-BB [10 ng/mL] Stimulation, Vielfaches der Kontrolle; dargestellt ist jeweils der Mittelwert; n = 3–8; *p < 0,05, analysiert mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und nachfolgendem Dunnett-Test für multiple Vergleiche.

Die Genexpression des Hyaluronsäurerezeptors *RHAMM* war nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β zu den frühen Zeitpunkten unverändert (Abbildung 38A). Wie unter PDGF-BB Stimulation war auch hier nach 18 h und 24 h eine signifikante Hochregulation zu beobachten.

IL-1 β führte, wie bereits in der Literatur beschrieben, zu einer signifikanten Erhöhung der *CD44*-mRNA-Expression (Abbildung 38B).¹⁶⁷ Diese war sowohl nach einer kurzzeitigen Stimulation von 3 h als auch bei längerer Inkubation von 18 h und 24 h zu beobachten.

Unter IL-1 β Stimulation war für *LYVE-1* ein Trend zur Hochregulation an allen gemessenen Zeitpunkten zu beobachten, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 38C).

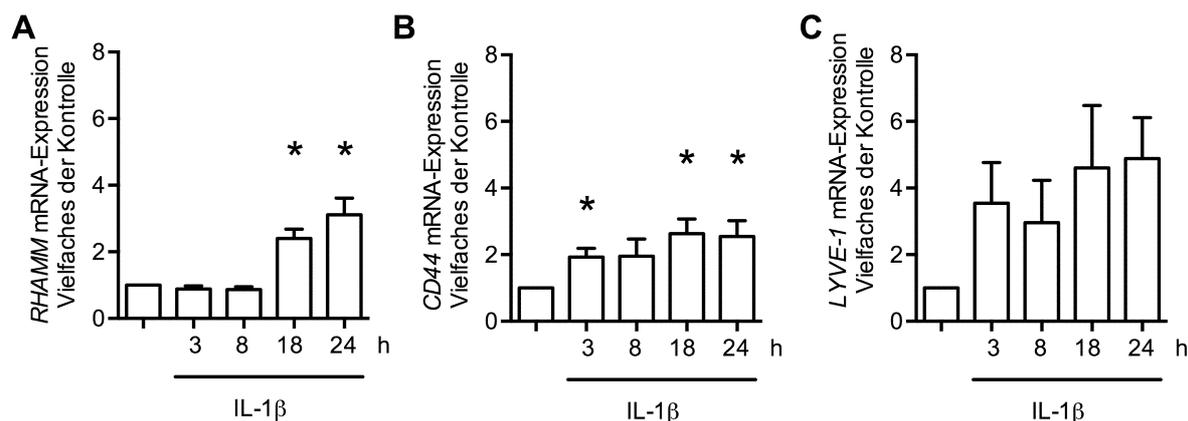


Abbildung 38: IL-1 β -stimulierte Genexpression der HA-Rezeptoren.

Zeitabhängigkeit der durch IL-1 β [10 ng/mL] induzierten *CD44*, *RHAMM* und *LYVE-1* mRNA-Expression in CaSMC, Vielfaches der Kontrolle; dargestellt ist jeweils der Mittelwert; n = 6–11; *p < 0,05, analysiert mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und nachfolgendem Dunnett-Test für multiple Vergleiche.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die beobachtete Hochregulation von *RHAMM* durch eine kombinierte Stimulation der Zellen mit IL-1 β und PDGF-BB verstärken lässt. Auch bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-1 β und PDGF-BB war zu den frühen Zeitpunkten 3 h und 8 h kein Einfluss auf die *RHAMM*-Genexpression zu beobachten. Zu 18 h und 24 h war eine additive Induktion der *RHAMM*-Genexpression zu beobachten (Abbildung 39).

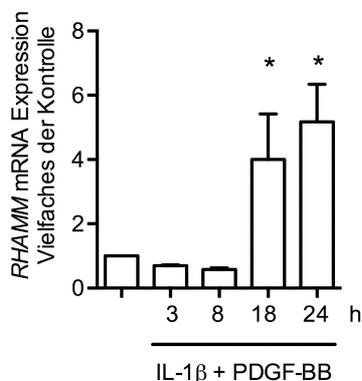


Abbildung 39: *RHAMM* Genexpression im Zeitverlauf nach IL-1 β + PDGF-BB-Stimulation.

Kombinierte Stimulation von CaSMC mit PDGF-BB [10 ng/mL] und IL-1 β [10 ng/mL], mRNA-Expression im Zeitverlauf, Vielfaches der Kontrolle; dargestellt ist jeweils der Mittelwert; n = 6–7; *p < 0,05, analysiert mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und nachfolgendem Dunnett-Test für multiple Vergleiche.

Die Ergebnisse des Abschnitts 3.1 sind zu Teilen publiziert unter:

Kiene LS, Homann S, Suvorava T, Rabausch B, Muller J, Kojda G, Kretschmer I, Twarock S, Dai G, Deenen R, Hartwig S, Lehr S, Kohrer K, Savani RC, Grandoch M and Fischer JW. Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:e9-16.

3.2 Einfluss einer *Has3*-Defizienz auf die Entstehung der Atherosklerose

Um den Effekt einer *Has3*-Defizienz auf die Progression der Atherosklerose zu untersuchen, wurde ein neues Mausmodell generiert. Tiere mit einer genetischen Deletion des *ApoE* wurden mit *Has3*-defizienten Mäusen verpaart. *ApoE*-defiziente Mäuse sind ein etabliertes Modell der Atherosklerose, bei dem sich ab einem Alter von 4 – 5 Wochen spontan atherosklerotische Plaques ausbilden.¹³⁷ Nach Kreuzung mit *Has3*-defizienten Tieren entstehen *ApoE/Has3*-doppeldefiziente Tiere. Mit diesem Mausmodell war es möglich, gezielt *in vivo* den Einfluss der von *Has3* gebildeten HA-Matrix auf die Entstehung der Atherosklerose zu untersuchen. Die Tiere wurden ab einem Alter von 8 Wochen mit einer Western-Diät gefüttert. 15 Wochen nach Fütterungsbeginn wurden die Tiere mit einem Alter von 23 Wochen getötet.

3.2.1 Gewichtskontrolle der Versuchstiere

Im Verlauf der Fütterungsdauer von 15 Wochen wurden die Versuchstiere wöchentlich gewogen. Die Fütterung mit Western-Diät führte bei allen Tieren zu einer deutlichen Gewichtszunahme, die jedoch bei *ApoE-Has3*-doppeldefizienten Mäusen, verglichen mit den *ApoE*-defizienten Kontrollmäusen, statistisch signifikant geringer ausfiel (Abbildung 40). Am Ende der Versuchsdauer waren die *ApoE/Has3*-doppeldefizienten Tiere signifikant leichter als die Kontrollgruppe (*ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-} 33,7 g ± 1,34, n = 7 vs. *ApoE*^{-/-}, 39,7 ± 1,24, n = 7, p < 0,05). Ein Unterschied in der Körperlänge war nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

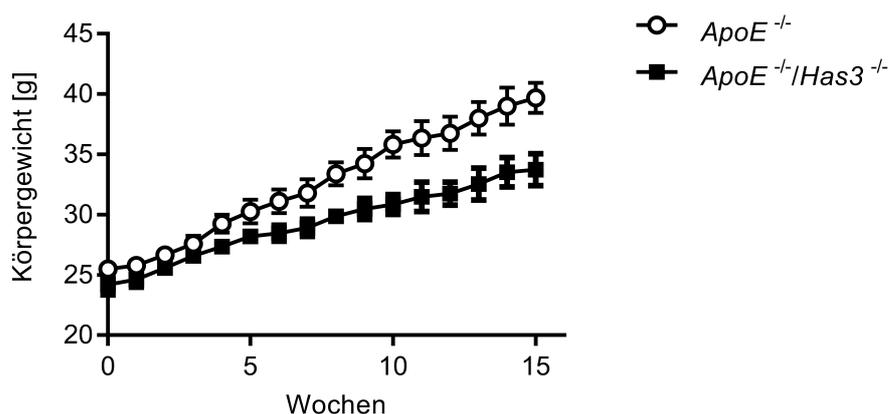


Abbildung 40: Körpergewicht der Versuchstiere.

Körpergewicht im Verlauf der Fütterung mit Western-Diät über 15 Wochen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM, n = 7, *p < 0,05 im Vergleich zu *ApoE*-defizienten Kontrolltieren analysiert mit einer Zwei-Weg-Varianzanalyse.

3.2.2 Blutlipide

Im Plasma waren nach 15 Wochen Fütterung mit cholesterinreicher Western-Diät keine Unterschiede im Gesamtcholesterin, VLDL/LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin zu beobachten (Abbildung 41).

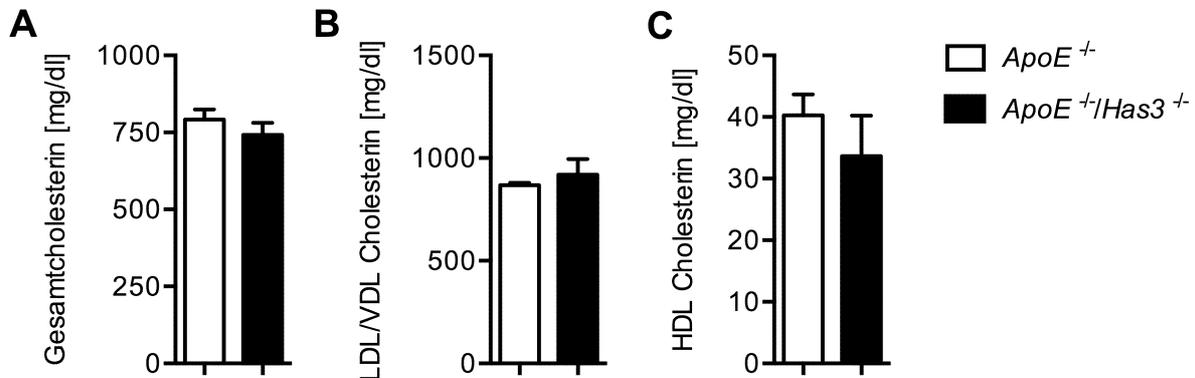


Abbildung 41: Plasmacholesterol.

Plasmakonzentrationen von **A**, Gesamtcholesterin, **B**, VLDL/LDL-Cholesterin, **C**, HDL-Cholesterin nach einer Fütterung mit Western-Diät für 15 Wochen. n = 5–6. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

3.2.3 *En face* Färbung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta.

Die Verteilung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta und im Aortenbogen wurde mittels *en face* Ölrot O Färbung detektiert. Der Farbstoff lagert sich in lipidreiche Gewebsstrukturen ein, somit auch in atherosklerotische Plaques. Nach 15 Wochen Fütterung mit Western-Diät waren sowohl in den $ApoE$ -defizienten Tieren als auch in den $ApoE/Has3$ -doppeldefizienten Tieren ausgeprägte atherosklerotische Läsionen zu beobachten (Abbildung 42).



Abbildung 42: *en face* Aufnahmen muriner Aorten.

Verteilung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta von $ApoE^{-/-}$ - und $ApoE^{-/-}Has3^{-/-}$ -Mäusen, die für 15 Wochen mit Western-Diät gefüttert wurden. Lipidreiche Strukturen wurden mittels Ölrot O angefärbt. Exemplarische Darstellung aufgeschnittener *en face* fotografierter Aorten von n = 7 Tieren.

In der Gesamtaorta nahmen die Läsionen bei den *ApoE*^{-/-} 10,1 ± 1,8 % der Fläche ein. Im Vergleich dazu war mit 6,1 ± 1,5 % der aortalen Gesamtfläche die Aorta der *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäuse weniger atherosklerotisch verändert (Abbildung 43A). Dies zeigte sich auch in den einzelnen Segmenten der Aorta. Lipidreiches atherosklerotisches Gewebe war vor allem im Aortenbogen zu finden, was auf Verwirbelungen im Blutfluss zurückzuführen ist. Hier zeigte sich eine deutlich verringerte Belastung mit atherosklerotischen Plaques in den Tieren mit *Has3*-Defizienz (Abbildung 43B). Eine signifikante Abnahme der Atherosklerose ließ sich auch im thorakalen Abschnitt der Aorta feststellen (Abbildung 43C). Auch im Bereich der *Aorta abdominalis* waren die Läsionen in *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäusen signifikant weniger ausgeprägt als in den Kontrolltieren (Abbildung 43D).

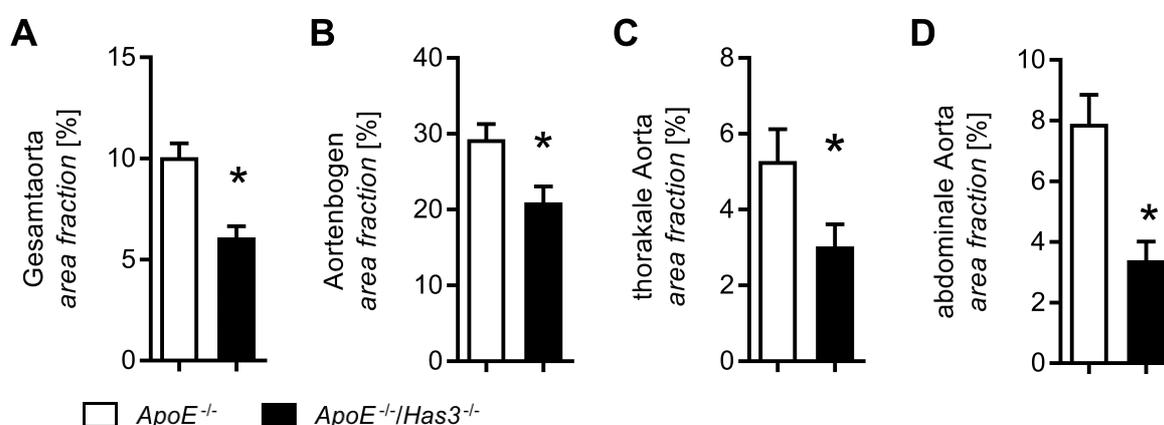


Abbildung 43: Quantitative Auswertung der en face Aufnahmen muriner Aorten.

Digitale Bildanalyse der mit Ölrot O gefärbten Aorten. Es wurde die Verteilung lipidreicher atherosklerotischer Läsionen sowohl für die Gesamtaorta als auch die einzelnen Segmente separat betrachtet. Die rot angefärbte Fläche ist prozentual als Mittelwert ± SEM dargestellt, n = 7, *p < 0,05 vs. *ApoE*^{-/-}.

3.2.4 Quantifizierung der Atherosklerose im Aortenursprung

Im nächsten Schritt wurde das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung der Versuchstiere quantifiziert. Der Aortenursprung ist einem beständigen Scherstress ausgesetzt und somit besonders anfällig für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.^{17, 18} Beide Gruppen zeigten 15 Wochen nach Fütterungsbeginn ausgeprägte atherosklerotische Plaques im Aortenursprung. Der zuvor in den Aorten beschriebene Unterschied zwischen den Genotypen ließ sich jedoch nicht beobachten (Abbildung 44).

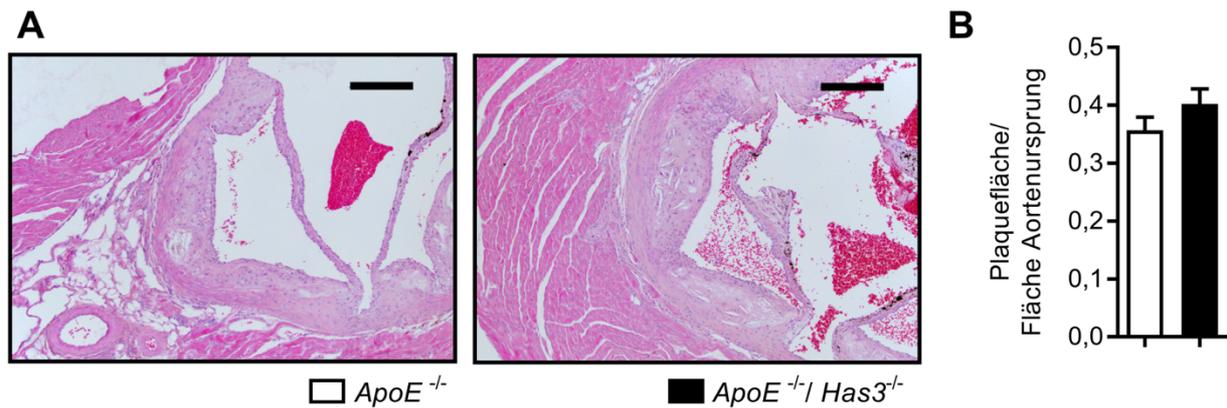


Abbildung 44: H&E-Färbung des Aortenursprungs.

A, Exemplarische H&E-Färbung der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung nach einer Fütterung mit Western-Diät für 15 Wochen, 100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 200 μm , **B**, Morphometrische Analyse der Läsionsgröße normalisiert auf die Gesamtfläche des Aortenursprungs. Die Größe der atherosklerotischen Plaques wurde pro Tier an drei Schnitten mit einem Abstand von 50 μm gemessen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7$.

3.2.5 Plaquemorphologie im Aortenursprung

Bei beiden Genotypen waren nach 15 Wochen Fütterung im Aortenursprung fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen zu erkennen, wie die H&E-Färbung zeigte (Abbildung 44A). Zelluläre Strukturen waren vor allem an der fibrotischen Kappe zu finden. Im Zentrum der Läsion waren kristalline Strukturen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Cholesterinablagerungen handelt. Im Folgenden wurde die Morphologie der Plaques näher betrachtet, die Aufschluss darüber geben könnte, ob es trotz der nicht vorhandenen Unterschiede in der Plaquegröße im Aortenursprung strukturelle Verschiedenheiten in den Läsionen gibt. Diese könnten Einfluss auf die Stabilität der Plaques haben und somit auf die Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Komplikationen bedingt durch die Atherosklerose.

3.2.5.1 Nekrotischer Kern und fibrotische Kappe

Plaques, die ein erhöhtes Risiko für thrombotische Komplikationen haben, zeichnen sich durch eine dünne fibrotische Kappe aus, die einen großen nekrotischen Kern umschließt.¹⁶⁸ Dieser ist beladen mit Lipiden, toten Zellen und Kalzifizierungen. Um einen Hinweis auf die Stabilität der Läsionen zu erhalten, wurden der nekrotische Kern und die Dicke der fibrotischen Kappe vermessen. Der nekrotische Kern war absolut betrachtet in $ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}$ -Mäusen tendenziell vergrößert (Abbildung 45B). Betrachtet man die Fläche des nekrotischen Kerns relativ zur Läsionsgröße war kein Unterschied zu beobachten. Die Dicke der fibrotischen Kappe unterschied sich in $ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}$ -Mäusen nicht von $ApoE^{-/-}$ -Kontrolltieren.

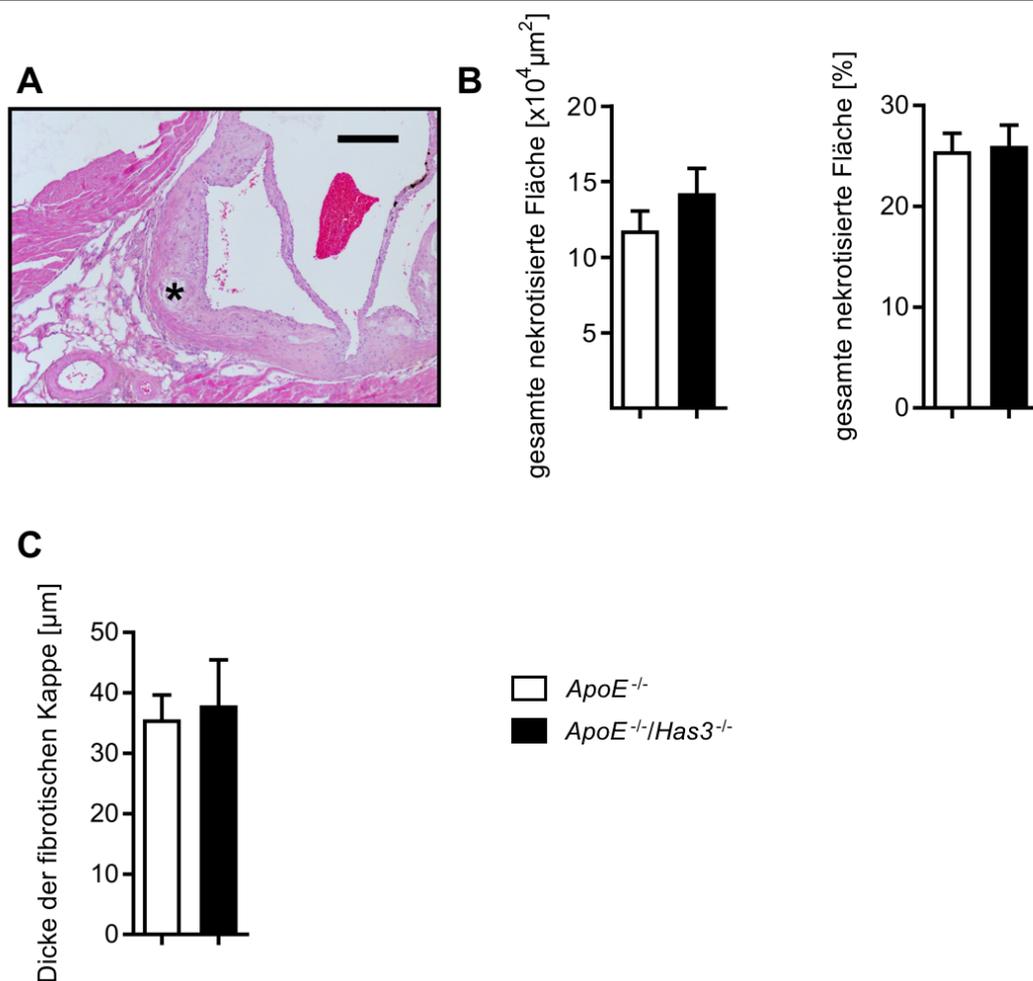


Abbildung 45: Nekrotischer Kern und fibrotische Kappe der Läsionen im Aortenursprung.

A, Beispielhafte H&E-Färbung einer atherosklerotischen Läsion. Der nekrotische Kern (siehe Stern*) wurde als Zellkernfreie-Fläche innerhalb der H&E-Färbung einer atherosklerotischen Läsion definiert, der Schwellenwert lag bei $3000 \mu\text{m}^2$. Die fibrotische Kappe (markiert mit einem Pfeil) wurde als Abstand vom nekrotischen Kern zum äußeren Rand der atherosklerotischen Kappe an der größten nekrotischen Läsion vermessen. **B**, gesamte nekrotische Fläche pro Aortenursprung. **C**, Dicke der fibrotischen Kappe. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7$

3.2.5.2 Zelldichte

Die Unterschiede in der HAS3-abhängigen HA-Matrix könnten sich auch auf die Zelldichte in den atherosklerotischen Plaques auswirken. Um dies zu analysieren, wurde die Zelldichte pro Plaqueläche bestimmt. Hier zeigte sich kein Unterschied in den *Has3-ApoE*-doppeldefizienten Tieren (Abbildung 46).

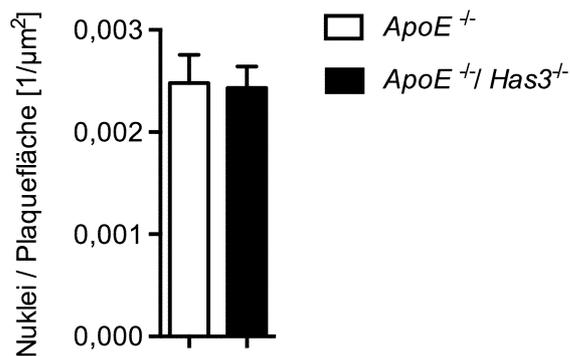


Abbildung 46: Zelldichte im Aortenursprung.

Anzahl Zellkerne pro Fläche in den atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung von *ApoE*^{-/-}- und *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäusen, dargestellt als Mittelwerte ± SEM, n = 7.

3.2.5.3 Kollagen

Um zu untersuchen, ob Veränderungen der HA-Matrix auch einen Einfluss auf andere Bestandteile der EZM haben, wurde Kollagen in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs mit einer Picro-Siriusrot-Färbung angefärbt. Das zu langen Fasern angeordnete Protein stellt einen wesentlichen Bestandteil des Bindegewebes und der EZM dar. Der Gesamtgehalt an Kollagen wurde in lichtmikroskopischen Aufnahmen der Färbung untersucht (Abbildung 47A). Hier war kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abbildung 47B). Die Färbung mit Picro-Siriusrot verstärkt die natürliche Doppelbrechung von Kollagenfasern. Im polarisierten Licht lässt sich so die Packungsdichte der Kollagenfasern detektieren (Abbildung 48A). Die Auswertung der Färbung im polarisierten Licht zeigte auch keinen signifikanten Unterschied in der Dichte der Kollagenfibrillen (Abbildung 48B).

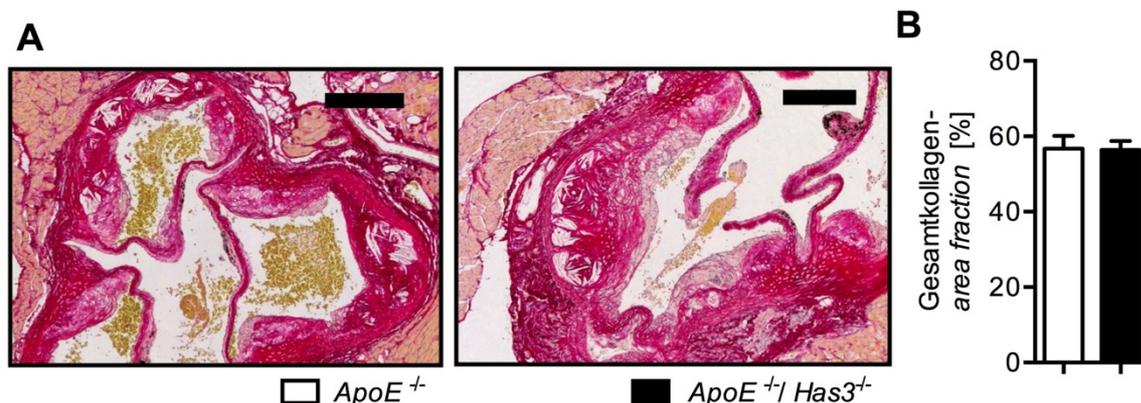


Abbildung 47: Kollagenfärbung im Aortenursprung, Gesamtgehalt.

Exemplarische Darstellung Picro-Siriusrot-gefärbter Schnitte des Aortenursprungs von n = 7 Tieren, die für 15 Wochen mit Western-Diät gefüttert wurden. **A**, repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Aortenursprungs in 100-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken entspricht 200 µm. Hellrot gefärbte Areale sind positiv für Gesamtkollagen. **B**, Quantifizierung des Gesamtgehaltes an Kollagens. Die angefärbte Fläche ist prozentual als Mittelwert ± SEM dargestellt, n = 7.

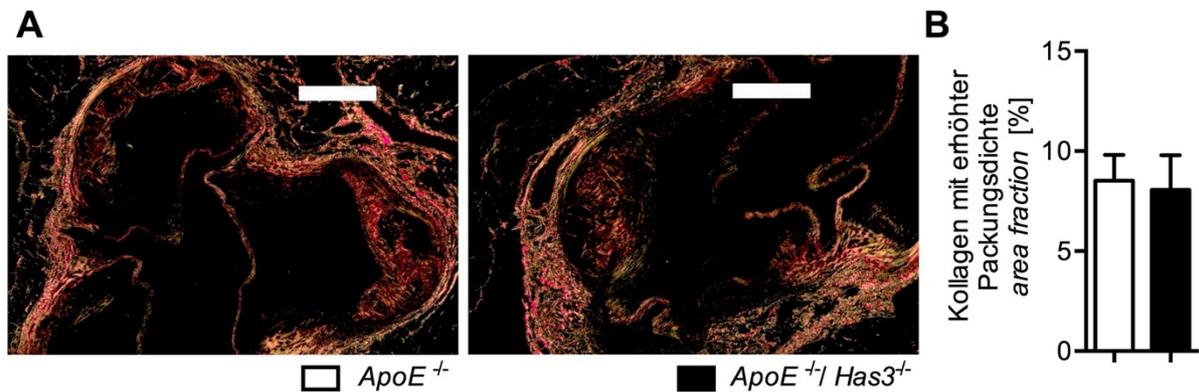


Abbildung 48: Kollagenfärbung im Aortenursprung, Packungsdichte.

A, Betrachtung der Picro-Siriusrot-Färbungen unter polarisiertem Licht; Kollagenfasern mit erhöhter Packungsdichte zeigen eine rote Färbung. 100-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 200 μm . **B**, Quantifizierung der Kollagenfasern mit erhöhter Packungsdichte. Die angefärbte Fläche ist prozentual als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $n = 7$.

3.2.5.4 Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Im Folgenden wurden die zellulären Bestandteile der atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs näher betrachtet. VSMC bilden in atherosklerotischen Plaques eine schützende Kappe aus, die das Risiko für eine Ruptur der Läsionen vermindert.²⁸ Um diese Zellen zu detektieren, wurde alpha-Glattmuskelaktin in den Schnitten des Aortenursprungs angefärbt, ein Marker für differenzierte VSMC (Abbildung 49A).¹² Ein deutliches Signal für alpha-Glattmuskelaktin-positive Zellen war in der Media versorgender Gefäße zu finden. In der Media, die an die atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs grenzt, schienen die VSMC zu Teilen dedifferenziert zu sein, wie das abgeschwächte Signal zeigte. In den atherosklerotischen Läsionen selbst waren vor allem in der fibrotischen Kappe, die die Läsion zum Lumen hin abschließt, alpha-Glattmuskelaktin-positive Zellen detektierbar. Bei beiden Genotypen war diese Schicht nicht kontinuierlich, sondern es gab Regionen in der Kappe ohne detektierbares Signal. Die Quantifizierung der alpha-Glattmuskelaktin-positiven Fläche im Bereich der Läsionen zeigte keinen Unterschied zwischen den $ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}$ und den Kontrolltieren (Abbildung 49B). Auch bei der ausschließlichen Betrachtung der inneren 50 μm der Läsion, die die fibrotische Kappe repräsentiert, konnten keine Unterschiede in der alpha-Glattmuskelaktin-positiven Fläche beobachtet werden (Abbildung 49C).

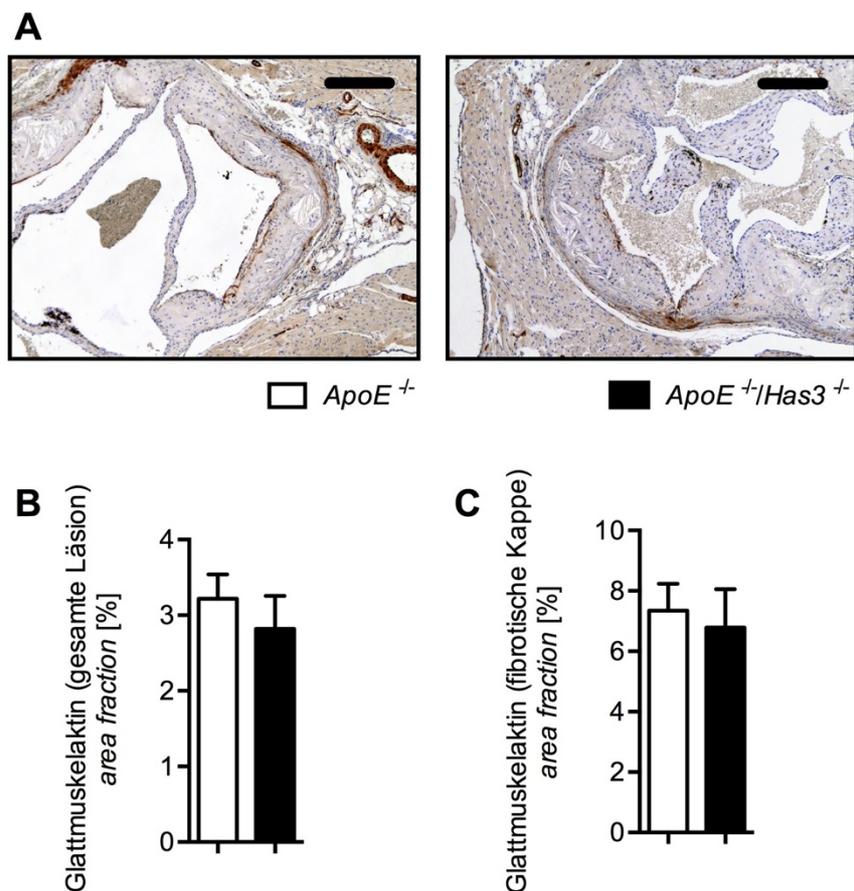


Abbildung 49: Detektion glatter Gefäßmuskelzellen im Aortenursprung.

A, Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbungen für alpha-Glattmuskelaktin im Aortenursprung. 100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 200 μ m **B**, Quantifizierung der für alpha-Glattmuskelaktin positiv gefärbten Bereiche (braun) in den Plaques des Aortenursprungs. **C**, Quantifizierung der für alpha-Glattmuskelaktin positiv gefärbten Flächen innerhalb der inneren 50 μ m der Plaques. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, n = 6.

3.2.5.5 Makrophagen

Atherosklerose zeichnet sich durch chronisch-entzündliche Veränderungen der Gefäßwand aus. Die Bildung der Läsionen entsteht durch eine maladaptive Immunantwort, die zur Anreicherung von mit ox-LDL-beladenen Makrophagen in der Zellwand führt.²⁰ In der Literatur ist beschrieben, dass die Anwesenheit von HAS3 bedeutend für verschiedene inflammatorische Funktionen ist.^{63, 169, 170} Um den entzündlichen Zustand der Läsionen zu analysieren, wurde eine MAC2-Färbung durchgeführt. Mit einer immunhistochemischen Färbung dieses Makrophagen-Oberflächenantigens wurden die für Makrophagen positiven Bereiche in den Läsionen detektiert (Abbildung 50A). In beiden Gruppen akkumulierten Makrophagen vor allem an der Oberfläche der Plaques. Es war kein Unterschied in Bezug auf den Makrophagengehalt zwischen *ApoE/Has3*-defizienten Tieren und *ApoE*-defizienten Kontrolltieren zu beobachten (Abbildung 50B).

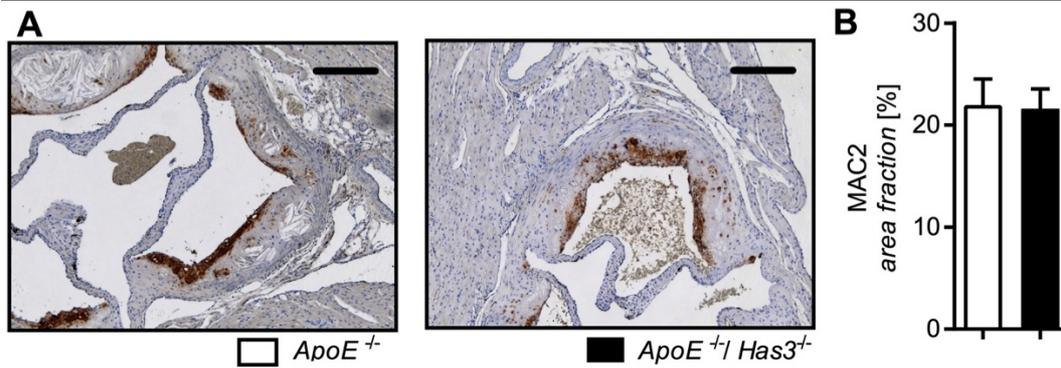


Abbildung 50: MAC2-Färbung zur Detektion der Makrophagen im Aortenursprung.

A, Exemplarische Darstellung der Makrophagenakkumulation in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs. 100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 200 μm . **B**, Digitale Bildanalyse der für MAC2 positiv gefärbten Bereiche (braun) in den Plaques des Aortenursprungs. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7$.

3.2.5.6 Proliferation

Mittels Injektion des Thymidin-Analogons BrdU 24 h und 1 h vor Tötung der Mäuse konnten proliferierende Zellen immunhistochemisch detektiert werden. In der Fluoreszenzfärbung, dargestellt in Abbildung 51A, sind die Zellen mit inkorporiertem BrdU gelb angefärbt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Proliferationsrate wurde als Verhältnis der BrdU-positiven Kerne zur Gesamtzahl der Nuklei in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs bestimmt. Bei den *Has3-ApoE*-doppeldefizienten Tieren deutete sich ein Trend für eine erhöhte Proliferationsrate in den Läsionen an, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 51B).

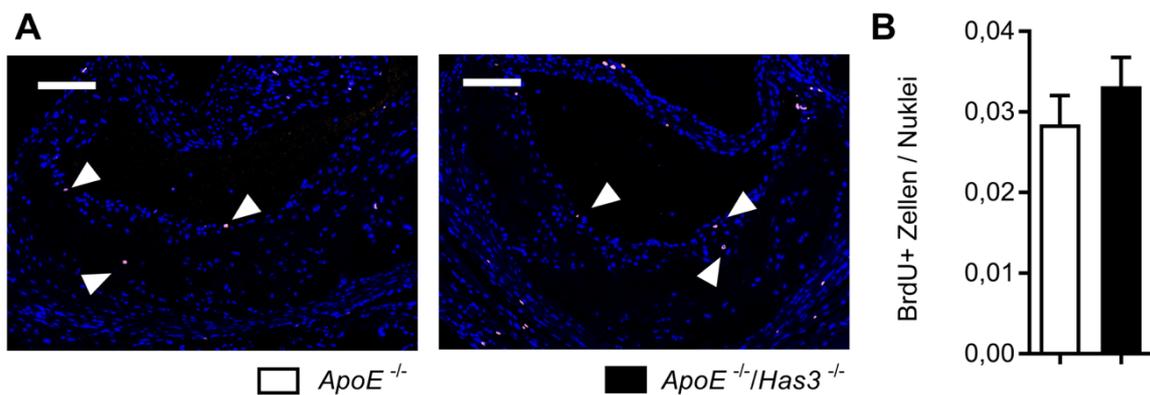


Abbildung 51: Detektion proliferierender Zellen im Aortenursprung.

A, Exemplarische Bilder einer immunhistochemischen Färbung von inkorporiertem BrdU (gelb) Zellkerne sind in Blau dargestellt. 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 μm . **B**, Die Proliferationsrate wurde bestimmt als die Anzahl BrdU-positiver Zellkerne zu der Gesamtzellkernzahl der Plaques im Aortenursprung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7$.

3.2.5.7 Apoptose

Apoptose und Nekrose von Zellen im atherosklerotischen Plaque verändern dessen Stabilität.¹⁷¹ Ein Zugrundegehen von VSMC führt zu einer Verdünnung der fibrotischen Kappe. Apoptose und Nekrose von Makrophagen verändert die Struktur des nekrotischen Kerns.¹⁷² Zur Analyse apoptotischer Zellen wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. In den Läsionen des Aortenursprungs von *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-} Tieren war ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen pro Gesamtzellzahl zu beobachten (Abbildung 52B). TUNEL-positive Zellen (rot) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Sie waren sowohl in der fibrotischen Kappe als auch im Kern der Läsion zu finden (Abbildung 52A).

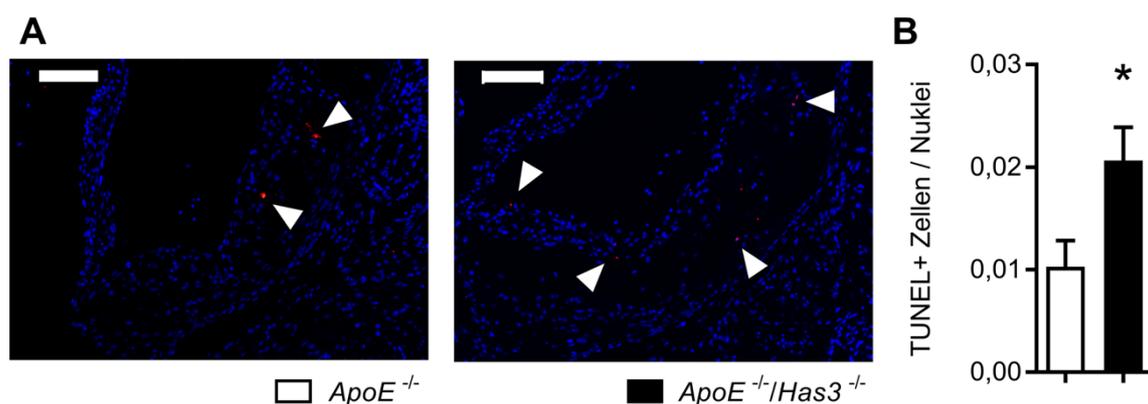


Abbildung 52: Detektion apoptotischer Zellen im Aortenursprung.

Apoptotische Zellen wurden im Aortenursprung mit einem *in situ* TUNEL-Kit rot angefärbt.

A, repräsentative Aufnahmen, Zellkerne sind in Blau dargestellt, 200-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 μm **B**, Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellkernzahl der Plaques im Aortenursprung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM, $n = 7$, * $p < 0.05$ vs. *ApoE*^{-/-}.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 sind Bestandteil des folgenden Manuskriptes:

Homann S, Grandoch M, Kiene LS, Podsvyadek Y, Feldmann K, Rabausch B, Nagy N, Kretschmer I, Lehr S, Oberhuber A., Bollyky P, and Fischer JW. Hyaluronan synthase 3 critically determines plaque inflammation in atherosclerosis. *Matrix Biol.* 2017; DOI: 10.1016/j.matbio.2017.09.005.

4 Diskussion

4.1 Das HA-System als therapeutische Zielstruktur bei kardiovaskulären Erkrankungen

Eine Modulation der HA-Synthese könnte in Zukunft eine therapeutische Option bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Die EZM prägt das Mikroumfeld der Zellen und beeinflusst so ihre Funktion auf vielfältige Weise. Im Verlauf vaskulärer Pathologien kommt es zu strukturellen Veränderungen der EZM. Eine deutliche Anreicherung von HA ist in atherosklerotischen Läsionen und in der Neointima von Restenosen nach Gefäßintervention zu beobachten.^{46, 72, 105-108} HA trägt dabei über verschiedene Mechanismen zu einer veränderten Zellfunktion bei: Ein HA-reiches Milieu moduliert zum einen die Immunantwort und ist zum anderen ein essentieller Bestandteil der schützenden endothelialen Glykokalyx.^{48, 109} Zudem beeinflusst HA durch seine proliferations- und migrationsfördernden Eigenschaften den VSMC-Phänotyp.⁷⁹ Die Ausbildung einer Neointima ist ein kritischer Schritt bei verschiedenen vaskulären Pathologien wie der Atherosklerose und der Restenose und durch eine ausgeprägte Migration und Proliferation von VSMC sowie die damit verbundene Umstrukturierung der EZM gekennzeichnet.⁵ Die Akkumulation von HA ist bedeutend für die Pathogenese, da sie einerseits direkt zum Volumen der Neointima beiträgt und andererseits die Zellfunktion der VSMC reguliert.^{79, 107, 112}

Derzeit liegt der Hauptfokus der Pharmakotherapie kardiovaskulärer Erkrankungen auf der Minimierung der Risikofaktoren beispielsweise durch Kontrolle der Blutlipidwerte oder des Blutdrucks. So konnte bereits eine Verbesserung der Mortalitätsrate erreicht werden, allerdings stellen kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin die häufigste Todesursache dar.^{173, 174} Derzeit wird klinisch erforscht, ob sich durch entzündungshemmende Maßnahmen z. B. mittels Methotrexat die vaskuläre Entzündung im Rahmen der Atherosklerose eindämmen lässt.^{175, 176} Für Canakinumab, einen monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β , konnte bereits eine signifikant geringere Rate an wiederauftretenden schweren kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden.¹⁷⁷ Canakinumab hatte keinen Effekt auf die Blutlipide.¹⁷⁷ Ein weiterer zukunftssträchtiger Ansatz ist, durch Impfung gegen Autoantigene protektive Autoimmunreaktionen für die Prävention und Therapie der Atherosklerose zu nutzen.^{22, 23} Zur Vermeidung von Restenosen kommen proliferationshemmende Stents und Ballonkatheter zum Einsatz.³⁷⁻³⁹

Eine Synthesehemmung von HA in VSMC könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die Neointimahyperplasie einzudämmen und so Atherosklerose und Restenose zu reduzieren.^{106, 178} Die HA-Matrix stellt ein komplexes System aus mehreren Synthesen, mehreren abbauenden Enzymen sowie einer Vielzahl an Hyaladhärienen und HA-Rezeptoren dar. Die Vielfalt der Funktionen von HA im Gefäßsystem macht eine therapeutische Nutzung

anspruchsvoll. Eine chronische pharmakologische Inhibierung der HA-Synthese aller drei HAS-Isoformen durch 4-MU hat sich in einer früheren Arbeit ungünstig auf das kardiovaskuläre System ausgewirkt.¹⁰⁹ Entgegen der in der Literatur beschriebenen pro-atherosklerotischen Wirkung der HA, ist unter 4-MU Behandlung eine verstärkte Atherosklerose beobachtet worden. Dies wurde mit einem Verlust der schützenden Glykokalyx des Endothels erklärt.¹⁰⁹ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine angepasste Synthesehemmung erforderlich sein wird, um positive therapeutische Effekte zu erzielen. Die Inhibition einzelner Synthesen könnte hier ein Therapieansatz sein, mit dem sich eine moderate Modulation der HA-Synthese erreichen lässt.

Bisher ist nicht hinreichend geklärt, ob die verschiedenen HAS-Isoenzyme und die von ihnen synthetisierte HA verschiedene Funktionen in VSMC ausüben und vaskuläre Pathologien unterschiedlich beeinflussen. Dies lässt sich nur durch eine gezielte genetische Deletion einzelner Synthesen feststellen. Strukturell unterscheidet sich das von den verschiedenen Isoformen gebildete Produkt nicht. Eine Hypothese ist, dass die Kettenlänge variiert.⁵³ Die Expressionsprofile der HAS-Isoformen sind im physiologischen und pathologischen Geschehen differentiell reguliert. Daher lassen sich Isoform-spezifische Funktionen der einzelnen Synthesen annehmen.¹⁷⁹ HAS2 nimmt eine wichtige Funktion in der vaskulären und kardialen Entwicklung ein.⁶² Dies lässt vermuten, dass die Hemmung der HAS2 bei kardiovaskulären Erkrankungen kein therapeutischer Ansatz mit einer positiven Nutzen/Risiko-Bilanz ist. Hingegen sind Knock-out Modelle der *Has3* lebensfähig und zeigen keine Störungen der Entwicklung und Reproduktion.⁶³ Die HAS3 könnte somit eine aussichtsreiche therapeutische Zielstruktur darstellen.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die HA-Synthese gezielt durch eine genetische Deletion der *Has3* vermindert und die funktionellen Auswirkungen auf vaskuläre Pathologien charakterisiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Funktion der HAS3 bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung analysiert. Dazu wurde erstmalig in einem neuen *Has3* Knock-out Mausmodell eine Carotisligatur durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die *Has3*-Defizienz vor Neointimahyperplasie schützt. Dies ließ sich über eine verminderte PDGF-BB vermittelte Migration von VSMC erklären.

Dieses Ergebnis war der Ausgangspunkt, um im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkungen der *Has3*-Deletion auf ein komplexeres Mausmodell der Atherosklerose, die *ApoE/Has3*-doppeldefizienten Mäuse, zu untersuchen. Die Belastung mit atherosklerotischen Läsionen wurde nach einer Fütterung mit Western-Diät über 15 Wochen analysiert. Hier zeigte sich eine geringere aortale Plaquebelastung in *ApoE/Has3*-doppeldefizienten Tieren.

4.2 *Has3*-Defizienz schützt vor Neointimahyperplasie nach Carotisligatur

Die Ausbildung einer Neointima ist eine charakteristische Antwort von Arterien auf verschiedene Gefäßverletzungen. Das Modell der Carotisligatur wurde gewählt, um erstmalig *in vivo* die Funktion der HAS3 auf die Neointimabildung zu untersuchen. 4 Wochen nach Carotisligatur war die Hyperplasie der Neointima bei *Has3*-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich geringer. Dabei waren die Fläche der Media und des Lumens unverändert. Die Zelldichte unterschied sich nicht signifikant zwischen den verglichenen Genotypen. Man kann folglich von einer proportionalen Abnahme von EZM und Zellzahl ausgehen. Es gibt verschiedene mögliche Mechanismen, über welche die Deletion der *Has3* die Neointimahyperplasie funktionell beeinflusst haben könnte. Diese werden im Folgenden näher betrachtet.

4.2.1 Kompensationsmechanismen

Zunächst galt es zu klären, ob der Verlust der HAS3 durch die beiden anderen Isoformen kompensiert werden kann. Beispielsweise wurde in Hautfibroblasten von *Has1/Has3*-doppeldefizienten Tieren ein Anstieg der *Has2*-Expression beobachtet.¹⁸⁰ Daher wurden die mRNA-Expressionen der *Has1* und *Has2* sowohl basal als auch 5 Tage nach Ligatur mittels qPCR analysiert. Hier war kein Unterschied zwischen den Genotypen zu beobachten. Auch schien die fehlende HA-Produktion der HAS3 nicht durch eine gesteigerte Synthese der anderen HAS-Enzyme kompensiert worden zu sein, wie die affinitätshistochemischen Färbungen von HA in der Carotis zeigten. Der Mangel an *Has3* äußerte sich in einem schwächeren Signal für HA in den ligierten Carotiden. Die quantitative Auswertung zeigte, dass HA vor allem in der Media signifikant reduziert war. Die Tatsache, dass der Verlust der HAS2 embryonal letal ist, gibt zudem Hinweis darauf, dass keine hinreichenden Kompensationsmechanismen zwischen den HA-Synthasen bestehen.⁶² Es ist daher anzunehmen, dass die beobachteten Effekte bei der Neointimaausbildung auf den direkten Verlust der *Has3* zurückzuführen sind.

4.2.2 VSMC-Phänotyp

Im gesunden Gefäß liegen VSMC in einem ausdifferenzierten Zustand vor, in dem sie nur in einem geringen Maße migrieren und proliferieren. Sie exprimieren einige markante Proteine wie alpha-Glattmuskelaktin (*Acta2*) und Transgelin (*SM22 α*), deren Expression als Marker verwendet werden kann, um den Differenzierungsgrad von VSMC zu charakterisieren.⁹ Um sich äußeren Bedingungen anzupassen, können VSMC dedifferenzieren und so ihre Zellproliferation, Migration sowie Matrix-Synthese steigern. Da die HA-Matrix die Zellfunktion moduliert, könnte die genetische Deletion der *Has3* die phänotypische Umwandlung der

VSMC zu einem dedifferenzierten mitogenen Zustand beeinflusst haben. Wie zu erwarten kam es nach Carotisligatur zu einer ausgeprägten phänotypischen Aktivierung der VSMC, wie die massive Herabregulation der Genexpression der VSMC-Differenzierungsmarker *Acta2* und *SM22 α* 5 Tage nach dem Eingriff zeigt.^{12, 181} Es war jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen zu beobachten. Auch die immunhistochemischen Färbungen von alpha-Glattmuskelaktin in Carotiden, die 28 Tage nach Ligatur entnommen wurden, ergaben keine Hinweise auf einen Unterschied in der VSMC-Differenzierung. Das deutliche Signal für alpha-Glattmuskelaktin zeigt aber, dass zu dem späten Zeitpunkt bereits eine Vielzahl der in die Neointima eingewanderten VSMC redifferenziert war.

Eingewanderte VSMC proliferieren in der Neointima und tragen zum Wachstum der Läsion bei, angeregt durch eine proliferationsfördernde HA-Matrix.¹⁰⁷ Eine Vielzahl an *in vitro* Arbeiten zeigt einen Einfluss der HA-Matrix auf die VSMC-Proliferation.^{65, 79, 182, 183} Eine perizelluläre Matrix, reich an HA und Versican, erleichtert die Proliferation von VSMC, da sie durch ihre viskosen Eigenschaften die Adhäsion der Zellen vermindern.⁷⁹ Über die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM vermittelt HA Signale, die das Zellwachstum anregen.⁴³ RHAMM ist zudem direkt an der Funktion der Mitosespindeln beteiligt.¹⁸⁴ Ein Knock-down der *HAS2* vermindert *in vitro* die Zellzyklus-Progression und die Proliferationsrate von VSMC.⁶⁵ Untersuchungen mit invasiven Tumorzellen zeigen klar, dass auch über *HAS3* die Zellproliferation und –migration angeregt wird. So führt in Prostatakarzinomzellen eine Überexpression der *HAS3* zu einem gesteigerten Zellwachstum.^{185, 186} Auch in humanen VSMC ist eine verminderte Proliferationsrate nach Knock-down der *HAS3* bzw. eine Steigerung nach Überexpression der *HAS3* beschrieben.⁷¹

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Proliferationsrate der VSMC 5 Tage nach Ligatur analysiert, da für diesen Zeitpunkt in früheren Arbeiten zur Carotisligatur eine maximale Proliferationsrate erkennbar war.^{138, 139} Ähnlich zu diesen Arbeiten waren mit 8 – 9 % deutliche Zellproliferationsraten erkennbar, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen an humanen CaSMC. Die Proliferationsrate blieb durch die lentivirale Herabregulation der *HAS3* unbeeinflusst.

Auch die Apoptoserate wurde 5 Tage nach Ligatur analysiert. In Folge einer Gefäßverletzung muss zwischen zwei Wellen der VSMC-Apoptose unterschieden werden. Ein erster Anstieg apoptotischer Zellen lässt sich in der Frühphase, ausgelöst durch das Gefäßtrauma, beobachten. Aber auch einige Tage nach Ligatur ist Apoptose zu beobachten, die der verstärkten Proliferation von VSMC und der Hyperplasie der Neointima entgegenwirkt.¹⁶³ Zum Untersuchungszeitpunkt 5 Tage nach Ligatur gab es keine Unterschiede in der Apoptoserate.

4.2.3 Entzündung

Eine Überproduktion von HA ist bei vielen entzündlichen Erkrankungen beobachtet worden, beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, in Inselzellen des Pankreas bei Patienten mit Typ-1 Diabetes oder bei rheumatoider Arthritis.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Meist vermittelt perizelluläre HA proinflammatorische Effekte, z. B. indem es die Leukozytenadhäsion, die Bindung von T-Zellen an Dendritische Zellen, die T-Zellaktivierung, die Phagozytose oder die Präsentation von Antigenen fördert.^{48, 190-193} In der Literatur wurde eine schützende Wirkung der *Has3*-Defizienz bei entzündlichen Erkrankungen des Darms, der Lunge oder der Adipositas-assoziierten Inflammation des weißen Fettgewebes beobachtet.^{63, 169, 194} Es ist gezeigt worden, dass HAS3 wichtig ist für eine gesteigerte HA-Synthese bei Entzündung des Endothels der Mikrovaskulatur; die synthetisierte HA ist besonders adhäsiv für Leukozyten.¹⁸⁷ Im Gegensatz dazu steht eine Arbeit, die eine verstärkte Leberschädigung und eine erhöhte Produktion entzündlicher Chemokine in *Has3* Knock-out Mäusen beschreibt.¹⁷⁰ Es wurde postuliert, dass HAS3 entzündliches Geschehen dadurch beeinflusst, dass es den Anteil an LMW-HA-Polymeren im Vergleich zu HMW-HA-Polymeren erhöht.^{53, 170} Ob dieser Effekt im Krankheitsgeschehen tatsächlich von Relevanz ist, lässt sich diskutieren, da im Gewebe immer auch Abbaumechanismen aktiv sind, welche die Länge der HA-Ketten zusätzlich beeinflussen.⁶³ Das Modell der Carotisligatur nach Lindner *et al.* bei normal cholesterämischen Mäusen ist vornehmlich durch VSMC-Proliferation und -Migration getrieben; Entzündungsprozesse spielen nur eine untergeordnete Rolle.¹³⁸

Als erste Charakterisierung, ob die Unterschiede bei der Neointimahyperplasie auf einem inflammatorischen Phänotyp beruhen, wurden Plasma-Zytokine und -Chemokine 5 Tage nach Carotisligatur mit einer Multiplex-Untersuchung bestimmt. Zirkulierende Chemokine und Zytokine waren weitestgehend unverändert, nur GM-CSF und IL-13 waren signifikant reguliert. Auffallend ist hier, dass sowohl ein antiinflammatorisches als auch ein proinflammatorisches Signalmolekül gleichermaßen verändert waren. Das hämatopoetische Glykoprotein GM-CSF stimuliert die Bildung von Granulozyten und Monozyten aus Stammzellen und fördert somit Entzündungen.^{195, 196} Das Überleben und die Aktivierung der reifen Entzündungszellen kann auch direkt von GM-CSF unterstützt werden.¹⁹⁷ IL-13 hingegen spielt eine wichtige Rolle in der T_H2-Immunantwort, die schützende Funktionen ausübt. So wird die Typ1-Entzündung abgemildert und die Regeneration von Gewebe und Wunden verbessert.¹⁹⁸ IL-13 verändert zudem die Polarisierung von Makrophagen. Mit IL-13 stimulierte Makrophagen zeichnen sich durch einen antiinflammatorischen Phänotyp aus (M2-polarisiert) und wirken dämpfend auf die proinflammatorischen M1-polarisierten Makrophagen.¹⁹⁹ Für IL-13 ist bei einigen Krankheitsbildern zudem eine profibrotische Wirkung beschrieben.²⁰⁰ Da sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Zytokine reguliert waren, erlauben die

Daten der Plasmauntersuchung keine Schlussfolgerung, in welcher Weise Entzündungsprozesse bei den *Has3*-defizienten Tieren verändert sind.

Die Ergebnisse der Gene Array Analyse wurden dahingehend untersucht, ob Signalwege des Entzündungsgeschehens in *Has3*-defizienten Tieren nach Ligatur verändert sind. Zudem wurden mit *Tnfa*, *Ccl2* (MCP-1) und *Il1b* einige ausgewählte Gene, die bei der Immunantwort reguliert sind, mittels qPCR untersucht. Auch diese Untersuchungen ergaben keinen Hinweis darauf, dass entzündliche Prozesse eine kausale Funktion im beobachteten Phänotyp spielen.

4.2.4 Endothelfunktion

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die *Has3*-Defizienz generelle Effekte auf die Endothelfunktion hat. Störungen der strukturellen und funktionalen Integrität der Endothelzellschicht tragen zum vaskulären Remodelling und der Anreicherung von VSMC in der Intima bei.²⁰¹ Die Endothelzellschicht bietet dem Gefäß eine Schutzbarriere gegen zirkulierende Entzündungszellen und -stimuli. Das Endothel selbst produziert zudem eine Vielzahl an Faktoren, die die Proliferation und Migration von VSMC beeinflussen, wie FGF, PDGF-BB oder TGF- β .²⁰² Untersuchungen von Nagy *et al.* aus dem Jahr 2010 zeigten, dass eine pharmakologische Inhibierung der HA-Synthese durch 4-MU die schützende Funktion der endothelialen Glykokalyx stört, was die Atheroskleroseentwicklung fördert.¹⁰⁹ Daher wurde hier die Auswirkungen einer *Has3*-Deletion auf das Endothel untersucht. Für erste Hinweise zur Endothelfunktion wurde zunächst der systolische Blutdruck bestimmt. Hier gab es keinen Unterschied zwischen den Genotypen. Auch die Herzfrequenz war unverändert.

Stickstoffmonoxid (NO), ein wichtiger gefäßschützender Botenstoff, wird im Endothel von der membrangebundenen eNOS produziert.²⁰³ NO aktiviert unter anderem cGMP-vermittelt die Gefäßrelaxation und somit die Regulation des Blutdrucks.¹⁴¹ NO hat auch direkt einen regulierenden Einfluss auf die Neointimahyperplasie, da es einen hemmenden Effekt auf die VSMC-Proliferation hat.²⁰⁴ Daher wurde die Proteinexpression der eNOS in Aorten mittels Western-Blot Analyse untersucht. Die unveränderte Proteinexpression der eNOS nach Deletion der *Has3* ergab keinen Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion. Auch die Untersuchung der Aorta *ex vivo* im Organbad zeigte eine unveränderte Endothelfunktion. Im Unterschied dazu ist nach pharmakologischer Hemmung der HA-Synthese mit 4-MU die Endothelfunktion beeinträchtigt und die Kontraktilität der Gefäße verstärkt, was sich unter anderem in einem erhöhten systolischen Blutdruck äußert.¹⁰⁹

4.2.5 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress, die Überproduktion von ROS, beeinflusst das vaskuläre Remodelling nach Gefäßverletzung.^{163, 164} Ein erhöhter oxidativer Stress der Zellen kann eine Vielzahl an Signalwegen wie NF-κB oder redox-sensible MAP-Kinasen aktivieren, die wiederum die proliferativen und apoptotischen Antworten der Zellen fördern.²⁰⁵ *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass HA vor oxidativen Schäden schützt, da sie ROS abfangen kann.^{206, 207} ROS bewirken dabei eine Depolymerisierung von HA.^{208, 209} Andererseits ist eine NADPH-Oxidase vermittelte ROS-Bildung an einer gesteigerten HA-Synthese und CD44-Aktivierung beteiligt.²¹⁰ Die Gene Array Analyse und die nachfolgende KEGG-Signalweganalyse ergab keinerlei Hinweise auf eine differentielle Regulation der Signalwege des oxidativen Stresses. Zudem wurde eine Oxyblot™ Analyse in Proben aus thorakalem Aortengewebe durchgeführt, um oxidative Proteinveränderungen zu detektieren. Hier waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten. Die Deletion der *Has3* scheint demnach nicht zu Veränderungen des oxidativen Stresses zu führen und wurde als mögliche Ursache für den beobachteten Phänotyp ausgeschlossen.

4.2.6 HAS3 fördert die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen

Die Migration von VSMC aus der Media in die Intima stellt einen initialen Schritt bei der Ausbildung vaskulärer Läsionen dar. In *Has3*-defizienten Mäusen ist die Anreicherung von HA in der Media ligierter Gefäße reduziert. Es ist anzunehmen, dass dies die VSMC-Migration beeinflusst.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl an Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen HA-Matrix und Zellmigration beschreiben. Allein schon durch ihre physikochemischen Eigenschaften erleichtert perizelluläre HA die Zellmigration, da sie ein Ablösen der Zelle vom Gewebsverband fördert.^{45, 79} Die Zelladhäsion wird durch extra- und perizelluläre HA vermindert, so dass die EZM für migrierende Zellen durchlässig wird.^{68, 79} Zudem wirkt HA über die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM pro-migratorisch.^{116, 120, 121, 211} Allerdings wurde auch eine Abnahme der Migrationsrate nach *HAS3*-Überexpression in VSMC beschrieben.¹¹⁷ Eine *in vitro* Überexpression der *Has1*, 2 oder 3 in murinen aortalen VMSC erschwerte ein Ablösen der Zellen und reduzierte ihre Proliferation und Migration. Bei Tumorzellen hingegen wurde *in vitro* nach *HAS3*-Überexpression eine verstärkte Migration beobachtet.^{185, 212}

Die Hypothese, dass die *Has3*-Deletion die VSMC-Migration abschwächt, wird von den Ergebnissen der Gene Array Analyse von unverletzten und ligierten Carotiden gestützt. Hier zeigte sich bei *Has3*-defizienten Mäusen eine deutlich verminderte Antwort der Genregulation im Vergleich zu WT-Kontrollen. Viele KEGG-Signalwege waren nach Carotisligatur nur in WT-Mäusen reguliert. Auffällig war, dass eine Vielzahl von Signalwegen, die den migratorischen VSMC-Phänotyp (z. B. Kontraktilität, Aktin-Zytoskelett, Fokale Adhäsionen und EZM)

widerspiegeln, in *Has3*-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren abgeschwächt waren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Genexpression von *PDGF-B* auch direkt von der Expression der *HAS3* beeinflusst war. In Carotiden von WT-Mäusen war nach Ligatur in der Gene Array Analyse eine signifikante Hochregulation von *Pdgf-b* mRNA zu beobachten; ein Effekt, der bei *Has3*-defizienten Tieren ausblieb. PDGF-BB ist einer der stärksten Stimuli für Zellproliferation und -migration. Er wird durch Thrombozyten, die an geschädigtem Endothel anhaften, nach Ligatur freigesetzt. Ursprünglich aus Blutplättchen isoliert, kann PDGF-BB jedoch von allen Zelltypen der Zellwand sezerniert werden, so auch von VSMC.^{213, 214} Eine Funktion von PDGF-BB bei der Neointimahyperplasie konnte im Tiermodell gezeigt werden.¹⁶⁶ Die Untersuchungen zeigen, dass PDGF-BB die Neointimaausbildung vor allem über pro-migratorische und weniger über pro-proliferative Effekte beeinflusst.^{68, 165} *In vitro* fördert PDGF-BB in VSMC die Ausbildung einer perizellulären HA-Matrix, die wiederum die Zellmigration anregt.⁷⁹

Da ein histologischer Nachweis der Zellmigration schwierig ist, wurde der Einfluss der *HAS3* auf die VSMC-Migration in ergänzenden Zellkultur-Versuchen mit humanen CaSMC verifiziert. Die PDGF-BB-induzierte VSMC-Migration war *in vitro* nach lentiviralem Knock-down der *HAS3* vermindert. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen, die in humanen VSMC eine reduzierte Migrationsrate nach Knock-down der *HAS3* mittels siRNA sowie eine verstärkte Zellmigration nach Überexpression der *HAS3* beobachtet haben.⁷¹ Zudem war die Expression typischer Gene der Zellmigration nach *HAS3* Knock-down in der qPCR-Analyse herabreguliert. Die Proliferationsrate war vom lentiviralem Knock-down der *HAS3* unbeeinflusst. Die beschriebenen *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse verdeutlichen, dass die Anwesenheit von *HAS3* für migratorische Prozesse bei der Bildung der Neointima unerlässlich ist.

Auch in CaSMC zeigte sich ein direkter Einfluss der *HAS3* auf die Genexpression von *PDGF-B*: nach lentiviraler Herabregulation der *HAS3* war die *PDGF-B* mRNA-Expression signifikant reduziert. Durch diesen Effekt auf die Expression von PDGF-B wird vermutlich die VSMC-Migration nach Gefäßverletzung in den *Has3* Knock-out Mäusen weiter abgeschwächt. Die *in vivo* und *in vitro* Daten weisen somit auf ein Zusammenspiel gegenseitiger Aktivierung zwischen *HAS3*, *PDGF-B*-Expression und PDGF-BB induzierter VSMC-Migration hin.

4.2.7 Regulation der HA-Rezeptoren durch PDGF-BB und IL-1 β

Die mRNA-Expressionen der HA-Rezeptoren *CD44* und *RHAMM* wurden in der Frühphase nach Carotisligatur mittels qPCR untersucht. Hier zeigte sich bei WT- und *Has3*^{-/-}-Mäusen gleichermaßen ein Anstieg der Genexpressionen. HA kann über CD44 und RHAMM die Migration und Proliferation von VSMC anregen.^{116, 120, 121} Bei Gefäßerkrankungen wurde eine vermehrte Expression der HA-Rezeptoren beobachtet.^{77, 129} Die Bedeutung der

HA-Rezeptoren für die Neointimaausbildung wurde bereits in früheren experimentellen Arbeiten gezeigt.^{130, 132} CD44 moduliert entzündliche Antworten *in vivo* so beispielsweise im Rahmen der Atherosklerose.^{56, 128} Im Modell der Carotisligatur zeigten *Rhmm*-defiziente Mäuse ein abgeschwächtes konstriktives Remodelling, wodurch der Lumendurchmesser verbessert war, obwohl die Neointimafläche selbst unverändert blieb.¹³² Für RHAMM ist neben seines Einflusses auf die Zellmigration auch eine Funktion in der Proliferation und der Teilungsgenauigkeit der Zellen beschrieben.¹³¹ RHAMM fungiert auf der Zelloberfläche als Co-Rezeptor für den PDGF-Rezeptor und beeinflusst so die Zellmotilität durch Aktivierung von ERK1, 2.^{78, 100}

Der Einfluss von PDGF-BB und IL-1 β auf die Genexpression der HA-Rezeptoren *RHAMM*, *LYVE-1* und *CD44* wurde *in vitro* in CaSMC zeitabhängig analysiert. Die Stimulation mit IL-1 β bewirkte einen deutlichen Anstieg der *CD44* mRNA-Expression, wie auch schon frühere Studien zeigten.¹⁶⁷ Auch *RHAMM* war durch die Stimulation mit IL-1 β reguliert, ein Effekt, der zeitverzögert nach 18 h auftrat. Unter Stimulation mit dem pro-migratorischen Wachstumsfaktor PDGF-BB war *RHAMM* ebenfalls nach einer Latenzzeit hochreguliert. Für *CD44* ergab sich nur eine minimale Hochregulation, die jedoch nach 24 h statistische Signifikanz erreicht hat. Für *RHAMM* ergab eine kombinierte Stimulation von IL-1 β und PDGF-BB eine additive Erhöhung der Genexpression.

Da die HA-Rezeptoren nach Carotisligatur hochreguliert sind, möglicherweise angeregt durch IL-1 β und PDGF-BB, ist anzunehmen, dass sie als Vermittler der migrationsfördernden Effekte der HAS3-abhängigen HA bei der Ausbildung einer Neointima fungieren.

Der zentrale Befund des ersten Versuchsteils war, dass sich eine *Has3*-Defizienz im Tiermodell schützend auf die Hyperplasie der Neointima auswirkt. Dies erklärt sich über einen hemmenden Effekt auf den VSMC-Phänotyp, vor allem die PDGF-BB vermittelte Migration. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 53 schematisch dargestellt.

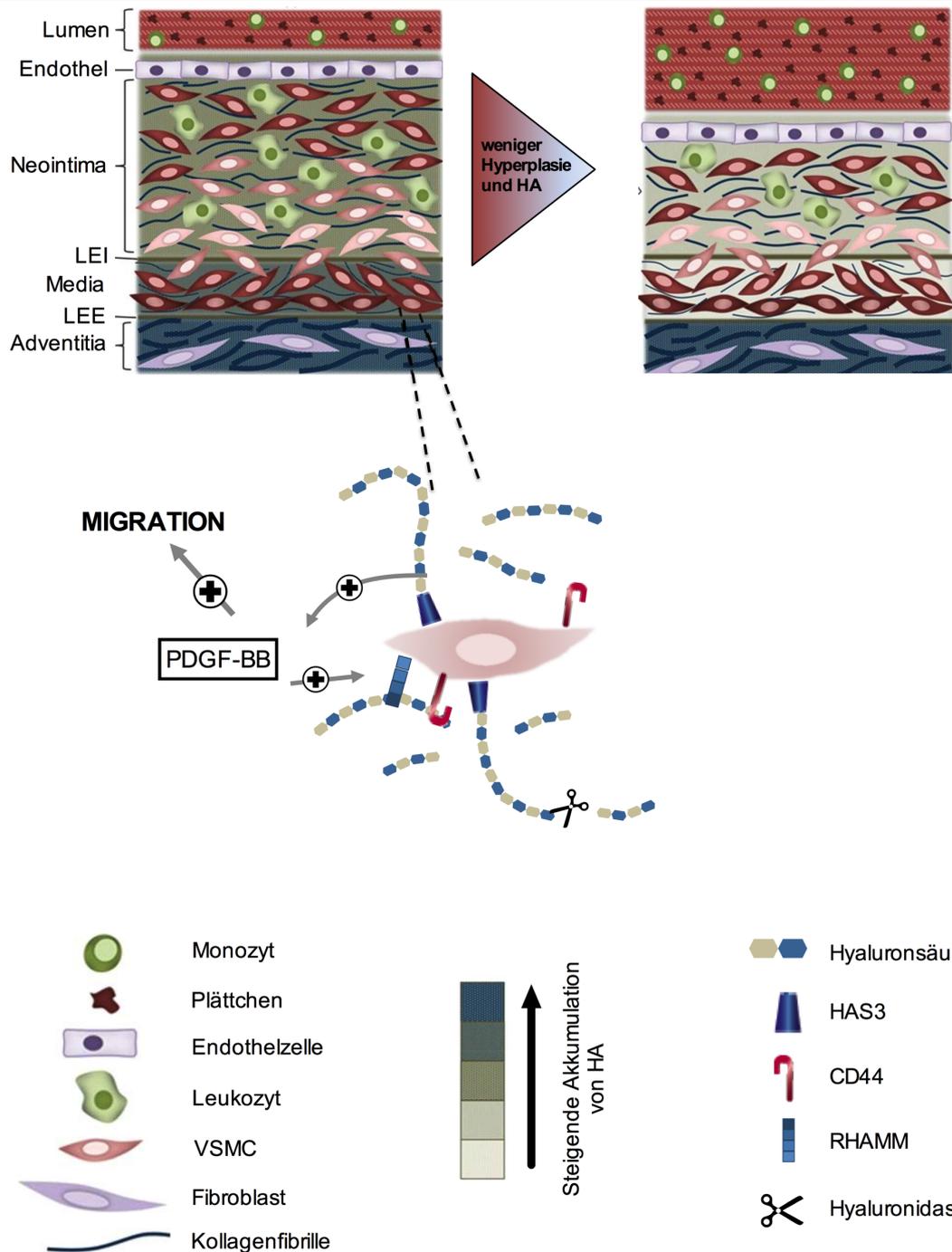


Abbildung 53: Zusammenfassende Abbildung der Funktion von HAS3 bei der Ausbildung einer Neointima. Modifiziert nach Puré et al. 2016.¹⁷⁹

Der Differenzierungsgrad der VSMC ist durch einen roten Farbgradienten gekennzeichnet; differenzierte VSMC sind in dunklem Rot dargestellt. Die verschiedenen Schattierungen der EZM zeigen Unterschiede in der Anreicherung von HA. Die HA-Akkumulation nach Carotisligatur war in *Has3*-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp reduziert; Unterschiede zeigten sich vor allem in der Media. Dies deutet auf eine biologische Funktion der von HAS3 synthetisierten HA auf die VSMC-Migration und auf die Ausbildung einer Neointima hin. LEE: *Lamina elastica externa*, LEI: *Lamina elastica interna*.

Der vergrößerte Bereich zeigt eine phänotypisch aktivierte VSMC. Die HAS3-abhängige HA-Matrix fördert die PDGF-BB induzierte Migration der VSMC. Zudem war die *PDGF-B* mRNA-Expression HAS3 abhängig reguliert. Die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM sind nach Carotisligatur vermehrt exprimiert. Unter PDGF-BB ist die Expression von *CD44* und *RHAMM* in VSMC induziert.

4.3 *Has3*-Defizienz reduziert aortale atherosklerotische Läsionen

Die Ausbildung einer Neointima durch VSMC ist auch bei der Atherosklerose ein kritischer Schritt, da sie zur zunehmenden Verengung des Gefäßes beiträgt. Ziel des zweiten Teils der Arbeit war daher zu untersuchen, ob sich die im Modell der Carotisligatur beobachteten schützenden Effekte der *Has3*-Deletion auf die VSMC-Funktion auch positiv auf die Atherogenese auswirken. Dazu wurde ein neues Mausmodell generiert, mit einer kombinierten genetischen Deletion der *ApoE* und der *Has3*, bei dem man durch Fütterung mit einer Western-Diät die Entwicklung der Atherosklerose beschleunigte. Im Vergleich zum Modell der Carotisligatur in C57Bl/6J-Wildtypen, bei dem VSMC-Proliferation und -Migration im Vordergrund stehen, handelt es sich bei den *ApoE*-defizienten Mäusen um ein komplexeres Modell. C57Bl/6J-Wildtypen entwickeln unter normalen Bedingungen keine Atherosklerose, da sich der murine Fettstoffwechsel von dem des Menschen unterscheidet. Cholesterin wird hauptsächlich in HDL-gebundener Form verpackt, während beim Menschen Cholesterin in pro-atherogenen LDL-Partikeln transportiert wird.²¹⁵ Mäuse mit *ApoE*-Defizienz weisen einen veränderten Cholesterinstoffwechsel auf, wodurch pro-atherosklerotische Bedingungen hergestellt werden.^{137, 215} Chylomikronen und VLDL-Cholesterin, die üblicherweise gebunden an ApoE zurück zur Leber transportiert werden, liegen in *ApoE*-defizienten Tieren verstärkt frei im Plasma vor und bewirken die spontane Ausbildung atherosklerotischer Plaques.²¹⁶ Durch ein Zusammenspiel verschiedener Zellarten, humorale Einflüsse und die veränderte Stoffwechsellage entstehen Läsionen, die humanen atherosklerotischen Plaques sehr ähneln.²¹⁶⁻²¹⁸

4.3.1 Auswirkungen der *Has3*-Defizienz auf die Größe atherosklerotischer Läsionen in der Aorta

Den Ergebnissen zufolge schützt eine *Has3*-Defizienz vor Atherosklerose. *ApoE*^{-/-}- und *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäuse entwickelten im Verlauf der Fütterung mit cholesterinreicher Western-Diät für 15 Wochen ausgeprägte atherosklerotische Läsionen. Bei *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäusen war die Atherosklerose in der Aorta signifikant geringer ausgeprägt als in *ApoE*^{-/-}-Kontrollen. Diese Abnahme aortaler atherosklerotischer Läsionen war sowohl entlang der thorakalen und abdominalen Aorta als auch im Aortensinus zu beobachten.

Allerdings ist dabei zu beachten, dass die *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäuse ein geringeres Körpergewicht zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufwiesen als *ApoE*^{-/-}-Kontrollen. Dies könnte die Läsionsgröße beeinflusst haben. Untersuchungen zum Einfluss der Adipositas auf die Atherogenese beschreiben eine Korrelation zwischen der Gewichtszunahme und der Läsionsgröße.²¹⁹ Möglicherweise kommen in *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäusen HA-abhängige Unterschiede im Fettstoffwechsel zum Tragen. Eine Arbeit, die den Einfluss einer Inhibierung der HA-Synthese mittels 4-MU in diabetogen gefütterten Mäusen untersucht hat, zeigte eine

reduzierte Adipositas sowie eine verringerte Hypertrophie und Entzündung des Fettgewebes.¹⁹⁴ Hingegen wurde in ubiquitär *Has3*-defizienten Mäusen kein verringertes Körpergewicht unter diabetogener Diät beobachtet, jedoch war die Hypertrophie im weißen Fettgewebe verringert.¹⁹⁴ Die in den vorliegenden Untersuchungen verwendete Western-Diät unterscheidet sich von der diabetogenen Diät durch einen geringeren Glucose-Anteil. Zudem wurde ein anderes Mausmodell verwendet, ohne *ApoE*-Defizienz; die Tiere wiesen somit einen unterschiedlichen Cholesterin-Stoffwechsel auf.²¹⁵ Weitere Untersuchungen zeigen eine verminderte Adipositas und Insulinresistenz in *ApoE*-defizienten Tieren.^{220, 221} Diese Einflussfaktoren könnten Grund für die abweichenden Ergebnisse sein. Die Frage, wie sich die *Has3*-Defizienz im gewählten Modell auf die Gewichtszunahme, die Körperfettmasse und die Hypertrophie und Inflammation des Fettgewebes auswirken, wird in laufenden Versuchen untersucht. Die Plasmalipidwerte waren jedoch in *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}- und *ApoE*^{-/-}-Mäusen durch die Fütterung mit cholesterinreicher Diät gleichermaßen erhöht.

4.3.2 Plaquemorphologie im Aortenursprung

Trotz der festgestellten inhibierenden Wirkung der *Has3*-Defizienz auf die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta, konnte im Aortenursprung kein Unterschied in der Plaquegröße beobachtet werden. Dies könnte sich dadurch erklären, dass in dieser Gefäßregion die Läsionsgröße bereits fortgeschritten war. Die Migration und Proliferation von VSMC trägt vor allem in der Frühphase der Atherogenese zur Vergrößerung der Läsion bei.²⁸ Es ist anzunehmen, dass das fortgeschrittene Stadium der untersuchten Läsionen und deren zelluläre Zusammensetzung vorausgegangene Effekte der *Has3*-Deletion auf den Phänotyp der VSMC und deren Migrationsvermögen verschleiert haben. Dies könnte den Unterschied zwischen den Beobachtungen zur Plaquebelastung in der Aorta und im Aortenursprung erklären. Um funktionelle Unterschiede in der Atherogenese zwischen *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}- und *ApoE*^{-/-}-Mäusen aufzeigen zu können, müsste zukünftig ein früherer Zeitpunkt für die Probenentnahme gewählt werden.

Die Größe atherosklerotischer Läsionen ist ein wichtiges Maß um die Atherogenese zu charakterisieren. Durch die Läsionen kommt es zu einer Gefäßstenose und der Widerstand des Blutflusses verändert sich. Die Plaquegröße allein gibt jedoch keine Hinweise auf mögliche Folgekomplikationen. Daher wurden histologische Färbungen des Aortenursprungs vorgenommen, um zu klären, ob es strukturelle Unterschiede in den Läsionen der beiden Genotypen gibt.

4.3.2.1 Struktureller Aufbau

Zunächst wurde die Zelldichte in den atherosklerotischen Plaques bestimmt. Hier gab es keinen statistischen Unterschied. Man kann daher von einer gleichen Verteilung von Zellen

und EZM ausgehen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zur Zelldichte nach Carotisligatur, auch hier haben Zellen und EZM bei der verringerten Neointimahyperplasie proportional abgenommen.

Die Betrachtung der Schnitte des Aortenursprungs zeigt in der Größe des nekrotischen Kerns und der Dicke der fibrotischen Kappe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Das vergrößerte nekrotisches Areal im Kern der Läsionen deutet darauf hin, dass die Atherosklerose im Aortenursprung bereits fortgeschritten war. In fortgeschrittenen Läsionen haben bereits deutliche strukturelle Umwandlungen der Gefäßwand stattgefunden. Eine Ansammlung phänotypisch aktivierter VSMC sowie eine Fülle verschiedener Immunzellen können in den Läsionen beobachtet werden. Instabile Läsionen zeichnen sich durch eine veränderte Zusammensetzung der EZM, vergrößerte nekrotische Areale sowie eine verdünnte fibrotische Kappe aus.¹⁶⁸ Durch eine unvollständige Efferozytose, der Entfernung apoptotischer Zellen, und durch Nekrose bildet sich im Verlauf der Atherosklerose ein großer Lipid-gefüllter nekrotischer Kern.¹⁷² Akkumulierende apoptotische Zellen bewirken eine sekundäre Nekrose, die wiederum die Entzündungsantwort weiter vorantreibt.²²²

4.3.2.2 Apoptose

Apoptose-positive Zellkerne wurden mit Hilfe der TUNEL-Methode, die Apoptose-bedingte DNA-Strangbrüche detektiert, angefärbt. Apoptose wurde in atherosklerotischen Läsionen sowohl für VSMC als auch für Makrophagen beschrieben.²²³ Vor allem in vulnerablen Plaques kann Apoptose von VSMC beobachtet werden, was die Stabilität der fibrotischen Kappe verschlechtert.¹⁷¹ Die *in situ* TUNEL-Färbung zeigte einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen in Läsionen von Tieren mit *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Defizienz. TUNEL-positive Zellkerne waren sowohl in der fibrotischen Kappe als auch im Kern der Läsion zu finden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den TUNEL-Färbungen der Carotiden von *Has3*-einfachdefizienten Tieren, bei denen kein Unterschied in der Apoptoserate beobachtet wurde. Hinweise darauf, dass eine verminderte HA-Matrix die Apoptose von VSMC verstärkt, gaben auch *in vitro* Untersuchungen von Vigetti *et al.* aus dem Jahr 2011.²²⁴ Die Behandlung von VSMC mit 4-MU bewirkte einen Anstieg an apoptotischen Zellen. Dieser Effekt ließ sich durch Zugabe von HA ins Medium aufheben, da über CD44 und TLR4 ein anti-apoptotischer PI3K-Signalweg angeregt wurde. Untersuchungen an Mäusen, bei denen die Apoptose von Makrophagen gestört ist, haben gezeigt, dass sich Apoptose in frühen atherosklerotischen Läsionen atheroprotektiv auswirkt. In fortgeschrittenen Plaques führt eine gestörte Entfernung von Zelltrümmern apoptotischer Zellen allerdings zu einer Zunahme des lokalen Entzündungsgeschehens.²²²

Die beobachtete verstärkte Apoptose in Läsionen des Aortenursprungs von *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Mäusen ist somit ein unerwarteter Phänotyp und widersprüchlich zu den atheroprotektiven Effekten, die die genetische Deletion der *Has3* auf die Läsionsbildung in der Aorta ausgeübt hat. Vermutlich hat auch hier das Stadium der Läsionen einen Einfluss. Es ist

möglich, dass sich die HAS3-vermittelte verstärkte Apoptose in frühen Läsionen günstig ausgewirkt hat und zur Reduktion des Plaquebesatzes in der Aorta beigetragen hat. Hingegen könnten in späteren Läsionen die negativen Effekte der Apoptose überwiegen und die atheroprotektive Wirkung der *Has3*-Defizienz überlagern. Um diese Frage detailliert zu klären sind Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten sowie Doppelfärbungen mit zellspezifischen Markern nötig.

4.3.2.3 Zellproliferation

Ein möglicher Effekt der HAS3-vermittelten HA-Matrix, der die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques beeinflusst haben könnte, ist die Regulation der Zellproliferation.^{65, 79, 182, 183, 185, 186} Mit Hilfe des Antimetaboliten BrdU wurden proliferierende Zellen in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs angefärbt. Hier war kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate zu erkennen. Da die Proliferationsrate in den *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Tieren tendenziell erhöht war, konnte ein pro-proliferativer Effekt der *Has3*-abhängigen HA-Matrix nicht bestätigt werden.^{185, 186} Dieser Trend zu einer verstärkten Proliferation könnte der gesteigerten Apoptose entgegengewirkt haben. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Untersuchungen zur Proliferation in den *Has3*-einfach-defizienten Tieren und den *in vitro* Untersuchungen in CaSMC, die keinen signifikanten Unterschied zeigten.

Da nur ein Erstantikörper gegen den Proliferationsmarker BrdU verwendet wurde, geben die immunhistologischen Färbungen keinen Aufschluss darüber, welche Zellen in den atherosklerotischen Läsionen proliferieren. In der Frühphase der Atherogenese trägt die Proliferation der VSMC zur Vergrößerung der Läsion bei.^{34, 225} Bei fortgeschrittenen Plaques kann eine verstärkte VSMC-Proliferation günstig für die Stabilität der Läsion sein, da sie die fibrotische Kappe stärkt.²⁸ Auch eine lokale Proliferation von Makrophagen trägt zu ihrer Anreicherung in atherosklerotischen Läsionen bei.^{226, 227} Durch Doppelfärbungen mit zellspezifischen Markern ließe sich näher charakterisieren, welche Zellen in den atherosklerotischen Läsionen proliferieren.

4.3.2.4 Alpha-Glattmuskelaktin-positive Zellen

Die Anzahl sowie die Lokalisation von VSMC in einer atherosklerotischen Läsion können Aufschluss über ihre Stabilität geben. VSMC bilden in fortgeschrittenen Läsionen die fibrotische Kappe und schützen den Plaque vor Ruptur.²²⁸ Daher wurden die Schnitte des Aortenursprungs mit einem Antikörper gegen alpha-Glattmuskelaktin, einem Marker für differenzierte VSMC, immunhistochemisch gefärbt. Da die Ansammlung von VSMC in der äußeren Kappe ausschlaggebend für die Stabilität der Läsionen ist, wurde der Anteil alpha-Glattmuskelaktin-positiver Areale in einer 50 µm breiten, zum Lumen hin gerichteten

Kappe analysiert. Hier ergab sich kein Unterschied zwischen den Genotypen. In beiden Gruppen war die Schicht alpha-Glattmuskelaktin-positiver Zellen diskontinuierlich, ein typisches Zeichen fortgeschrittener Läsionen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass alpha-Glattmuskelaktin differenzierte VSMC anfärbt. Mit der Wandlung ihres Phänotyps verlieren VSMC ihre markanten Proteine bzw. exprimieren untypische Charakteristika. Einige Zellen, die ursprünglich mediale VSMC waren, wurden daher vermutlich nicht angefärbt.¹² Es ist jedoch *in vivo* und *in vitro* gezeigt worden, dass VSMC und myeloische Zellen transdifferenzieren können.^{25, 229-233} Umgekehrt könnten folglich auch Zellen die von Knochenmarks-Monozyten abstammen positiv für alpha-Glattmuskelaktin sein. Der Ursprung der Zellen in atherosklerotischen Läsionen lässt sich nur mit Mausmodellen untersuchen, die die Abstammungslinien der Zellen charakterisieren (bewertet in Bennet *et al.* 2016).²⁸

4.3.2.5 Kollagengehalt und -packungsdichte

Eine histochemische Färbung der Kollagenfasern liefert Hinweise zu möglichen Unterschieden in der Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen. Kollagen bildet den größten Teil der EZM atherosklerotischer Läsionen.²³⁴ In der fibrotischen Kappe geben Kollagenfasern der Läsion Halt.^{228, 235} Bei vulnerablen Plaques ist ein verminderter Kollagengehalt beschrieben, da die Synthese vermindert und der Abbau verstärkt ist.^{236, 237} Mit dem Fortschreiten der Atherosklerose steigt der Kollagengehalt der Läsionen an.²³⁸ Die Färbung des Aortenursprungs mit Picro-Siriusrot zeigte keinen Unterschied im Gesamtkollagengehalt. Wie für fortgeschrittene Läsionen typisch, war mit durchschnittlich 56 % pro Plauefläche ein ausgeprägter Kollagenanteil detektierbar.²³⁸ Die Betrachtung der Färbung unter polarisiertem Licht zeigte, dass die Packungsdichte der Kollagenfasern ebenfalls unbeeinflusst blieb.

4.3.2.6 Makrophagenretention

Eine Vielzahl pathologischer Einflüsse sind für die Atherogenese bedeutend. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich zunächst auf die Charakterisierung des HA-Systems im Kontext des VSMC-Phänotyps. Jedoch ist anzunehmen, dass auch andere für die Atherosklerose bedeutende Zell-Funktionen durch die *Has3*-Defizienz verändert sind. So könnte die immunmodulierende Wirkung des HA-Systems die Atherosklerose entscheidend beeinflussen. Zentraler Aspekt der Atherogenese ist eine chronische Entzündung der vaskulären Läsionen.¹⁵ Entzündliche Vorgänge sind in allen Phasen der Atherogenese relevant, von der ersten Adhäsion der Leukozyten an das aktivierte Endothel bis zur Ruptur der fortgeschrittenen Läsion.¹⁵ Eine Anreicherung von HA in makrophagenreichen Regionen atherosklerotischer Plaques ist in der Literatur beschrieben.^{239, 240} Die Hypothese ist, dass HA dort Makrophagen bindet und deren Retention unterstützt.¹⁹⁰ HA auf der Oberfläche von Endothelzellen vermittelt die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut in die Gefäßwand. Leukozyten exprimieren

CD44 auf ihrer Oberfläche, was an HA auf der Endotheloberfläche CD44- und RHAMM-vermittelt binden kann.^{103, 241, 242} Zudem regt die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β durch Monozyten und Makrophagen eine HAS3-vermittelte HA-Synthese in VSMC an.^{65, 71}

Für einen ersten Hinweis auf einen Entzündungsphänotyp bei den *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Tieren, wurden die atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs mit dem Makrophagenmarker MAC2 gefärbt. Wie für fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen typisch, war in den Läsionen eine deutliche Färbung für MAC2 erkennbar. Eine hohe Makrophagendichte wiesen vor allem die Oberfläche der Plaques und die Plaqueschultern auf. Die MAC2-Färbung ergab keine Hinweise auf Unterschiede in der Makrophagenretention in den atherosklerotischen Läsionen der *ApoE^{-/-}/Has3^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu *ApoE^{-/-}*-Kontrollen. Auch für diese Untersuchung ist limitierend, dass sich die Expression des Makrophagenmarkers MAC2 im Laufe der Atherogenese verändert und beispielsweise auch von VSMC exprimiert werden kann.²⁵ Einen detaillierteren Aufschluss über das Zusammenwirken der verschiedenen Entzündungszellen könnte eine durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Entzündungszellpopulationen liefern.²⁴³ Diese Experimente werden aktuell im Labor durchgeführt. Bisher gibt es drei Arbeiten mit einem anderen *Has3* Knock-out Modell zur Funktion der HAS3 in entzündlichen Krankheitsmodellen. Hier wurden sowohl protektive als auch proentzündliche Effekte einer ubiquitären *Has3*-Defizienz beobachtet.^{63, 169, 170}

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die genetische Deletion der *Has3* im Atherosklerosemodell der *ApoE/Has3* doppel-defizienten Maus nach 15 Wochen Fütterung einer proatherogenen Diät schützend auf die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta ausgewirkt hat. Diese protektive Wirkung war jedoch in den Läsionen des Aortenursprungs nicht erkennbar, was auf eine kontextabhängige Wirkung der HAS3-abhängigen HA-Matrix auf die Atherogenese hindeutet. Die Plaques des Aortenursprungs zeigten eine erhöhte Apoptoserate bei unveränderter Proliferation, VSMC-Gehalt, Makrophagenretention und Zelldichte. Zur genaueren Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen ist die Analyse kürzerer Fütterungszeiträume notwendig. Diese Untersuchungen sind Gegenstand aktueller Forschung.²⁴³

4.4 Ausblick und Limitationen

Die hier dargestellten Ergebnisse sowie die Literaturrecherche lassen darauf schließen, dass vor allem die HAS3-Expression in VSMC für die Neointimabildung relevant ist, während andere Zelltypen, wie Endothelzellen oder Entzündungszellen, nur eine untergeordnete Rolle spielen. Jedoch ist ein Nachteil eines ubiquitären Knock-out Modells, dass die Ergebnisse nicht eindeutig auf die Beteiligung einzelner Zellen zurückzuführen sind. Allerdings deutet die Auswertung der differentiell regulierten KEGG-Signalwege darauf hin, dass insbesondere die HAS3-HA-Matrix der VSMC wesentlich für den beobachteten Phänotyp ist. Diese Beobachtung wird zudem durch die *in vitro* generierten Ergebnisse unterstützt. Um diese Hypothese abschließend zu bestätigen, müsste die Neointimahyperplasie nach Carotisligatur in zellspezifischen Knock-out Modellen, vor allem in einem VSMC-spezifischen Knock-out Modell, untersucht werden. Eine Untersuchung der HAS3 in einem endothelspezifischen Knock-out Modell würde eine genauere Antwort zur Rolle der HAS3 auf die Endothelfunktion liefern. Die Frage, welche Rolle HA bei der Vermittlung zellspezifischer Effekte spielt, ist gerade auch im komplexeren Tiermodell der Atherosklerose interessant.

Mögliche Ungenauigkeiten der Ergebnisse könnten darin begründet sein, dass im Modell der Neointimaentwicklung aus ethischen Gründen weibliche Mäuse verwendet wurden. Die weiblichen Hormone haben erwiesenermaßen einen Einfluss auf das HA-System.²⁴⁴ Somit könnten Schwankungen im Rahmen des Zyklus zu Streuungen bei den erhobenen Daten geführt haben. Um dieses Problem zu umgehen, wurde vor dem operativen Eingriff der Zyklus der Tiere synchronisiert. Im zweiten Versuchsteil, dem Modell der akzelerierten Atherosklerose, wurde vorsorglich mit männlichen Versuchstieren gearbeitet.

Der Beweis für die Bedeutung der HAS3 auch im Kontext der Atherogenese konnte mit Hilfe *ApoE/Has3*-doppeldefizienter Tiere gezeigt werden, die in der Aorta eine verminderte Plaquebelastung aufwiesen. Um die akuten und chronischen Effekte einer *Has3*-Deletion auf die Pathogenese der Atherosklerose hinreichend zu charakterisieren, werden jedoch weitere detaillierte Untersuchungen benötigt. Ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten Effekte ist, dass sich die im Modell der Carotisligatur beobachtete hemmende Wirkung der *Has3*-Deletion auf die PDGF-vermittelte VSMC-Migration auch positiv auf die Atheroskleroseentwicklung ausgewirkt hat. Das *ApoE*^{-/-}-Modell ist allerdings ein komplexes Tiermodell, bei dem die vielfältigen Vorgänge der humanen Plaqueentstehung simuliert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die *Has3*-Defizienz die Plaqueentwicklung auch über weitere Prozesse als die VSMC-Migration beeinflusst hat. Eine dezidierte Erklärung für die beobachtete reduzierte Atheroskleroseentwicklung konnte somit im Rahmen dieser Arbeit noch nicht gefunden werden. Die Untersuchung verschiedener Fütterungszeitpunkte und eine detaillierte Betrachtung der Entzündungszellpopulationen sind Gegenstand aktueller Forschung.²⁴³

Nicht abschließend beantwortet ist die Frage, ob die beobachteten Veränderungen durch die genetische Deletion der *Has3* auf von HAS3-synthetisierter HA beruhen, oder ob das Protein eine HA-unabhängige Funktion im Krankheitsgeschehen ausübt. Da der Verlust der HAS3 auch mit einer verringerten HA-Menge, vor allem in der Media, verbunden war, lässt sich jedoch vermuten, dass die Effekte auf einer veränderten HA-Matrix beruhen.

Bei den hier beschriebenen Arbeiten handelt es sich um prä-klinische Forschung an isolierten humanen Zellen und im Mausmodell. Der Beweis der Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf humane vaskuläre Pathologien steht noch aus. Beispielsweise unterscheidet sich das murine Profil der Plasmalipide von dem des Menschen.²¹⁵ Bisher gibt es keine HAS-Isoform-spezifischen Antagonisten in der prä-klinischen und klinischen Forschung. Bevor ein klinischer Einsatz sinnvoll ist, muss zunächst die Erforschung gewebs- und HA-Synthase-spezifischer Modulationen weiter vorangetrieben werden.

5 Zusammenfassung

Eine Hyperplasie der Intima verursacht nach Gefäßverletzungen und bei der Atherosklerose eine Verengung des Gefäßlumens. Umbauprozesse der arteriellen Extrazellulärmatrix (EZM) spielen dabei eine kritische Rolle, da sie zum einen direkt an der Volumenausdehnung der Neointima beteiligt sind und zum anderen die Zellfunktionen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) regulieren. Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (HA) ist Bestandteil der EZM und begünstigt Zell-Migration und –Proliferation. HA wird von drei transmembranären Synthasen (HAS1, -2, -3) synthetisiert. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich eine HAS3-spezifische Hemmung der HA-Synthese auf die Neointimaausbildung nach Gefäßintervention und die Atheroskleroseentwicklung auswirkt.

Im Modell der Carotisligatur konnte eine Isoform-spezifische Funktion der HAS3 auf die Neointimahyperplasie gezeigt werden. Die Ausbildung einer Neointima war 28 Tage nach Ligatur in *Has3*-defizienten Mäusen (*Has3*^{-/-}) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren deutlich reduziert. Zelldichte, Apoptose und Proliferation waren in der Neointima unverändert, was für eine proportionale Abnahme von Zellzahl und EZM spricht. In Gefäßen *Has3*-defizienter Tiere war die Anreicherung von HA nach Ligatur reduziert, am deutlichsten ausgeprägt in der Media. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die reduzierte Neointimahyperplasie vor allem auf einer verminderten VSMC-Migration beruht. Die Analyse des Transkriptoms unterstützt diese Hypothese; in *Has3*-defizienten Carotiden waren nach Ligatur verschiedene Signalwege, die mit VSMC-Migration im Zusammenhang stehen, in geringerem Maße differentiell reguliert. *In vitro* Experimente mit humanen koronararteriellen VSMC bestätigen, dass die migratorische Antwort auf PDGF-BB HAS3-abhängig ist. Die *PDGF-B*-Genexpression war *in vivo* und *in vitro* in Abwesenheit von HAS3 vermindert.

Auch auf die Atheroskleroseentwicklung wirkt sich die *Has3*-Defizienz schützend aus, wie die reduzierte Plaquebelastung in der Aorta von Apolipoprotein E/*Has3* doppeldefizienten Mäusen (*ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}) im Vergleich zu *ApoE*^{-/-}-Kontrollen zeigt. Im Aortenursprung waren die Läsionen fortgeschritten, die Läsionsgröße unterschied sich jedoch nicht zwischen den Genotypen. Die histologische Untersuchung der Plaquemorphologie zeigte einen Anstieg der Apoptoserate in Läsionen *ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}-Mäusen, bei unveränderter Zelldichte, Proliferation, VSMC-Gehalt und Makrophagenzahl.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine Rolle der HAS3 bei der Ausbildung vaskulärer Läsionen hin. Nach Carotisligatur vermittelt die HAS3-abhängige HA-Synthese die Aktivierung von VSMC durch verschiedene Signalwege und verstärkt die PDGF-BB-abhängige VSMC-Migration. Dies verstärkt *in vivo* die Neointimahyperplasie. Auch auf die Atherogenese hat die genetische Deletion der *Has3* eine protektive Wirkung.

6 Summary

Intimal thickening causes luminal narrowing after angioplastic surgery and during atherosclerosis. Remodeling of the arterial extracellular matrix (ECM) is critically involved in these pathologies because it directly contributes to neointimal volume expansion and regulates smooth muscle cell responses. The ECM component hyaluronan (HA) is thought to regulate cell migration and proliferation. HA is synthesized by three transmembrane HA-synthase isoenzymes (HAS1, -2, -3). Objective of the current study was to assess the effects of HAS3-specific inhibition of HA-synthesis on neointima formation after vascular injury and on atherogenesis.

An isoform-specific-role for HAS3 in neointimal hyperplasia could be demonstrated in a model carotid artery ligation. Neointima formation was strongly attenuated 28 days after surgery in *Has3*-deficient mice (*Has3*^{-/-}) compared to wildtype controls (WT). Neointimal cellular density, apoptosis and proliferation was not altered, indicating a proportional decrease in cell number and ECM. Strong accumulation of HA was observed in vessels in response to carotid ligation, whereas HA-content was reduced in *Has3*-deficient vessels compared to WT, most profoundly in the media. These findings suggest that blunted neointimal hyperplasia was mainly due to a reduced VSMC-migration. This hypothesis was supported by transcriptome analysis. In *Has3*-deficient mice a mitigated differential regulation of various signaling pathways related to VSMC-migration was observed. *In vitro* experiments with human coronary VSMC confirmed that the migratory response to PDGF-BB is HAS3-dependent. *PDGF-B* gene expression was diminished in absence of HAS3 both *in vitro* and *in vivo*.

Likewise, a protective role of *Has3*-deficiency in atherosclerotic lesion formation was observed in atherosclerosis-prone apolipoprotein E/*Has3* double-deficient (*ApoE*^{-/-}/*Has3*^{-/-}) mice, indicated by a reduced aortic plaque burden compared to *ApoE*^{-/-}-controls. At the aortic root advanced lesions were observed, showing no differences in lesion size between genotypes. Histological analysis of plaque composition revealed an increase in apoptotic cells in *ApoE*^{-/-}/*Has3*-doubledeficient lesions. No differences in cell density, VSMC content, and macrophage count could be observed.

Collectively, these findings suggest a role for HAS3 in vascular lesion formation. After carotid artery ligation HAS3-dependent HA-synthesis mediates VSMC-activation through various signaling pathways and augments PDGF-BB-mediated VSMC-migration which results in enhanced neointimal hyperplasia *in vivo*. Further, deletion of *Has3* was beneficial in atherogenesis.

7 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization (WHO): Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision, German Modification, Version 2016, 21.12.2015. 2016.
2. World Health Organization (WHO): Disease and injury regional mortality estimates, 2000–2012. 2014.
3. Bundesamt S. Todesursachen in Deutschland – Fachserie 12 Reihe 4 - 2014. 2016.
4. Faller A, Schünke M and Schünke G. Der Körper des Menschen- Einführung in Bau und Funktion, 16. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2012.
5. Newby AC and Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol.* 2000;190:300-9.
6. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z and Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 2012;95:194-204.
7. Slomp J, van Munsteren JC, Poelmann RE, de Reeder EG, Bogers AJ and Gittenberger-de Groot AC. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis.* 1992;93:25-39.
8. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y and Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest.* 2006;116:3026-34.
9. Chamley-Campbell J, Campbell GR and Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev.* 1979;59:1-61.
10. Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, Orekhov AN, Koteliansky VE and Smirnov VN. Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:9542-6.
11. Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Periasamy M and et al. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res.* 1993;73:1000-12.
12. Owens GK, Kumar MS and Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
13. Alexander MR and Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13-40.
14. Ross R and Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332-9.
15. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.

16. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Boren J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ and Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38:2459-2472.
17. Davies PF, Civelek M, Fang Y, Guerraty MA and Passerini AG. Endothelial heterogeneity associated with regional athero-susceptibility and adaptation to disturbed blood flow in vivo. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36:265-75.
18. Gimbrone MA, Jr. and Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22:9-15.
19. Williams KJ and Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:551-61.
20. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
21. Herbin O, Ait-Oufella H, Yu W, Fredrikson GN, Aubier B, Perez N, Barateau V, Nilsson J, Tedgui A and Mallat Z. Regulatory T-cell response to apolipoprotein B100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:605-12.
22. Kimura T, Tse K, Sette A and Ley K. Vaccination to modulate atherosclerosis. *Autoimmunity*. 2015;48:152-60.
23. Ley K. 2015 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Protective Autoimmunity in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:429-38.
24. Liu J, Ren Y, Kang L and Zhang L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *Int J Mol Med*. 2014;33:1341-7.
25. Rong JX, Shapiro M, Trogan E and Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13531-6.
26. Dandre F and Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H2042-51.
27. Clement N, Gueguen M, Glorian M, Blaise R, Andreani M, Brou C, Bausero P and Limon I. Notch3 and IL-1beta exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF-kappaB drives crosstalk. *J Cell Sci*. 2007;120:3352-61.
28. Bennett MR, Sinha S and Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:692-702.
29. Koenig W and Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:15-26.
30. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.

31. Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M, Mintz GS, Popma JJ and Leon MB. Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. *Circulation*. 1997;96:475-83.
32. Mintz GS, Popma JJ, Hong MK, Pichard AD, Kent KM, Satler LF and Leon MB. Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am J Cardiol*. 1996;78:18-22.
33. Marx SO, Totary-Jain H and Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:104-11.
34. Chappell J, Harman JL, Narasimhan VM, Yu H, Foote K, Simons BD, Bennett MR and Jorgensen HF. Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circ Res*. 2016;119:1313-1323.
35. Davies MG and Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg*. 1994;81:1254-69.
36. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC and Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000;102:1186-91.
37. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ and Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2001;103:192-5.
38. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R and Lesions RSGRSwtS-CBVB-ESitToPwdNNCA. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346:1773-80.
39. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME and Investigators T-I. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004;350:221-31.
40. Byrne RA, Joner M and Kastrati A. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014. *Eur Heart J*. 2015;36:3320-31.
41. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK and Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1500-10.
42. Yamamoto M, Takano M, Murakami D, Inami T, Kobayashi N, Inami S, Okamatsu K, Ohba T, Ibuki C, Hata N, Seino Y, Jang IK and Mizuno K. The possibility of delayed arterial healing 5 years after implantation of sirolimus-eluting stents: serial observations by coronary angiography. *Am Heart J*. 2011;161:1200-6.
43. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G and Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:2452-9.
44. Moustakas A and Heldin P. TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:2621-34.

45. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*. 2002;12:37R-42R.
46. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN and Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1642-8.
47. Nagy N, Kaber G, Johnson PY, Gebe JA, Preisinger A, Falk BA, Sunkari VG, Gooden MD, Vernon RB, Bogdani M, Kuipers HF, Day AJ, Campbell DJ, Wight TN and Bollyky PL. Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis. *J Clin Invest*. 2015;125:3928-40.
48. Jiang D, Liang J and Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;91:221-64.
49. Itano N and Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002;54:195-9.
50. Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS and Zimmer J. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol*. 2012;418:21-31.
51. Prehm P. Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *Biochem J*. 2006;398:469-73.
52. Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J*. 1984;220:597-600.
53. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA and Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999;274:25085-92.
54. Stern R and Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*. 2006;106:818-39.
55. Fischer JW and Schror K. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007;98:287-95.
56. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, Yeh C, Secreto A, Assoian RK, Rader DJ and Pure E. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest*. 2001;108:1031-40.
57. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol*. 2002;21:25-9.
58. West DC, Hampson IN, Arnold F and Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985;228:1324-6.
59. Chajara A, Raoudi M, Delpech B, Leroy M, Basuyau JP and Levesque H. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1480-7.
60. Spicer AP, Seldin MF, Olsen AS, Brown N, Wells DE, Doggett NA, Itano N, Kimata K, Inazawa J and McDonald JA. Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics*. 1997;41:493-7.

61. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD and Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D733-45.
62. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE and McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000;106:349-60.
63. Kessler SP, Obery DR and de la Motte C. Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model. *Int J Cell Biol.* 2015;2015:745237.
64. Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vignetti D, Makkonen K and Tammi MI. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J.* 2011;278:1419-28.
65. van den Boom M, Sarbia M, von Wnuck Lipinski K, Mann P, Meyer-Kirchrath J, Rauch BH, Grabitz K, Levkau B, Schror K and Fischer JW. Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis. *Circ Res.* 2006;98:36-44.
66. Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP and Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J.* 2000;348 Pt 1:29-35.
67. Oguchi T and Ishiguro N. Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta, and TNF-alpha. *Connect Tissue Res.* 2004;45:197-205.
68. Evanko SP, Johnson PY, Braun KR, Underhill CB, Dudhia J and Wight TN. Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2001;394:29-38.
69. Muller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J and Fischer JW. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:440.
70. Suzuki K, Yamamoto T, Usui T, Suzuki K, Heldin P and Yamashita H. Expression of hyaluronan synthase in intraocular proliferative diseases: regulation of expression in human vascular endothelial cells by transforming growth factor-beta. *Jpn J Ophthalmol.* 2003;47:557-64.
71. Rabausch B. Aktivierung von humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch Hyaluronsäure-Synthase 3: Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose. 2008; [Dissertation].
72. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM, Schror K and Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res.* 2004;94:592-600.

73. Yang B, Yang BL, Savani RC and Turley EA. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J*. 1994;13:286-96.
74. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M and Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*. 1999;144:789-801.
75. Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol*. 1990;2:839-44.
76. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R and Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 2005;11:1173-9.
77. Jain M, He Q, Lee WS, Kashiki S, Foster LC, Tsai JC, Lee ME and Haber E. Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J Clin Invest*. 1996;97:596-603.
78. Turley EA, Noble PW and Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 2002;277:4589-92.
79. Evanko SP, Angello JC and Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1004-13.
80. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB and Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990;61:1303-13.
81. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U and Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:12160-4.
82. Lesley J, Hyman R and Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*. 1993;54:271-335.
83. Ruiz P, Schwarzler C and Gunthert U. CD44 isoforms during differentiation and development. *Bioessays*. 1995;17:17-24.
84. Skelton TP, Zeng C, Nocks A and Stamenkovic I. Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol*. 1998;140:431-46.
85. Jordan AR, Racine RR, Hennig MJ and Lokeshwar VB. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol*. 2015;6:182.
86. Orian-Rousseau V. CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol*. 2015;6:154.
87. Katoh S, McCarthy JB and Kincade PW. Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J Immunol*. 1994;153:3440-9.
88. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM and Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol*. 1992;117:1343-50.

89. Turley EA. Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;108:1016-24.
90. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, Bissell MJ and Turley EA. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol*. 2006;175:1017-28.
91. Lovvorn HN, 3rd, Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS and Savani RC. Hyaluronan receptor expression increases in fetal excisional skin wounds and correlates with fibroplasia. *J Pediatr Surg*. 1998;33:1062-9; discussion 1069-70.
92. Crainie M, Belch AR, Mant MJ and Pilarski LM. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood*. 1999;93:1684-96.
93. Niedworok C, Kretschmer I, Rock K, Vom Dorp F, Szarvas T, Hess J, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rubben H and Fischer JW. The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. *PLoS One*. 2013;8:e75681.
94. Cheng XB, Sato N, Kohi S, Koga A and Hirata K. Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility is Associated with Poor Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer*. 2015;6:1093-8.
95. Sohr S and Engeland K. RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle*. 2008;7:3448-60.
96. Assmann V, Marshall JF, Fieber C, Hofmann M and Hart IR. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 12):1685-94.
97. Maxwell CA, McCarthy J and Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci*. 2008;121:925-32.
98. Tolg C, McCarthy JB, Yazdani A and Turley EA. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the "cancerization" of stromal tissues. *Biomed Res Int*. 2014;2014:103923.
99. Tolg C, Hamilton SR, Morningstar L, Zhang J, Zhang S, Esguerra KV, Telmer PG, Luyt LG, Harrison R, McCarthy JB and Turley EA. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. *J Biol Chem*. 2010;285:26461-74.
100. Zhang S, Chang MC, Zylka D, Turley S, Harrison R and Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:11342-8.
101. Park D, Kim Y, Kim H, Kim K, Lee YS, Choe J, Hahn JH, Lee H, Jeon J, Choi C, Kim YM and Jeoung D. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGFbeta receptor interaction via CD44-PKCdelta. *Mol Cells*. 2012;33:563-74.
102. Hall CL, Wang C, Lange LA and Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol*. 1994;126:575-88.
103. Lokeshwar VB and Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:27641-9.

104. Hatano H, Shigeishi H, Kudo Y, Higashikawa K, Tobiume K, Takata T and Kamata N. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR. *Lab Invest.* 2011;91:379-91.
105. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN and Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation.* 2004;110:940-7.
106. Bot PT, Pasterkamp G, Goumans MJ, Strijder C, Moll FL, de Vries JP, Pals ST, de Kleijn DP, Piek JJ and Hoefer IE. Hyaluronic acid metabolism is increased in unstable plaques. *Eur J Clin Invest.* 2010;40:818-27.
107. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C and Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation.* 1996;93:1141-7.
108. Wight TN and Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004;94:1158-67.
109. Nagy N, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rock K, Ter Braak M, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber AA, Sorgel F, Levkau B, Ergun S and Fischer JW. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation.* 2010;122:2313-22.
110. Nieuwdorp M, Holleman F, de Groot E, Vink H, Gort J, Kontush A, Chapman MJ, Hutten BA, Brouwer CB, Hoekstra JB, Kastelein JJ and Stroes ES. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia.* 2007;50:1288-93.
111. Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H, Fontijn RD and Vink H. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H458-2.
112. Grandoch M, Hoffmann J, Rock K, Wenzel F, Oberhuber A, Schelzig H and Fischer JW. 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;108:340.
113. Chajara A, Levesque H, Courel MN, Chauzy C, Maingonnat C, Bertrand P and Delpech B. Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1996;125:193-207.
114. Savani RC and Turley EA. The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty: development of a potential therapy. *Int J Tissue React.* 1995;17:141-51.
115. Papakonstantinou E, Roth M, Block LH, Mirtsou-Fidani V, Argiriadis P and Karakiulakis G. The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atheromatic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Atherosclerosis.* 1998;138:79-89.
116. Vigetti D, Viola M, Karousou E, Rizzi M, Moretto P, Genasetti A, Clerici M, Hascall VC, De Luca G and Passi A. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *J Biol Chem.* 2008;283:4448-58.
117. Wilkinson TS, Bressler SL, Evanko SP, Braun KR and Wight TN. Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion. *J Cell Physiol.* 2006;206:378-85.

118. Viola M, Bartolini B, Vigetti D, Karousou E, Moretto P, Deleonibus S, Sawamura T, Wight TN, Hascall VC, De Luca G and Passi A. Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2013;288:29595-603.
119. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, Nakayama J, Taniguchi S, Kimata K and Ikeda U. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PLoS One*. 2013;8:e58760.
120. Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, Tolg C, Veiseh M, Wang C, McCarthy JB, Bissell MJ, Koropatnick J and Turley EA. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282:16667-80.
121. Goueffic Y, Guilluy C, Guerin P, Patra P, Pacaud P and Loirand G. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. *Cardiovasc Res*. 2006;72:339-48.
122. Potter-Perigo S, Johnson PY, Evanko SP, Chan CK, Braun KR, Wilkinson TS, Altman LC and Wight TN. Polyinosine-polycytidylic acid stimulates versican accumulation in the extracellular matrix promoting monocyte adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43:109-20.
123. Evanko SP, Potter-Perigo S, Johnson PY and Wight TN. Organization of hyaluronan and versican in the extracellular matrix of human fibroblasts treated with the viral mimetic poly I:C. *J Histochem Cytochem*. 2009;57:1041-60.
124. Merrilees MJ, Beaumont BW, Braun KR, Thomas AC, Kang I, Hinek A, Passi A and Wight TN. Neointima formed by arterial smooth muscle cells expressing versican variant V3 is resistant to lipid and macrophage accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1309-16.
125. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C and Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*. 1996;98:2403-13.
126. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD and Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol*. 2006;177:1272-81.
127. Jiang D, Liang J and Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:435-61.
128. Zhao L, Lee E, Zukas AM, Middleton MK, Kinder M, Acharya PS, Hall JA, Rader DJ and Pure E. CD44 expressed on both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells promotes atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1283-9.
129. Krettek A, Sukhova GK, Schonbeck U and Libby P. Enhanced expression of CD44 variants in human atheroma and abdominal aortic aneurysm: possible role for a feedback loop in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2004;165:1571-81.
130. Kothapalli D, Zhao L, Hawthorne EA, Cheng Y, Lee E, Pure E and Assoian RK. Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells. *J Cell Biol*. 2007;176:535-44.

131. Silverman-Gavrila R, Silverman-Gavrila L and Bendeck MP. Cell division fidelity is altered during the vascular response to injury: its novel role in atherosclerosis progression. *Am J Pathol.* 2013;182:628-39.
132. Ma X, Pearce JD, Wilson DB, English WP, Edwards MS and Geary RL. Loss of the hyaluronan receptor RHAMM prevents constrictive artery wall remodeling. *J Vasc Surg.* 2014;59:804-13.
133. Krupinski J, Ethirajan P, Font MA, Turu MM, Gaffney J, Kumar P and Slevin M. Changes in Hyaluronan Metabolism and RHAMM Receptor Expression Accompany Formation of Complicated Carotid Lesions and May be Pro-Angiogenic Mediators of Intimal Neovessel Growth. *Biomark Insights.* 2008;2:361-7.
134. Vigetti D, Rizzi M, Viola M, Karousou E, Genasetti A, Clerici M, Bartolini B, Hascall VC, De Luca G and Passi A. The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology.* 2009;19:537-46.
135. Chai S, Chai Q, Danielsen CC, Hjorth P, Nyengaard JR, Ledet T, Yamaguchi Y, Rasmussen LM and Wogensen L. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. *Circ Res.* 2005;96:583-91.
136. Kiene LS, Homann S, Suvorava T, Rabausch B, Muller J, Kojda G, Kretschmer I, Twarock S, Dai G, Deenen R, Hartwig S, Lehr S, Kohrer K, Savani RC, Grandoch M and Fischer JW. Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:e9-16.
137. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM and Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4471-5.
138. Kumar A and Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2238-44.
139. Lindner V, Fingerle J and Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res.* 1993;73:792-6.
140. Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR and Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension.* 1995;25:1111-5.
141. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
142. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W and Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation.* 2005;112:2487-95.
143. Puchtler H, Waldrop FS and Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973;150:174-87.
144. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982;218:474-5.
145. Seimon TA, Wang Y, Han S, Senokuchi T, Schrijvers DM, Kuriakose G, Tall AR and Tabas IA. Macrophage deficiency of p38alpha MAPK promotes apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:886-98.

146. de Waard V, Arkenbout EK, Carmeliet P, Lindner V and Pannekoek H. Plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin protect against stenosis in a murine carotid artery ligation model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1978-83.
147. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
148. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1962;115:453-66.
149. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
150. Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-8.
151. Derveaux S, Vandesompele J and Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods.* 2010;50:227-30.
152. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
153. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e115.
154. Rogojina AT, Orr WE, Song BK and Geisert EE, Jr. Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis.* 2003;9:482-96.
155. Twarock S, Rock K, Sarbia M, Weber AA, Janicke RU and Fischer JW. Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-cAMP pathway. *Br J Pharmacol.* 2009;157:234-43.
156. Mills JC, Syder AJ, Hong CV, Guruge JL, Raaii F and Gordon JI. A molecular profile of the mouse gastric parietal cell with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13687-92.
157. Melchior-Becker A, Dai G, Ding Z, Schafer L, Schrader J, Young MF and Fischer JW. Deficiency of biglycan causes cardiac fibroblasts to differentiate into a myofibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2011;286:17365-75.
158. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J and Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 2007;171:1451-61.
159. Twarock S, Tammi MI, Savani RC and Fischer JW. Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2010;285:23276-84.
160. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M and Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19:185-93.
161. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.

162. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1-13.
163. Gomez C, Martinez L, Mesa A, Duque JC, Escobar LA, Pham SM and Vazquez-Padron RI. Oxidative stress induces early-onset apoptosis of vascular smooth muscle cells and neointima formation in response to injury. *Biosci Rep.* 2015;35.
164. Weaver H, Shukla N, Ellinsworth D and Jeremy JY. Oxidative stress and vein graft failure: a focus on NADH oxidase, nitric oxide and eicosanoids. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:160-5.
165. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA and Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science.* 1991;253:1129-32.
166. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM and Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 1992;89:507-11.
167. Foster LC, Arkonac BM, Sibinga NE, Shi C, Perrella MA and Haber E. Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:20341-6.
168. Tabas I, Garcia-Cardena G and Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015;209:13-22.
169. Bai KJ, Spicer AP, Mascarenhas MM, Yu L, Ochoa CD, Garg HG and Quinn DA. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:92-8.
170. McCracken JM, Jiang L, Deshpande KT, O'Neil MF and Pritchard MT. Differential effects of hyaluronan synthase 3 deficiency after acute vs chronic liver injury in mice. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2016;9:4.
171. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD and Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* 2006;12:1075-80.
172. Moore KJ and Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145:341-55.
173. World Health Organization (WHO): Global status report on noncommunicable diseases. 2014.
174. World Health Organization (WHO): Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 2009.
175. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A and Libby P. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J.* 2011;162:597-605.
176. Everett BM, Pradhan AD, Solomon DH, Paynter N, Macfadyen J, Zaharris E, Gupta M, Clearfield M, Libby P, Hasan AA, Glynn RJ and Ridker PM. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J.* 2013;166:199-207 e15.

177. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ and Group CT. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017.
178. Bot PT, Hoefler IE, Piek JJ and Pasterkamp G. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2008;15:786-91.
179. Pure E, Krolikoski M and Monslow J. Role for Hyaluronan Synthase 3 in the Response to Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:224-5.
180. Wang Y, Lauer ME, Anand S, Mack JA and Maytin EV. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress. *J Biol Chem*. 2014;289:32253-65.
181. Yoshida T, Kaestner KH and Owens GK. Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury. *Circ Res*. 2008;102:1548-57.
182. Deudon E, Berrou E, Breton M and Picard J. Growth-related production of proteoglycans and hyaluronic acid in synchronous arterial smooth muscle cells. *Int J Biochem*. 1992;24:465-70.
183. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH and Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1351-65.
184. Chen H, Mohan P, Jiang J, Nemirovsky O, He D, Fleisch MC, Niederacher D, Pilarski LM, Lim CJ and Maxwell CA. Spatial regulation of Aurora A activity during mitotic spindle assembly requires RHAMM to correctly localize TPX2. *Cell Cycle*. 2014;13:2248-61.
185. Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB and Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:5207-14.
186. Simpson MA, Wilson CM and McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol*. 2002;161:849-57.
187. Kessler S, Rho H, West G, Fiocchi C, Drazba J and de la Motte C. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci*. 2008;1:57-61.
188. Bollyky PL, Bogdani M, Bollyky JB, Hull RL and Wight TN. The role of hyaluronan and the extracellular matrix in islet inflammation and immune regulation. *Curr Diab Rep*. 2012;12:471-80.
189. Yoshioka Y, Kozawa E, Urakawa H, Arai E, Futamura N, Zhuo L, Kimata K, Ishiguro N and Nishida Y. Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1160-70.
190. Toole BP, Wight TN and Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem*. 2002;277:4593-6.

191. Bollyky PL, Evanko SP, Wu RP, Potter-Perigo S, Long SA, Kinsella B, Reijonen H, Guebtner K, Teng B, Chan CK, Braun KR, Gebe JA, Nepom GT and Wight TN. Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol*. 2010;7:211-20.
192. Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT and Wight TN. Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol*. 2012;31:90-100.
193. Kuipers HF, Rieck M, Gurevich I, Nagy N, Butte MJ, Negrin RS, Wight TN, Steinman L and Bollyky PL. Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:1339-44.
194. Maier J. Untersuchungen zur Rolle der Hyaluronsäure im Fettgewebe im Kontext der Entstehung einer Adipositas und Insulinresistenz 2016; [Dissertation].
195. Hamilton JA, Stanley ER, Burgess AW and Shadduck RK. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol*. 1980;103:435-45.
196. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111:485-91.
197. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:533-44.
198. Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:271-82.
199. El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo MS, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti TD, Bogdan C, Wynn TA and Murray PJ. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol*. 2008;9:1399-406.
200. McCormick SM and Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*. 2015;75:38-50.
201. Fingerle J, Au YP, Clowes AW and Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis*. 1990;10:1082-7.
202. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M and Serruys P. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:733-9.
203. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M and Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10480-4.
204. Garg UC and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83:1774-7.
205. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*. 2000;87:179-83.

206. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sama D and Calatroni A. NF- κ B and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress. *J Appl Toxicol.* 2008;28:509-17.
207. Law CH, Li JM, Chou HC, Chen YH and Chan HL. Hyaluronic acid-dependent protection in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Toxicology.* 2013;303:54-71.
208. Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M and Arnhold J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules.* 2006;7:659-68.
209. Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, Hara F, Matsushita T, Yamamoto N, Yoshida K, Munakata H and Hamanishi C. Cyclic tensile stretch loaded on bovine chondrocytes causes depolymerization of hyaluronan: involvement of reactive oxygen species. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3151-8.
210. Vendrov AE, Madamanchi NR, Niu XL, Molnar KC, Runge M, Szyndralewicz C, Page P and Runge MS. NADPH oxidases regulate CD44 and hyaluronic acid expression in thrombin-treated vascular smooth muscle cells and in atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2010;285:26545-57.
211. Savani RC, Wang C, Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM and Turley EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest.* 1995;95:1158-68.
212. Bharadwaj AG, Kovar JL, Loughman E, Elowsky C, Oakley GG and Simpson MA. Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am J Pathol.* 2009;174:1027-36.
213. Raines EW and Ross R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem.* 1982;257:5154-60.
214. Ricci C and Ferri N. Naturally occurring PDGF receptor inhibitors with potential anti-atherosclerotic properties. *Vascul Pharmacol.* 2015;70:1-7.
215. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL and Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2010;3:156-66.
216. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM and Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;71:343-53.
217. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA and Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-71.
218. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:133-40.
219. King VL, Hatch NW, Chan HW, de Beer MC, de Beer FC and Tannock LR. A murine model of obesity with accelerated atherosclerosis. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18:35-41.
220. Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto TT, Ishibashi S and Oka Y. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:24-33.

221. Hofmann SM, Perez-Tilve D, Greer TM, Coburn BA, Grant E, Basford JE, Tschop MH and Hui DY. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes*. 2008;57:5-12.
222. Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ and Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*. 2009;119:1795-804.
223. Geng YJ and Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol*. 1995;147:251-66.
224. Vigetti D, Rizzi M, Moretto P, Deleonibus S, Dreyfuss JM, Karousou E, Viola M, Clerici M, Hascall VC, Ramoni MF, De Luca G and Passi A. Glycosaminoglycans and glucose prevent apoptosis in 4-methylumbelliferone-treated human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2011;286:34497-503.
225. Lutgens E, de Muinck ED, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Wellens HJ and Daemen MJ. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res*. 1999;41:473-9.
226. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbato R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R and Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19:1166-72.
227. Lhotak S, Gyulay G, Cutz JC, Al-Hashimi A, Trigatti BL, Richards CD, Igdoura SA, Steinberg GR, Bramson J, Ask K and Austin RC. Characterization of Proliferating Lesion-Resident Cells During All Stages of Atherosclerotic Growth. *J Am Heart Assoc*. 2016;5.
228. Lee RT and Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1859-67.
229. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M and Feil R. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res*. 2014;115:662-7.
230. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ and Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015;21:628-37.
231. Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT and Owens GK. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods*. 2013;10:171-7.
232. Iwata H, Manabe I, Fujiu K, Yamamoto T, Takeda N, Eguchi K, Furuya A, Kuro-o M, Sata M and Nagai R. Bone marrow-derived cells contribute to vascular inflammation but do not differentiate into smooth muscle cell lineages. *Circulation*. 2010;122:2048-57.
233. Vengrenyuk Y, Nishi H, Long X, Ouimet M, Savji N, Martinez FO, Cassella CP, Moore KJ, Ramsey SA, Miano JM and Fisher EA. Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:535-46.
234. McCullagh KA and Balian G. Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature*. 1975;258:73-5.

235. Rekhter MD, Zhang K, Narayanan AS, Phan S, Schork MA and Gordon D. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am J Pathol.* 1993;143:1634-48.
236. Libby P. Collagenases and cracks in the plaque. *J Clin Invest.* 2013;123:3201-3.
237. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW and Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-503.
238. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-74.
239. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI and Wight TN. 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.* 1998;152:533-46.
240. Levesque H, Girard N, Maingonnat C, Delpech A, Chauzy C, Tayot J, Courtois H and Delpech B. Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis.* 1994;105:51-62.
241. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ and Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med.* 1996;183:1119-30.
242. Nandi A, Estess P and Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 2000;275:14939-48.
243. Homann S. Study on the role of hyaluronan synthase 3 in the pathogenesis of atherosclerosis. 2017; [Dissertation].
244. Freudenberger T, Rock K, Dai G, Dorn S, Mayer P, Heim HK and Fischer JW. Estradiol inhibits hyaluronic acid synthase 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:1099-109.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Grandoch M, Feldmann K, Gothert JR, **Dick LS**, Homann S, Klatt C, Bayer JK, Waldheim JN, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Köhrer K, Lehr S, Homey B, Pfeffer K, Fischer JW. Deficiency in lymphotoxin beta receptor protects from atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circ Res*. 2015; 116(8):e57-68

Grandoch M, Kohlmorgen C, Melchior-Becker A, Feldmann K, Homann S, Müller J, **Kiene LS**, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Gowert NS, Elvers M, Skroblin P, Yin X, Mayr M, Schaefer L, Tannock LR, Fischer JW. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(5):e41-50.

Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, **Kiene LS**, Raschke S, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A. Biglycan in aortic heart valve disease and diabetes. *Sci Rep*. [In Revision]

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert unter:

Kiene LS, Homann S, Suvorava T, Rabausch B, Muller J, Kojda G, Kretschmer I, Twarock S, Dai G, Deenen R, Hartwig S, Lehr S, Kohrer K, Savani RC, Grandoch M and Fischer JW. Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(2):e9-16.

Frau Lena Sophia Kiene war an diesem Manuskript bei der Durchführungsplanung beteiligt und hat 2015 dieses Projekt als Tierversuchsleiterin betreut. Frau Kiene hat die experimentelle Durchführung der Experimente übernommen, dies beinhaltet die Tierversuche inklusive der Operation der Tiere, die Organentnahme, die Probenaufbereitung, histologische Untersuchungen sowie qPCR-Analysen. Zur Durchführung und Analyse des Gene Arrays wurden RNA-Proben an Prof. Dr. Köhrer und Dr. Deenen vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gegeben (Supplement Abbildung II, II, Tabelle I). Multiplex-Messungen von Plasmazytokinen wurden von Frau Dr. Hartwig und Herrn Dr. Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum, Düsseldorf durchgeführt (Abbildung 6). Die Untersuchung der Endothelfunktion und der eNOS Expression wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Kojda und Frau Dr. Suvorava, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie durchgeführt (Abbildung 4 A-D, F). Frau Kiene war an der Datenanalyse und -interpretation, dem Verfassen des Manuskriptes sowie an der Revision beteiligt.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 sind in folgendes Manuskript eingeflossen:

Homann S, Grandoch M, **Kiene LS**, Podsvyadek Y, Feldmann K, Rabausch B, Nagy N, Kretschmer I, Lehr S, Oberhuber A., Bollyky P, and Fischer JW. Hyaluronan synthase 3 critically determines plaque inflammation in atherosclerosis. *Matrix Biol*. 2017; DOI: 10.1016/j.matbio.2017.09.005.

Frau Kiene hat die Planung, Durchführung und Analyse der Versuche der Tiergruppe, die 15 Wochen gefüttert wurden, übernommen. Dies beinhaltet die Tierversuche, die Organentnahme, die Probenaufbereitung und die histologischen Untersuchungen der Morphologie.

Kongressbeiträge

Dick LS, Grandoch M, Fender AC, Fischer JW. Characterization of periaortic hyaluronan-matrix in atherosclerotic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2013;386(Suppl.1):S18.

Dick LS, Müller J, Fischer JW. Lack of hyaluronan-synthase 3 attenuates neointimal hyperplasia after carotid artery ligation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2014;387(Suppl.1):S35.

Dick LS, Rabausch B, Müller J, Kretschmer I, Twarock S, Dai G, Grandoch M, Fischer JW. Deletion of hyaluronan synthase 3 diminishes neointimal hyperplasia after carotid artery ligation *Clin Res Cardiol.* 2015; 104, Suppl 1, April 2015, P1052

Dick LS, Homann S, Müller J, Rabausch B, Grandoch M, Fischer JW. Genetic deletion of hyaluronan-synthase 3 is protective in vascular lesion formation *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2015;388(Suppl.1):S33.

Dick LS, Homann S, Müller J, Grandoch M, Fischer JW. Vascular lesion formation is attenuated by genetic deletion of hyaluronan-synthase 3 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35, Suppl 1, A554, Mai 2015, San Francisco, CA, USA.

Dick LS, Homann S, Müller J, Grandoch M, Fischer JW. Hyaluronan-synthase 3 deletion attenuates vascular lesion formation *Book of Abstracts, 10th International Conference on Hyaluronan*, Juni 2015, Florenz, Italien.

Homann S, **Kiene LS**, Hartwig S, Lehr S, Grandoch M, Fischer JW. Genetic deletion of Hyaluronan synthase 3 in Apolipoprotein E deficient mice protects from atherosclerosis. *Joint International Meeting Perspectives in Vascular Biology*, September 2016, Frankfurt.

Barth M, Selig JI, Klose S, **Kiene LS**, Raschke S, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A. Biglycan is involved in degenerative aortic valve disease in diabetic disorders. *46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie*, Februar 2017, Leipzig.

Lebenslauf

Person

Name	Lena Sophia Kiene (geb. Dick)
Geburtsdatum	2. Mai 1986
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Beruflicher Werdegang

Seit 12/2016	Qualitätsmanagementbeauftragte, B&K Agrar GmbH, Steinfeld
11/2015 – 12/2016	Mutterschutz und Elternzeit
07/2011 – 10/2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer
Thema	Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 3 auf vaskuläre Pathologien wie Atheroskleroseentwicklung und Neointimabildung nach Gefäßverletzungen.

Studium

06/2011	Approbation als Apothekerin
11/2010 – 04/2011	Praktisches Jahr, Neue Apotheke in der KÖ-Galerie, Düsseldorf
05/2010 – 10/2010	Praktisches Jahr, Bayer Schering Pharma, Wuppertal <i>Global Regulatory Affairs International</i>
03/2009 – 07/2009	Forschungssemester, Institut für Pharmakologie, <i>Universidad de Salamanca</i> , Salamanca, Spanien, Prof. Dr. Rosalia Carron
02/2008 – 03/2008	Forschungspraktikum, <i>IMSS-Centro de Investigación Biomédica de Occidente</i> , Labor für Neurowissenschaften, Guadalajara, Mexiko
10/2005 – 04/2010	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Schulbildung

08/1996 – 06/2005	Schule Marienberg, Erzbischöfliches Gymnasium für Mädchen, Neuss, Abitur
08/2002 – 06/2003	La Porte High School, Indiana, USA

Düsseldorf, den 7. September 2017

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Dissertation unter seiner Betreuung zu verfassen. Viele anregende Gespräche und konstruktive Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bin sehr dankbar für die mir gewährten wissenschaftlichen Freiräume und die Möglichkeit an vielen spannenden Projekten mitarbeiten zu können. Dies und auch die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen haben meinen akademischen Horizont sehr erweitert.

Bei Herr Prof. Dr. Jörg Breitreutz bedanke ich mich, dass er die Mentorenschaft dieser Arbeit übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für ihre fortwährende Unterstützung. Unsere vielen inspirierenden Gespräche zu wissenschaftlichen und methodischen Fragen haben diese Arbeit sehr geprägt. Sehr herzlich möchte ich mich auch für ihre Hilfe bei der Publikation unseres Artikels bedanken. Danke für die vertrauensvolle und offene Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Karl Köhrer und Herrn Dr. René Deenen danke ich für die Gene Array Analyse. Herrn Prof. Georg Kojda und Frau Dr. Tatsiana Suvorava danke ich für die Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Endothelfunktion und zur Proteinexpression der eNOS. Mein Dank gilt zudem Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig für die Durchführung der Multiplex-Messungen.

Frau PD Dr. Anke Fender danke ich für die angenehme Zeit als Büronachbarin. Vielen Dank für die ermutigenden Gespräche sowie für Rat und Tat in jeder Lebenslage.

Stets hilfsbereite Ansprechpartner im Laboralltag waren Kerstin Freidel, Peggy Marra-Mann, Beate Weyrauther, Kirsten Bartowski und Bärbel Reupert sowie Annika Zimmermann mit ihrer Unterstützung bei den histologischen Färbungen. Ein Dankeschön auch an Irmhild Rüter für die Durchführung der ELISA-Messungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Rompel für die Durchführung der *HAS3* Knock-down Versuche in CaSMC und des Oxyblots. Dankbar bin ich auch für die anregenden fachlichen Gespräche, die gegenseitige Unterstützung und die vielen schönen Erlebnisse die ich mit meinen langjährigen Mitdoktorandinnen und Post-Doc-Kollegen teilen durfte. Dieser Dank gilt besonders Frau Dr. Inga Kretschmer und Frau Dr. Julia Müller die mir nicht nur die Eingewöhnungsphase erleichtert haben, sondern mich auch während meiner Schwangerschaft experimentell unterstützt haben. Ein herzliches Dankeschön an Erika Lohmann und Karin Montag für die immer kompetente und freundliche Unterstützung in organisatorischen Belangen.

Meinem Mann Florian danke ich von Herzen für sein Verständnis und seine Unterstützung während der letzten Jahre. Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie für ihren Rückhalt und die Ermutigung nie aufzugeben. Danke auch für die wundervolle Unterstützung mit Clara. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

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

Düsseldorf, den 07.09.2017

Lena Sophia Kiene