

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

**Untersuchungen zur Wirkung
synthetischer Gestagene auf die
Hyaluronsäuresynthese glatter Gefäßmuskelzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Lars Fabian Seiler

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: PD Dr. Jan-P. Graßmann

In Dankbarkeit für meine Eltern

Zusammenfassung

Im Rahmen einer postmenopausalen Hormontherapie (HT) werden weibliche Sexualsteroid substituiert (Ortmann und Lattrich, 2012). Da kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen im Vergleich zu Männern mit einer deutlichen Latenz auftreten und sich das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse ab der Menopause erhöht, kann eine protektive Wirkung weiblicher Geschlechtshormone diesbezüglich vermutet werden (Regitz-Zagrosek, 2006; Kaufmann, 2013). Die Studienlage zur Wirkung einer HT auf kardiovaskuläre Erkrankungen ist kontrovers. In der *Womens Health Initiative* (WHI) Studie wurde beispielsweise unter einer HT mittels Östrogen und dem synthetischen Gestagen Medroxyprogesteron-acetat (MPA) eine Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse beobachtet (Rossouw *et al.*, 2002). Einige Autoren proklamierten zuvor positive Effekte durch die alleinige Therapie mit Östrogen und es wurde deshalb diskutiert, ob diese durch MPA in einer Kombinationstherapie antagonisiert werden (Adams *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss synthetischer Gestagene auf humane koronar-arterielle glatte Muskelzellen (HCASMC) *in vitro* evaluiert. Mit MPA und Norethisteron-acetat (NET-A) wurden zwei Wirkstoffe ausgewählt, welche bereits in klinischen Studien Verwendung fanden und unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Steroidrezeptoren aufweisen (Rossouw *et al.*, 2002; Schierbeck *et al.*, 2012; Stanczyk *et al.*, 2013). Es wurde sowohl die alleinige Wirkung der beiden Gestagene untersucht, als auch ihre Wirkung in Anwesenheit von *Platelet Derived Growth Factor BB* (PDGF-BB), einem Wachstumsfaktor, der Atherogenese begünstigt (Papakonstantinou *et al.*, 1995; Ross, 1999). Dabei wurde die Beeinflussung der Synthese von Hyaluronsäure (HA) evaluiert, welche als Bestandteil der extrazellulären Matrix maßgeblich die Entstehung der Atherosklerose beeinflusst (Fischer und Schrör, 2007; Moretto *et al.*, 2015).

Es wird gezeigt, dass MPA und NET-A eine Verminderung der HA-Synthese von HCASMC mit und ohne gleichzeitige PDGF-BB-Stimulation bewirken. Die Verminderung der HA-Synthese könnte einen Klasseneffekt synthetischer Gestagene darstellen. Im Fall von MPA ging dieser Effekt mit einer Hemmung der p38 mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) einher. Kostimulation mit NET-A und PDGF-BB führte hingegen zu einer Hemmung der p44/42 mitogenaktivierten Proteinkinase (p44/42 MAPK). Im Gegensatz zur Stimulation mit MPA und PDGF-BB kam es bei Stimulation mit NET-A und PDGF-BB zu einer Verminderung der Proliferation und Migration von HCASMC. MPA und NET-A führten folglich zu verschiedenen Effekten auf HCASMC als strukturellen und funktionellen Bestandteil des kardiovaskulären Systems. Diese Effekte könnten unterschiedliche Wirkung der beiden Gestagene im Rahmen einer HT bedingen.

Summary

Female sex steroids are substituted during a postmenopausal hormone therapy (HT) (Ortmann and Latrich, 2012). Cardiovascular disease in women develops later than in men and the risk of cardiovascular events increases by the begin of menopause. Therefore a protective effect may be attributed to female sex hormones (Regitz-Zagrosek, 2006; Kaufmann, 2013). However, the effect of HT on cardiovascular disease is controversial.

Within the *Womens Health Initiative* study (WHI) cardiovascular events in women treated with HT using estrogen and the synthetic progestin Medroxyprogesterone-acetate (MPA) increased (Rossouw *et al.*, 2002). Previously positive effects by therapy with estrogen alone were proclaimed and therefore it was discussed whether these effects are antagonized by combination with MPA (Adams *et al.*, 1997).

In the current study the influence of the synthetic progestins MPA and Norethisterone-acetate (NET-A) on human coronary arterial smooth muscle cells (HCASMC) *in vitro* was evaluated. These progestins have already been used in clinical trials and differ in their binding-affinities to the subclasses of steroid-receptors (Rossouw *et al.*, 2002; Schierbeck *et al.*, 2012; Stanczyk *et al.*, 2013).

The effect of the progestins with and without *Platelet Derived Growth Factor BB* (PDGF-BB), a growth factor associated with atherogenesis, was investigated (Papakonstantinou *et al.*, 1995; Ross, 1999). Particular focus was given to the impact of the investigated progestins to hyaluronan (HA), which as a component of the extracellular matrix significantly influences the development of atherosclerosis (Fischer and Schrör, 2007; Moretto *et al.*, 2015).

It is shown that MPA and NET-A cause a reduction of HA in culture media of HCASMC in presence and absence of PDGF-BB. This could be a class-effect of synthetic progestins.

Regarding MPA, the effect was accompanied by an inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK). In contrast, co-stimulation with NET-A and PDGF-BB inhibited the p44/42 mitogen-activated protein kinase (p44/42-MAPK).

NET-A and PDGF-BB reduced the proliferation and migration of HCASMC, on the contrary stimulation with MPA and PDGF-BB had no effect on these parameters.

This indicates that MPA and NET-A led to various effects on HCASMC as a structural and functional component of the cardiovascular system, which could cause differences of the two progestins in the context of HT.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
‰	Promille
°C	Grad Celsius
[³H]	Tritium
4-MU	4-Methylumbelliferon
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEE	konjugiertes equines Östrogen
cm²	Quadratcentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
C_t	<i>threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM	<i>Disintegrations per minute</i> , Zerfall pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser

HA	<i>Hyaluronic acid</i> , Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HCASMC	<i>Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells</i>
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
HT	Hormontherapie
HYAL	Hyaluronidase
I.I.	<i>integrated intensity</i> , Integrierte Intensität
kDa	Kilodalton
LDL	<i>Low-density</i> Lipoprotein
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP9	Matrix-Metalloproteinase-9
MPA	Medroxyprogesteron-acetat
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NET-A	Norethisteron-acetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
oxLDL	Oxidiertes <i>Low-density</i> Lipoprotein
p38 MAPK	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
p44/42 MAPK	p44/42 mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor – Isoform BB</i>
PG	Progesteron
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Poly I:C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i> , Polyinosin-polycytidin-Säure
qPCR	Quantitative <i>Realtime</i> Polymerase Kettenreaktion
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RHAMM	<i>Receptor for Hyaluronan Mediated Motility</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TBS/T	<i>Tris buffered saline / TWEEN 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLR	<i>Toll Like</i> Rezeptor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TWEEN 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt
vs.	<i>versus</i>
WHI	<i>Womens Health Initiative</i>
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Aufbau arterieller Gefäße	1
1.1.2	Pathophysiologie der Atherosklerose	2
1.2	Hormontherapie und kardiovaskuläre Erkrankungen	4
1.3	Steroidhormone	6
1.3.1	Gestagene	6
1.4	Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	8
1.5	Hyaluronsäure	9
1.5.1	Struktur und Synthese	9
1.5.2	Funktionelle Bedeutung	10
1.5.3	Hyaluronsäure und Atherosklerose	11
1.6	Einfluss von Steroidhormonen auf glatte Gefäßmuskelzellen	13
1.6.1	Hyaluronsäureproduktion	13
1.6.2	Proliferation und Migration	14
1.6.3	Signaltransduktion	15
1.7	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Zellkultur	20
2.2	Stimulation der Zellen	20
2.3	Immunhistochemische Färbung von Hyaluronsäure	21
2.4	Mikroskopie	22
2.5	Bestimmung der Hyaluronsäure-Konzentration im Medium	22
2.6	Proteinbestimmung	23
2.7	RNA-Isolation	23
2.8	cDNA-Synthese	24
2.9	Quantitative <i>Realtime</i> PCR	24
2.10	Migrations-Assay	26
2.11	Tritium-Thymidin-Inkorporation	28
2.12	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.13	Western-Blotting	30
2.14	Statistik	31

3	Ergebnisse.....	33
3.1	Mikroskopie von glatten Gefäßmuskelzellen.....	33
3.2	Effekte von MPA	34
3.2.1	Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems.....	34
3.2.2	Funktionelle Effekte	37
3.2.3	Signaltransduktion	38
3.3	Effekte von NET-A	40
3.3.1	Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems.....	40
3.3.2	Funktionelle Effekte	42
3.3.3	Signaltransduktion	46
4	Diskussion	49
4.1	Hemmung der Hyaluronsäuresynthese.....	49
4.1.1	Mögliche Beeinflussung der Atherogenese.....	50
4.1.2	Mögliche Beeinflussung der Integrität atherosklerotischer Plaques	51
4.2	Funktionelle Effekte.....	52
4.2.1	Einfluss von MPA auf die Proliferation von HCASMC	52
4.2.2	Einfluss von MPA auf die Migration von HCASMC	53
4.2.3	Verminderte Proliferation nach Stimulation mit NET-A und PDGF-BB.....	53
4.2.4	Verminderte Proliferation nach Stimulation mit PG und PDGF-BB	55
4.2.5	Hemmung der Migration durch NET-A bei Kostimulation mit PDGF-BB	56
4.3	Signaltransduktion.....	57
4.3.1	Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit MPA	57
4.3.2	Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit NET-A	58
4.3.3	Phosphorylierung der p44/42 MAPK nach Stimulation mit NET-A	59
4.4	Gegenüberstellung der Effekte von MPA und NET-A	60
4.5	Schlussfolgerungen.....	65
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	67
6	Anhang	75
6.1	Tabellenverzeichnis	75
6.2	Abbildungsverzeichnis	75

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Aufbau arterieller Gefäße

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine Erkrankung der Gefäße des arteriellen Systems (Ross, 1999). Zum Verständnis ihrer Pathologie ist die Kenntnis von Grundlagen der Histologie arterieller Blutgefäße notwendig.

Arterielle Gefäße sind aus drei morphologisch abgrenzbaren Schichten aufgebaut. Die innerste Schicht bildet die Intima, welche zum Gefäßlumen von einer Schicht aus Endothelzellen abgegrenzt wird. Nach außen wird die Intima von einer Schicht elastischen Bindegewebes begrenzt, der *Lamina elastica interna*. Die Intima enthält bereits im Kindesalter vereinzelt glatte Muskelzellen, welche von extrazellulärer Matrix des Bindegewebes umgeben sind (Ross und Glomset, 1973). Sie liegen nahe des Endothels in großen Abständen und sind in Nachbarschaft zur Media, der mittleren Schicht der Gefäßwand, dichter organisiert (Stary *et al.*, 1992). Die Anzahl glatter Muskelzellen der Intima steigt mit zunehmendem Alter und so auch die Komponenten der extrazellulären Matrix. Dies führt zu einer Zunahme der Dicke der Intima (Ross und Glomset, 1973; Welsch *et al.*, 2014).

Die mittlere Schicht der Gefäßwand, die Media, besteht aus einer großen Anzahl glatter Muskelzellen, welche in Kollagen und unterschiedlich großen Mengen kleiner elastischer Fasern und weiteren extrazellulären Matrixkomponenten des Bindegewebes eingebettet sind (Ross und Glomset, 1973).

An die Media schließt sich die Adventitia an. Sie ist die äußerste der drei Schichten der arteriellen Blutgefäße und besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und locker angeordneten Matrixkomponenten wie Kollagen und Glykosaminoglykanen. Die Adventitia wird durch eine Schicht elastischen Bindegewebes, der *Lamina elastica externa*, von der Media getrennt (Ross und Glomset, 1973).

Mikroskopisch lassen sich arterielle Gefäße des muskulären Typs von Gefäßen des elastischen Typs unterscheiden (Gussenhoven *et al.*, 1989). Verantwortlich für die „Windkesselfunktion“ des Kreislaufes sind arterielle Gefäße des elastischen Typs zentral lokalisiert und gehen graduell in solche des muskulären Typs über (Welsch *et al.*, 2014).

1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung der Blutgefäße, bei der es zur Bildung atherosklerotischer Plaques kommt (Hansson, 2005).

Von der Atherosklerose betroffen sind in erster Linie die großen und mittelgroßen Arterien wie die Aorta, die Iliakal- und Femoralgefäße, die Koronarien und die zerebralen Gefäße (Ross und Glomset, 1973). Nach der *Response-to-Injury* Hypothese von Ross *et al.* steht am Anfang der atherosklerotischen Pathogenese die endotheliale Dysfunktion (Ross *et al.*, 1977). Mögliche Ursachen einer Schädigung des arteriellen Endothels sind beispielsweise freie Radikale durch Zigarettenrauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Erkrankungen oder Infektionen. Auch erhöhte Blutfette, im Sinne eines erhöhten *Low-density* Lipoprotein (LDL), sind ursächlich beteiligt (Ross, 1999). Dabei kommt insbesondere der Akkumulation von cholesterinreichem, oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) in der subendothelialen extrazellulären Matrix an Prädilektionsstellen der Gefäßwand bei der Pathogenese der Atherosklerose eine fundamentale Bedeutung zu. OxLDL ist in der Lage proinflammatorische Wachstumsfaktoren und Chemokine zu aktivieren, welche eine lokale Entzündung hervorrufen (Berliner *et al.*, 1995).

Die Inflammation führt zur Auswanderung von Entzündungszellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten aus dem Gefäßlumen und zur Vermehrung dieser in der Läsion. Erstere nehmen oxLDL über sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren auf, akkumulieren Lipide und werden zu Schaumzellen (Ross, 1999). Mittlerweile ist bekannt, dass auch glatte Muskelzellen in der Lage sind sich über die Aufnahme von Lipiden zu Schaumzellen zu entwickeln (Allahverdian *et al.*, 2012).

Im Verlauf entsteht die erste erkennbare Läsion bei der Bildung einer atherosklerotischen Plaque, welche als *fatty streak* bezeichnet wird (Stary *et al.*, 1994; Ross, 1999). Dieser „fettige Streifen“ besteht aus Schaumzell-Makrophagen, Lipidtropfen-haltigen glatten Muskelzellen der Intima, heterogenen Tropfen extrazellulärer Lipide und grobkörnigen Partikeln (Stary *et al.*, 1994).

Makrophagen und Lymphozyten setzen weitere Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und hydrolytische Enzyme frei (Ross, 1999). Bei Makrophagen ist dies unter anderem der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), welcher ein Stimulanz der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen ist (Ross *et al.*, 1990; Ross, 1999; Wang *et al.*, 2015). Auch Endothelzellen der Läsion sind in der Lage PDGF zu synthetisieren (Raines, 2004). Physiologisch in der Media der Arterienwand lokalisiert, können glatte Muskelzellen so dazu angeregt werden, in die Intima zu migrieren und zu

proliferieren. Dabei wechseln sie von ihrem eigentlich kontraktilem Phänotyp zu einem synthetisierendem Phänotyp und produzieren extrazelluläre Matrix (Ross, 1999; Libby und Theroux, 2005; Lacolley *et al.*, 2012). Die entstehende pathologische Akkumulation von Zellen und extrazellulärer Matrix innerhalb der Intima wird als Neointima bezeichnet (Wainwright *et al.*, 2001).

Im Verlauf entsteht eine fortgeschrittene Läsion, die fibröse Plaque. Diese wölbt sich in das arterielle Lumen vor und kann so den Blutstrom beeinflussen. Sie wird gebildet von einer dichten Kappe aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen. Die fibröse Kappe überdeckt einen Kern aus Lipiden und nekrotischem Material (Ross, 1993). Zunächst bildet sie eine Schutzschicht zwischen den Thrombozyten des zirkulierenden Blutes und dem prothrombotischen Material der Plaque. Die Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque führt so in den meisten Fällen nicht zwangsläufig zu akuten Ereignissen in den betroffenen Gefäßen. Durch große Nekrosen innerhalb der Intima, Ausdünnung der fibrösen Kappe und erhöhter Entzündungsaktivität in der Läsion können sich jedoch sogenannte „vulnerable Plaques“ bilden (Tabas *et al.*, 2015). Rupturen von Plaques gehen überwiegend von Randbereichen („Schulterregionen“) der Plaques aus (Shah, 2002). Einrisse der fibrösen Kappe führen dabei zur Exposition thrombogener Komponenten der Plaque. Dies geht mit der Aktivierung von Blutplättchen einher und führt schließlich zur Aktivierung der Gerinnungskaskade. Die Bildung eines Thrombus kann in einer Beeinträchtigung des Gefäßlumens resultieren (Shah, 2002). Entsteht eine okklusive Thrombose, können Endorganschäden die Folge sein (Tabas *et al.*, 2015).

Zwar entsteht die Mehrheit der Koronarthrombosen auf dem Boden einer solchen Plaqueruptur, jedoch sind 30-40 % der akuten thrombotischen Ereignisse durch Plaqueerosionen bedingt. Dabei kommt es zum Verlust von Endothelzellen über der atherosklerotischen Läsion am Ort der deutlichsten luminalen Vorwölbung (Kolodgie *et al.*, 2004). Der direkte Kontakt von Blutplättchen und Fibrin mit extrazellulären Matrixmolekülen der Läsion kann zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und schließlich zur Atherothrombose führen (Kolodgie *et al.*, 2004).

1.2 Hormontherapie und kardiovaskuläre Erkrankungen

Aufgrund der verminderten ovariellen Produktion von weiblichen Geschlechtshormonen, insbesondere von Östrogenen und Gestagenen, kommt es bei Frauen im fortschreitenden Lebensalter zur Menopause. Die Menopause beschreibt den Zeitpunkt der letzten spontanen Menstruation, welcher in den westlichen Nationen durchschnittlich bei etwa 51 Jahren liegt (Kaufmann, 2013). Der Zeitraum vor der Menopause wird Prämenopause genannt und der Zeitraum nach der Menopause wird als Postmenopause bezeichnet. Die sogenannte Perimenopause beschreibt einen Zeitraum der ein Jahr vor der Menopause beginnt und ebenfalls ein Jahr nach dieser endet (Kaufmann, 2013).

Als Klimakterium bezeichnet man die gesamte Phase des Überganges aus dem fortpflanzungsfähigen Alter der Frau, bis zur Erschöpfung der Östrogensekretion und dem Verlust der generativen Funktion. Somit umfasst das Klimakterium, umgangssprachlich als Wechseljahre bezeichnet, einen Teil der Prämenopause, die Perimenopause und einen Teil der Postmenopause (Kaufmann, 2013).

Aufgrund des Verlustes von Follikeln und funktionsfähigen Granulosazellen geht das Klimakterium mit verminderten Östradiol- und Progesteronspiegeln einher (Kaufmann, 2013). Infolge der verminderten Östrogen-Synthese können sich klimakterische Beschwerden oder Erkrankungen entwickeln. Die Hormontherapie (HT) ist diesbezüglich die wirkungsvollste verfügbare Therapie (Ortmann und Latrarch, 2012). Die alleinige Einnahme von Östrogenen erhöht jedoch das Risiko für die Entwicklung von endometrialer Hyperplasie und von Endometriumkarzinomen (Barrett-Connor und Grady, 1998). Gestagene antagonisieren diesen Effekt von Östrogen auf das Endometrium und sind daher in Kombination bei einer HT von nicht-hysterektomierten Frauen indiziert (Barrett-Connor und Grady, 1998; Sitruk-Ware, 2002; Ortmann und Latrarch, 2012).

Eine HT kann laut der deutschen Leitlinie in der Peri- und Postmenopause zur Therapie von klimakterischen Beschwerden, wie Hitzewallungen, Schweißausbrüchen und vulvovaginaler Atrophie, erwogen werden (Ortmann *et al.*, 2011). Auch bei Therapie und Prävention der Osteoporose kann eine HT zum Einsatz kommen. So kann bei postmenopausalen Frauen auf eine zusätzliche spezifische Osteoporose-Therapie verzichtet werden, wenn wegen vasomotorischer Symptome ohnehin eine HT durchgeführt wird. Eine isolierte antiosteoporotische Kombinationstherapie mit Östrogenen und Gestagenen ist aufgrund eines ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses nur in Ausnahmefällen empfohlen (Niedhart, 2016).

Bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen kann, aufgrund der Tatsache, dass bei Frauen im Vergleich zu Männern kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Latenz von ca. 10-20 Jahren auftreten, eine protektive Wirkung weiblicher Geschlechtshormone vermutet werden (Regitz-Zagrosek, 2006; Kaufmann, 2013). Mögliche protektive Effekte werden vor allem der Wirkung von Östrogenen zugeschrieben (Mendelsohn, 2002).

Die Studienlage bezüglich der Wirkung einer kombinierten HT mit Östrogenen und Gestagenen auf kardiovaskuläre Ereignisse ist nach wie vor kontrovers. Aus der *Nurses' Health Study* wurde zum Beispiel zunächst darauf geschlossen, dass die HT mit der kombinierten Gabe von Östrogen und Gestagen, genau wie die alleinige Gabe von Östrogen, einen kardioprotektiven Effekt aufweist (Grodstein *et al.*, 1996).

Die *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) hingegen konnte bei der Behandlung mit konjugierten equinen Östrogenen (CEE) in Kombination mit Medroxyprogesteron-acetat (MPA) keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe bezüglich des primären Endpunktes „nicht tödlicher Myokardinfarkt oder Tod durch koronare Herzkrankheit“ feststellen. Die Teilnehmerinnen waren bei Aufnahme in die Studie bereits kardiovaskulär erkrankt, womit es sich um eine Studie zur Sekundärprävention handelte (Hulley *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wiesen > 95 % der Probandinnen des Östrogen/Gestagen-Armes des *Womens Health Initiative Trial* (WHI) bei Aufnahme in die Studie keine kardiovaskuläre Erkrankung auf (Magliano *et al.*, 2006). Auch in dieser Studie erhielten die Probandinnen die oben genannte medikamentöse Kombination. Aufgrund des Überschreitens der Abbruchgrenze für das Auftreten von Brustkrebs-Fällen wurde der Östrogen/Gestagen-Arm der Studie nach 5,2 Jahren abgebrochen. Da bereits zu diesem Zeitpunkt eine Zunahme kardiovaskulärer Endpunkte im Vergleich zur Placebogruppe bestand, wäre bei Fortführung der Studie, laut Rossouw *et al.* in dieser Hinsicht ein negativer Ausgang zu erwarten gewesen (Rossouw *et al.*, 2002).

Unter der Verwendung von Östradiol und Norethisteron-acetat (NET-A) konnte eine weitere randomisierte Studie hingegen eine signifikante Verminderung von Mortalität, Myokardinfarkten und Herzversagen zeigen (Schierbeck *et al.*, 2012).

Aufgrund der nicht eindeutigen Studienlage und der daraus resultierenden eher ungünstigen Einschätzung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses ist die HT weder zur Primär- noch zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen empfohlen (Ortmann *et al.*, 2011).

1.3 Steroidhormone

Als Steroidhormone bezeichnet man eine Gruppe von Hormonen, welche im menschlichen Körper in mehreren Schritten aus Cholesterin synthetisiert werden. Sie werden in fünf Hauptklassen unterteilt: Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Östrogene, Gestagene und Androgene (Berg *et al.*, 2013).

Als hydrophobe Moleküle diffundieren Steroide durch Zellmembranen und binden an Hormonrezeptoren. Die Bindung des Hormons, in diesem Zusammenhang als Ligand bezeichnet, führt zur Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes. Dieser Komplex bindet schließlich an Kontrollelemente der DNA und reguliert so die Expression verschiedenster Gene (Berg *et al.*, 2013). Dabei treten unmittelbare Folgen der Genexpression mit einer deutlichen Latenz von mehr als 30 min auf (Falkenstein *et al.*, 2000a). Neben diesem klassischen Modell der Wirkweise von Steroidhormonen sind jedoch inzwischen auch schnelle, sogenannte nicht-genomische Effekte beschrieben. Diese können bereits nach Sekunden bis Minuten auftreten (Falkenstein *et al.*, 2000b). Solche schnellen Effekte der Steroidhormone können auch durch Bindung an Rezeptoren der Zellmembran auftreten und werden so unter anderem durch die rezeptorvermittelte Aktivierung von spezifischen Proteinkinasen ausgelöst (Falkenstein *et al.*, 2000b).

1.3.1 Gestagene

Als Steroidhormone haben die verfügbaren synthetischen Gestagene bezüglich ihrer Molekülstruktur eine große Ähnlichkeit. Hinsichtlich ihrer Pharmakodynamik weisen sie unterschiedliche Affinitäten zu den Subklassen der Steroidrezeptoren auf und bilden daher keinesfalls eine homogene Substanzgruppe (Stanczyk *et al.*, 2013).

Dementsprechend unterschiedlich sind auch die vermuteten Wirkungen im Rahmen einer HT (Sitruk-Ware, 2003). Für die hier beschriebenen *in vitro* Experimente wurden exemplarisch drei Gestagene ausgewählt: MPA, NET-A und Progesteron (PG).

1.3.1.1 Medroxyprogesteron-acetat (MPA)

Bei MPA handelt es sich um das synthetische Gestagen, welches bislang im Rahmen der HT am weitesten verbreitete Anwendung findet (Stanczyk *et al.*, 2013). Auch in den Studien HERS und WHI war es das verwendete Gestagen (Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002). Sowohl im Vergleich mit NET-A, als auch mit anderen synthetischen Gestagenen hat MPA ausgeprägte Aktivität am Glukokortikoidrezeptor (Stanczyk *et al.*,

2013). Zusätzlich sind für MPA androgene Effekte beschrieben, welche im Rahmen einer HT positive Östrogenwirkungen aufheben könnten (Wakatsuki *et al.*, 2001).

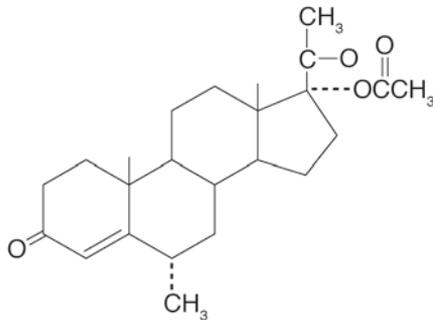


Abb. 1: Medroxyprogesteron-acetate (MPA)
– Stanczyk *et al.* (Stanczyk *et al.*, 2013)

1.3.1.2 Norethisteron-acetat (NET-A)

NET-A ist ebenfalls ein synthetisches Gestagen. Im Vergleich zu MPA weist NET-A weitaus geringere Effekte am Glukokortikoidrezeptor auf (Stanczyk *et al.*, 2013). Zusätzlich besitzt NET-A wie MPA geringe Aktivität am Androgenrezeptor und wirkt, anders als PG und MPA, nicht auf Mineralokortikoidrezeptoren (Kuhl, 2005). Philibert *et al.* konnten gegenüber MPA eine geringe Aktivität am Östrogenrezeptor messen, jedoch wird überwiegend in der Literatur nicht von einer östrogenen Wirkung durch NET-A ausgegangen (Philibert *et al.*, 1999; Kuhl, 2005; Stanczyk *et al.*, 2013).

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, konnte unter der Verwendung von NET-A in der HT eine signifikante Verminderung von Mortalität, Myokardinfarkten und Herzversagen gezeigt werden (Schierbeck *et al.*, 2012).

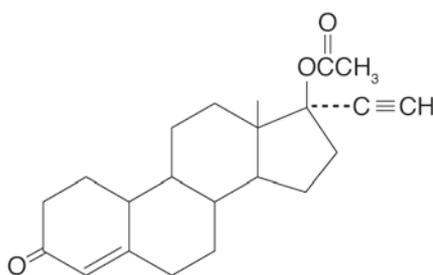


Abb. 2: Norethisteron-acetat (NET-A)
– Stanczyk *et al.* (Stanczyk *et al.*, 2013)

1.3.1.3 Progesteron (PG)

PG ist das physiologische Gelbkörperhormon. Außer im Gelbkörper wird es auch in der Plazenta und in der Nebenniere gebildet (Aktories *et al.*, 2013). Zur medikamentösen

Therapie ist PG im Vergleich zu synthetischen Gestagenen aufgrund seiner niedrigen Bioverfügbarkeit nur bedingt geeignet. Bei oraler Verabreichung wird es nicht nur ungenügend resorbiert, sondern unterliegt aufgrund seiner chemischen Struktur auch einem ausgeprägten *First-Pass*-Metabolismus in der Leber (Stanczyk *et al.*, 2013). Mittels sogenannter Mikronisierung kann die Größe von PG-Partikeln vermindert werden. Durch dieses Verfahren konnte die Löslichkeit von PG im Magen-Darm-Trakt gesteigert werden und zumindest die Absorption wurde so entscheidend verbessert (de Lignieres, 1999; Stanczyk *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu MPA weist PG eine geringere Wirkung auf Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren auf und hat anders als NET-A und MPA keine Wirkung auf Androgenrezeptoren (Kuhl, 2005).

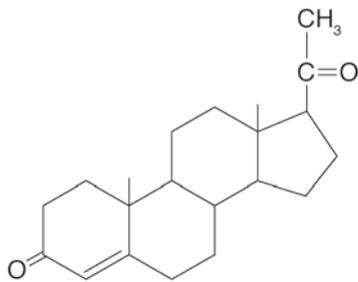


Abb. 3: Progesteron (PG)
– nach Stanczyk *et al.* (Stanczyk *et al.*, 2013)

1.4 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

PDGF wurde vor mittlerweile über 40 Jahren auf der Suche nach Serumfaktoren entdeckt, welche die Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren (Ross *et al.*, 1974; Alvarez *et al.*, 2006). Der Wachstumsfaktor konnte schließlich aus Plättchen gewonnen werden, da er hauptsächlich in deren α -Granula gespeichert ist. Ungeachtet seines Namens sind jedoch viele Zelltypen in der Lage PDGF zu synthetisieren – darunter auch aktivierte Endothelzellen und Makrophagen, wobei letztere die wichtigste Quelle von PDGF zu Beginn der Entstehung atherosklerotischer Läsionen zu sein scheinen (Heldin und Westermark, 1999; Ross, 1989). Mittlerweile sind fünf verschiedene Isotypen von PDGF bekannt: Homo- und Heterodimere aus A- und B-Ketten und Homodimere aus C- oder D-Ketten. In dimerisierter Form ergeben sich somit PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD (Alvarez *et al.*, 2006).

Im Rahmen der Atherogenese spielt vor allem PDGF-BB eine große Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Atherogenese bei Kaninchen, die mit cholesterinreichem Futter gefüttert wurden, durch die Verabreichung von Antikörpern gegen PDGF-BB vermindert

wurde (Rutherford *et al.*, 1997). Weiter ist bekannt, dass PDGF-BB zusammen mit *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) einer der Hauptmediatoren der phänotypischen Veränderung von vaskulären glatten Muskelzellen ist (Lacolley *et al.*, 2012). In gesunden Arterien wird in der Regel kein PDGF produziert, jedoch enthalten atherosklerotische Läsionen aller Stadien PDGF-BB (Papakonstantinou *et al.*, 1995). Es stimuliert sowohl die Migration als auch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und begünstigt so die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Bornfeldt *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1996; Ross, 1999). Umgekehrt führt die Hemmung PDGF-vermittelter Signalkaskaden zu verminderter Neointima-Bildung *in vivo* (Caglayan *et al.*, 2011).

Als Wachstumsfaktor beeinflusst PDGF-BB auch die Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle. So steigert es unter anderem die Synthese von Hyaluronsäure (HA) in glatten Muskelzellen (Papakonstantinou *et al.*, 1995). In Fibroblasten stimuliert PDGF die Ausbildung von HA und sogenannten HA-Kabeln (Li *et al.*, 2007; Pasonen-Seppänen *et al.*, 2012).

1.5 Hyaluronsäure

Zuerst wurde HA als Bestandteil des Glaskörpers beschrieben, jedoch ist mittlerweile bekannt, dass sie in nahezu jedem Gewebe und Zelltyp von Säugetieren vorkommt. Auch das kardiovaskuläre System stellt hierbei keine Ausnahme dar (Fischer und Schrör, 2007). Analysen in Ratten haben ergeben, dass sich etwa die Hälfte der gesamten HA des Körpers in der Haut befindet, etwa ein Viertel im passiven Bewegungsapparat (Gelenke und Skelett) und der Rest zu etwa gleichen Anteilen in Organen und Muskeln. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen (Reed *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1997). Näherungsweise enthält der menschliche Körper 15 g HA, welche im Vergleich zu anderen Matrixkomponenten einem bemerkenswert schnellen Umbau unterliegt. Täglich wird etwa ein Drittel der gesamten HA umgesetzt (Heldin *et al.*, 2013).

1.5.1 Struktur und Synthese

HA ist ein Polysaccharid, welches durch vielfache Aneinanderreihung eines Disaccharides, bestehend aus Glukuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin, entsteht. Das resultierende Molekül ist dabei nicht verzweigt, besteht in der Regel aus 2.000 - 25.000 Disacchariden und kann so eine Länge von 2 - 25 µm erreichen (Toole, 2004).

Von seiner biochemischen Struktur ist HA das einfachste aller Glykosaminoglykane (GAG). Es ist das einzige GAG, welches nicht sulfatiert ist und nicht kovalent an ein sogenanntes *core*-Protein gebunden ist (Stern, 2004). Aus diesem Grund geht die zelluläre Synthese nicht den Weg eines Proteins über das raue endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, sondern findet direkt enzymatisch an der Zellmembran statt. Die dafür verantwortlichen Hyaluronsäuresynthasen (HAS) sind transmembranäre Enzyme, von denen drei Isoformen bekannt sind: HAS1, HAS2 und HAS3 (Toole, 2004). Sie verknüpfen durch Uridindiphosphat (UDP) aktivierte Zucker und extrudieren die entstehende Kette in den Extrazellularraum (Prehm, 1984) (Abb. 4).

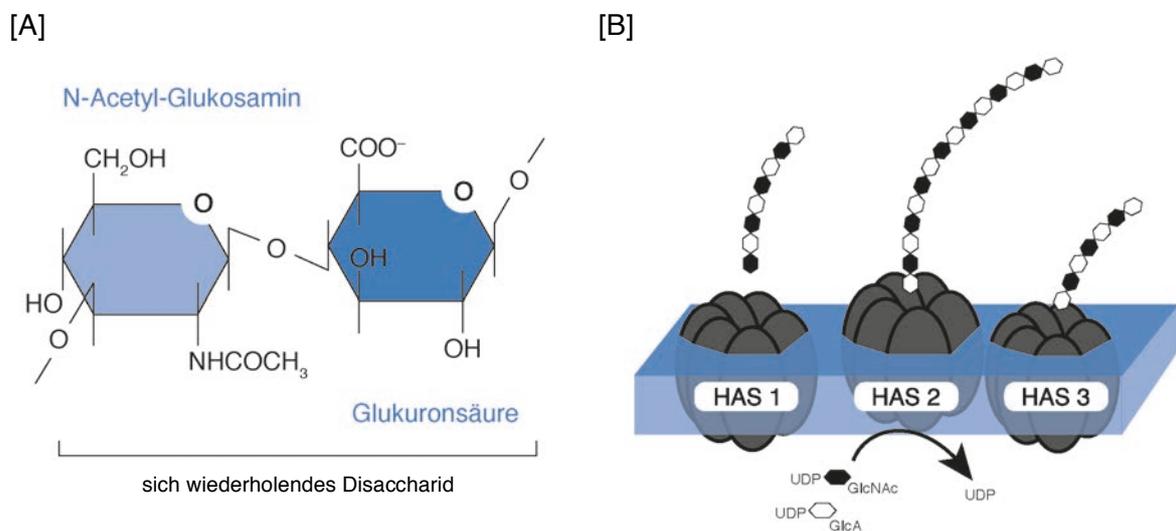


Abb. 4: Hyaluronsäure und die Hyaluronsäuresynthasen. [A] Strukturell schematische Darstellung eines Hyaluronsäure-Disaccharids bestehend aus N-Acetyl-Glucosamin und Glukuronsäure – modifiziert nach Dahiya und Kamal (Dahiya und Kamal, 2013). [B] Schematische Darstellung der drei Hyaluronsäuresynthasen (HAS1-3) und Synthese von Hyaluronsäureketten aus UDP-aktiviertem N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und UDP-aktiverter Glukuronsäure (GlcA) in der Lipiddoppelschicht einer Zellmembran – modifiziert nach Itano und Kimata (Itano und Kimata, 2002).

1.5.2 Funktionelle Bedeutung

HA-Polymere können viele verschiedene Größen, Formen und Konfigurationen annehmen. Sie können sowohl frei zirkulieren als auch gewebegebunden vorkommen (Stern, 2004). Dabei wird HA peri- und extrazellulär durch bestimmte Moleküle, sogenannte Hyaladherine, spezifisch gebunden. Es bilden sich mittels nicht-kovalenter Quervernetzungen große perizelluläre und extrazelluläre Netzwerke (Fischer und Schrör, 2007). Ein Hyaladherin, welches bei glatten Gefäßmuskelzellen

nachgewiesen wurde, ist das Proteoglycan Versican (Yao *et al.*, 1994; Fischer und Schrör, 2007).

Da HA im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht eine hohe osmotische Kapazität aufweist, ist sie von großer Bedeutung für Verteilung und Bewegung des Körperwassers und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Wasserhomöostase (Laurent *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1997). Aufgrund der Fähigkeit Wasser zu binden, ist sie im Glaskörper und in der Gelenkflüssigkeit ein wichtiges Strukturmolekül (Stern, 2004). Dabei ist HA in der Lage, das 10.000-fache des eigenen Gewichtes an Wasser zu binden (Heldin *et al.*, 2013). Durch diese Fähigkeit führt HA zu einer Vergrößerung des extrazellulären Raumes, versorgt Gewebe mit Wasser und ist so zum Beispiel in der Dermis verantwortlich für die Hautfeuchtigkeit (Stern, 2004).

Diese Fähigkeiten zeigen, dass HA eine wichtige Strukturkomponente der extrazellulären Matrix ist. Jedoch hat sezernierte HA auch bedeutenden Einfluss auf die Zellen, die mit ihr in Kontakt stehen. So gibt es Moleküle der Zelloberfläche, welche nach Bindung von HA fähig sind, intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden auszulösen. In diesem Kontext sind vor allem der *Cluster of Differentiation 44* (CD44) und der *Receptor for Hyaluronan Mediated Motility* (RHAMM) zu nennen (Turley *et al.*, 2002; Fischer und Schrör, 2007).

1.5.3 Hyaluronsäure und Atherosklerose

Bei der Pathogenese der Atherosklerose sind Komponenten der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung. Dies beinhaltet auch HA als wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix (Sadowitz *et al.*, 2012). Glatte Muskelzellen produzieren in großen Mengen kabelähnliche Strukturen aus HA, welche für das „Rollen“ und die Adhäsion von Leukozyten von Bedeutung sind (Sadowitz *et al.*, 2012). Auch die Transmigration von Leukozyten durch die Endothelzellschicht der Intima ist durch HA vermittelt (Sadowitz *et al.*, 2012).

Seike *et al.* konnten an murinen Makrophagen zeigen, dass HA in der Lage ist, Komplexe mit LDL zu bilden, deren Aufnahme im Vergleich zu nativem LDL gesteigert ist. Eine Steigerung der Aufnahme von oxLDL blieb bei ihren Untersuchungen allerdings aus (Seike *et al.*, 2006). Demgegenüber wurde in einer anderen Arbeit beschrieben, dass HA die Aufnahme von oxLDL in humane Monozyten erhöht. Dies lässt eine Steigerung der Schaumzellbildung durch HA vermuten (Tabata *et al.*, 2007).

HA führt auch zu einer direkten Stimulation von Leukozyten. Es wird zwar davon ausgegangen, dass hochmolekulare HA anti-inflammatorisch wirkt, im Gegensatz dazu

vermittelt jedoch fragmentierte, niedermolekulare HA die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Sokolowska *et al.*, 2014). Die Erkennung von HA-Fragmenten durch Leukozyten wird dabei beispielsweise durch *Toll Like* Rezeptoren (TLR) vermittelt (Termeer *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2011).

Sezernierte proinflammatorische Moleküle verstärken Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in die Intima (Ross, 1999). Intimale glatte Muskelzellen können ihren Phänotyp wechseln und verhalten sich anschließend synthetisierend anstatt kontraktile (Lacolley *et al.*, 2012). Die aus der Synthese resultierende Erhöhung der HA-Menge in der extrazellulären Matrix geht mit einer Verdickung der Intima einher und anfallende hydratisierte HA macht aus der extrazellulären Matrix schließlich eine ideale Umgebung, in welcher Zellen migrieren und proliferieren können (Vigetti *et al.*, 2008).

Zusätzlich führt der Kontakt mit oxLDL in aortalen glatten Muskelzellen zu einer gesteigerten Expression von HAS2 und HAS3 und zu einer weiteren Steigerung der HA-Bildung. Dies stimuliert deren Migrationsverhalten und steigert die Bindung monozytärer Zellen. Ein HA-Verdau mit Hyaluronidasen (HYAL), von welchen im menschlichen Körper die Isoformen HYAL1 und HYAL2 für den größten Anteil des HA-Abbaus verantwortlich sind, schwächt diese Bindungssteigerung wieder ab (Viola *et al.*, 2013; Stern und Jedrzejewski, 2006).

Während der Alterung von aortalen glatten Muskelzellen kommt es zu einer Steigerung der HA-Synthese. Diese gealterten Zellen zeigen ein schnelleres Migrationsverhalten als junge Zellen (Vigetti *et al.*, 2008). Zusätzlich ist bekannt, dass bei Hemmung der HA-Synthese mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) die Migration aortaler glatter Muskelzellen vermindert ist. Dieser Effekt konnte durch die exogene Zugabe hochmolekularer HA aufgehoben werden (Vigetti *et al.*, 2009).

Auch die Proliferation von glatten Muskelzellen ist abhängig von HA und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung vaskulärer Erkrankungen (Vigetti *et al.*, 2009).

Als Inhibitor der HA-Synthese vermindert 4-MU die Proliferation aortaler glatter Muskelzellen. Bei der Verwendung hoher 4-MU-Konzentrationen kommt es schließlich zu einer Abnahme des Zellüberlebens. Verabreichung exogener hochmolekularer HA zu, mittels 4-MU gehemmten, aortalen glatten Muskelzellen verbessert das Zellüberleben (Vigetti *et al.*, 2009).

Zusätzlich ist bekannt, dass die Bildung einer HA- und Versican-reichen perizellulären Matrix durch glatte Muskelzellen vor allem während der Zellablösung im Rahmen der Migration und bei prämitotischer Zellabrundung auftritt (Evanko *et al.*, 1999). Außerdem

kann die Proliferation von glatten Muskelzellen, wie auch deren Migration, durch HA-Oligosaccharide gehemmt werden. HA-Oligosaccharide verhindern die Ausbildung einer perizellulären Matrix und die Bindung von HA an die Zelloberfläche (Evanko *et al.*, 1999). Weiter wurde gezeigt, dass antiproliferative Effekte auf vaskuläre glatte Muskelzellen nach Stimulation mit dem Steroidhormon 17 β -Östradiol – zumindest teilweise – durch eine Verminderung der HA-Synthese bedingt sind (Freudenberger *et al.*, 2011).

Nicht nur die Produktion von HA, sondern auch deren Abbau durch HYAL1 und HYAL2 und die Fragmentierung von HA durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) haben Einfluss auf atherosklerotische Ereignisse. So führt beispielsweise die Degradierung von hoch- zu niedermolekularer HA durch die genannten Mechanismen zu einer Erhöhung der Aktivität von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9) bei Makrophagen. Dies könnte über eine Verminderung der Stabilität der fibrösen Kappe zu Plaquerupturen führen (Bot *et al.*, 2010).

Auch als strukturgebende Komponente der extrazellulären Matrix spielt HA, im Hinblick auf das akute atherosklerotische und atherothrombotische Ereignis, eine Rolle. Beispielsweise befinden sich in erodierten Regionen von Plaques HA-Ansammlungen, Versican und CD44. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diesen bei akuter Atherothrombose eine besondere Bedeutung zukommt (Kolodgie *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu finden sich an Orten der Plaqueruptur nur wenig HA und Proteoglykane. Der Verlust von HA und Proteoglykanen scheint somit bei der Entstehung von Plaquerupturen von Bedeutung zu sein (Kolodgie *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass eine Ausdünnung der fibrösen Kappe der Plaqueruptur vorausgeht und diese daher für eine erhöhte Vulnerabilität verantwortlich sein könnte. Im Vergleich mit intakten Plaques finden sich in fibrösen Kappen rupturierter Plaques weniger Bestandteile extrazellulärer Matrix und weniger glatte Muskelzellen. Eine geringere Matrix-Synthese oder ein erhöhter Matrix-Abbau könnten für die Ausdünnung von fibrösen Kappen verantwortlich sein (Shah, 2002).

1.6 Einfluss von Steroidhormonen auf glatte Gefäßmuskelzellen

1.6.1 Hyaluronsäureproduktion

Freudenberger *et al.* konnten zeigen, dass MPA die Plaqueauflagerungen in Aorten bei einem Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mausmodell um etwa 20 % reduzierte, wobei der HA-Gehalt der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung unverändert

blieb (Freudenberger *et al.*, 2009). Von PG ist beschrieben, dass es die Produktion von HA in humanen Fibroblasten des Gebärmutterhalses vermindert (Tanaka *et al.*, 1997).

1.6.2 Proliferation und Migration

1.6.2.1 Medroxyprogesteron-acetat (MPA)

Dubey *et al.* konnten keinen Einfluss von MPA auf Zellzahl, DNA-Synthese oder Migration von glatten Muskelzellen feststellen (Dubey *et al.*, 2008). Cholesterinreich ernährte Kaninchen zeigten jedoch bei oraler Therapie mit MPA eine Verminderung der Atherosklerose im Vergleich zur Kontrolle. Bei Therapie mit NET-A war dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Für beide Gestagene gingen die Effekte mit einer Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen einher (Spagnoli *et al.*, 1990). Rönnemaa *et al.* kamen zu dem Schluss, dass eine MPA-vermittelte Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen durch eine Senkung von Serum-Lipiden vermittelt wird, wobei die direkte Stimulation mit MPA keinen Effekt bewirkte (Rönnemaa *et al.*, 1987). Demgegenüber führte die direkte Stimulation mit MPA in einer anderen Untersuchung zu einer Zunahme des Zellwachstums (Seeger *et al.*, 2001).

1.6.2.2 Norethisteron-acetat (NET-A)

Seeger *et al.* untersuchten die Beeinflussung des Serum-stimulierten Zellwachstums glatter Muskelzellen und konnten keinen Einfluss durch direkte Stimulation mit NET-A nachweisen (Seeger *et al.*, 2001). In cholesterinreich ernährten Kaninchen führt hingegen, wie bereits in Abschnitt 1.6.2.1 erwähnt, die orale Therapie mit NET-A zu einer Verminderung der Atherosklerose und zu einer verminderten Proliferation glatter Muskelzellen (Spagnoli *et al.*, 1990).

1.6.2.3 Progesteron (PG)

Suzuki *et al.* konnten keine Beeinflussung der Proliferation und der Migration bei gleichzeitiger Stimulation aortaler glatter Muskelzellen mit PG und PDGF-BB zeigen (Suzuki *et al.*, 1996). Demgegenüber wurde durch Lee *et al.* eine Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen durch die alleinige Stimulation mit PG beschrieben (Lee *et al.*, 1997). Morey *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass Stimulation mit PG die serum-stimulierte Zunahme der Zellzahl vaskulärer glatter Muskelzellen vermindert (Morey *et al.*, 1997).

1.6.3 Signaltransduktion

1.6.3.1 p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK)

Die p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) spielt bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. Dazu gehören Entzündungsvorgänge, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Zelltod (Ono und Han, 2000). Sie wird meist durch extrazelluläre Stimuli (z.B. bakterielle Stimuli und Zytokine) aktiviert und die vermittelte Signaltransduktion führt anschließend zur Transkription von Genen im Zellkern (Ono und Han, 2000). Auch in anderen zellulären Kompartimenten kann die p38 MAPK verschiedene zelluläre Funktionen vermitteln (Ono und Han, 2000). Nach Yang *et al.* führt PDGF zu einer Aktivierung der p38 MAPK in glatten Muskelzellen der Atemwege (Yang *et al.*, 2015).

Weiter wurde gezeigt, dass das Steroid Dexamethason die PDGF-induzierte Phosphorylierung von p38 MAPK und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmt (Xu *et al.*, 2011). Zusätzlich ist beschrieben, dass die Phosphorylierung der p38 MAPK in Interleukin-1 β -stimulierten Fibroblasten durch Stimulation mit MPA vermindert wird (Zhou *et al.*, 2012).

Die p38 MAPK ist auch in die Regulation der Transkription von HAS involviert. Beispielsweise erhöht der p38 MAPK-Aktivator Anisomycin die Expression der HAS1-mRNA in Fibroblasten. Umgekehrt konnte die, durch Stimulation mit Kollagenfragmenten induzierte Expression von HAS1-mRNA mittels des p38 MAPK-Inhibitors SB203580 gehemmt werden (Röck *et al.*, 2011). Rauhala *et al.* wiesen eine Beteiligung der p38 MAPK bei der Steigerung der HA-Synthese nach ultravioletter Bestrahlung von Keratinozyten nach (Rauhala *et al.*, 2013).

1.6.3.2 p44/42 mitogenaktivierte Proteinkinase (p44/42 MAPK)

Die p44/42 mitogenaktivierte Proteinkinase (p44/42 MAPK) gehört zur Gruppe der *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK). Sie wird auch als ERK1/ERK2 bezeichnet (Yamamoto *et al.*, 2006). ERK werden durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren aktiviert, welche Proliferation und Hypertrophie von glatten Gefäßmuskelzellen fördern. Dies sind unter anderem PDGF, Angiotensin II, Endothelin, Thromboxan A₂, Prostaglandin-H₂, Prostaglandin-F_{2 α} , Thrombin, Noradrenalin und Acetylcholin.

Die Bindung eines dieser Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosin-Kinasen aktiviert über weitere Effektormoleküle schließlich ERK. Nach Translokation in den Zellkern ist ERK in der Lage, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren

und so die Genexpression zu regulieren (Force und Bonventre, 1998). Umgekehrt führt der selektive ERK-Inhibitor PD98059 zu einer Verminderung der Proliferation stimulierter glatter Gefäßmuskelzellen (Yamamoto *et al.*, 2006). Auch die durch PDGF-BB vermittelte Migration vaskulärer Gefäßmuskelzellen kann durch ERK1/ERK2 vermittelt sein und wird ebenfalls durch PD98059 vermindert (Graf *et al.*, 1997). Gennaro *et al.* zeigten, dass die p44/42 MAPK bei gealterten glatten Muskelzellen eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu jungen Zellen aufweist. Weiter beschrieben sie eine gesteigerte Phosphorylierung der p44/42 MAPK *in vivo* nach Angioplastie bei Kaninchen. Dieser Effekt ging mit erhöhter Proliferation und erhöhter Bildung von Neointima einher und wurde durch den ERK-Inhibitor PD98059 gehemmt (Gennaro *et al.*, 2003).

Auch Steroidhormone sind in der Lage, über schnelle, nicht-genomische Effekte ERK zu aktivieren. So führen PG, MPA und 17 β -Estradiol zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK in neuronalen Zellen (Nilsen und Brinton, 2002). Vigetti *et al.* konnten eine Erhöhung der HA-Synthese, der Expression von HAS2, HAS3 sowie von CD44 und der Phosphorylierung der p44/42 MAPK bei gealterten aortalen Gefäßmuskelzellen im Vergleich mit jungen Zellen *in vitro* nachweisen (Vigetti *et al.*, 2008). Zusätzlich führt die Hemmung der p44/42 MAPK in Fibroblasten zu einer verminderten Expression der HAS2 (Röck *et al.*, 2011).

1.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit werden *in vitro* die Wirkungen der synthetischen Gestagene MPA und NET-A auf die Synthese von HA in humanen koronar-arteriellen Gefäßmuskelzellen (HCASMC) untersucht.

Dabei werden Effekte dieser Hormone auf zelluläre Funktionen evaluiert, welche im Rahmen der Entstehung atherosklerotischer Läsionen von Bedeutung sind und durch HA vermittelt werden können. Zusätzlich werden potenziell involvierte Signaltransduktionswege identifiziert.

Neue Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Wirkung synthetischer Gestagene auf zellulärer Ebene im Hinblick auf die mögliche Beeinflussung von Atherogenese führen.

2 Material und Methoden

Tabelle 1: Verwendete Lösungen

Blotpuffer		
70 mL	dest. H ₂ O	
20 mL	Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
10 mL	10 x Laufpuffer	s.u.
Coomassie-Färbung		
50,0 %	Isopropanol	Merck-Millipore, Burlington, USA
10,0 %	Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
0,2 %	Coomassie Brilliant-Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	ad dest. H ₂ O	
Fixierlösung für Immunzytochemie		
7,0 mL	Ethanol	Merck-Millipore, Burlington, USA
1,5 mL	PBS	Invitrogen, Carlsbad, USA
1,0 mL	37 % Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,5 mL	Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Laemmli-Puffer (2 x)		
3,75 mL	1 M Tris (pH 6,8)	s.u.
6,00 mL	Glycerol 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
12,00 mL	10 % SDS	Serva, Heidelberg
8,25 mL	H ₂ O	
8 %	2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
2 mM	Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10 mM	Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1:1000	Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Laufpuffer (10 x)		
144 g	Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
30 g	Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	ad 1 L dest. H ₂ O	

Laufpuffer (1 x)		
100 mL	10 x Laufpuffer	s.o.
10 mL	10 % SDS (ad dest. H ₂ O)	Serva, Heidelberg
<i>ad</i> 1 L dest. H ₂ O		
Natronlauge (0,1 M)		
4 g	Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck-Millipore, Burlington, USA
<i>ad</i> 1 L dest. H ₂ O		
PBS		
2,7 mM	Kaliumchlorid	Merck-Millipore, Burlington, USA
1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck-Millipore, Burlington, USA
137 mM	Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
7,8 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (pH 7,4)	Merck-Millipore, Burlington, USA
TBS (10 x)		
100 mM	Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1,5 M	Natriumchlorid (pH 7,6)	Carl Roth, Karlsruhe
TBS/T		
100 mL	10 x TBS	s.o.
0,1 %	Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>ad</i> 1 L dest. H ₂ O		
1,5 M Tris (pH 8,8)		
1,5 M	Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>ad</i> pH 8,8	Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
1 M Tris (pH 6,8)		
1 M	Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>ad</i> pH 6,8	Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe

2.1 Zellkultur

HCASMC (Promocell, Heidelberg) wurden in *Smooth Muscle Cell Growth Medium 2* (Promocell, Heidelberg) versetzt mit *Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 SupplementMix* (Promocell, Heidelberg) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dabei stets subkonfluent kultiviert. Zum Passagieren wurden sie mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und anschließend für 5 min mit Trypsin / EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das vollständige Ablösen vom Boden der Kulturflaschen wurde anschließend mittels Lichtmikroskopie verifiziert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe der identischen Menge von *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, USA), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) (Invitrogen, Carlsbad, USA) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA), gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 50 mL *Falcon-Tubes* (Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich) gegeben und bei 1100 rcf für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 1 mL Wachstumsmedium resuspendiert. Zur Zählung der Zellen wurden 10 µL der Suspension mit 10 µL 0,4 % Trypanblau (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt. Die gefärbte Suspension wurde automatisiert gezählt (*Countess Automated Cell Counter*, Invitrogen, Carlsbad, USA). Für durchgeführte Versuche und weitere Kultivierung wurden nur Zellsuspensionen mit einer Vitalität von > 95 % verwendet.

Die Zellen wurden in Wachstumsmedium mit einer Zellzahl von 10.000 / cm² in Kulturflaschen ausgesät. Die beschriebene Trypsinierung und Zellzählung wurde analog auch zur Aussaat der Zellen vor den Versuchen durchgeführt. Die Zellen wurden maximal bis Passage acht für Versuche verwendet.

2.2 Stimulation der Zellen

HCASMC wurden mit einer Zellzahl von 10.000 / cm² auf 6-Loch-Platten bzw. 12-Loch-Platten oder 24-Loch-Platten (Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich) in 1000 µL bzw. 500 µL oder 250 µL Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und zur Synchronisierung mit serumfreiem Medium, bestehend aus DMEM mit 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Invitrogen, Carlsbad, USA) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA) inkubiert.

Nach 24 h unter serumfreien Bedingungen wurde das Medium abgesaugt und durch frisches serumfreies Medium ersetzt, welches je nach Versuch mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Stimulanzen versetzt wurde.

Tabelle 2: Verwendete Stimulanzen in der Zellkultur

Stimulanz		Firma	Konzentration
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor - BB</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10 ng/mL
MPA	<i>Medroxyprogesterone 17-acetate</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10 nM; 10 μ M
NET-A	<i>19-Norethindrone acetate</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10 nM; 10 μ M
PG	<i>Progesterone</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10 nM; 10 μ M
Poly I:C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid, high molecular weight</i>	InvivoGen, San Diego, USA	20 μ g/mL

Die Trockensubstanzen MPA, NET-A und PG wurden in Ethanol (Merck-Millipore, Burlington, USA) gelöst. Eine Endkonzentration von Ethanol im Medium von mehr als 1 %o wurde bei den Versuchen nicht erreicht. Polyinosin-polycytidinsäure (*Polyinosinic-polycytidylic acid*, Poly I:C) wurde gemäß der Herstelleranweisungen in H₂O gelöst. PDGF-BB wurde gemäß der Herstelleranweisung in 4 mM Salzsäure (Carl Roth, Karlsruhe) mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst.

2.3 Immunhistochemische Färbung von Hyaluronsäure

Zur Färbung der perizellulären HA wurden HCASMC auf 18 mm Deckgläsern in 12-Loch-Platten, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, ausgesät und für 24 h stimuliert. Als Negativkontrolle wurde je eine Probe nach 23 h mit Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einer Endkonzentration von 2 U / mL versetzt und weiter inkubiert.

Für die Färbung wurden die Zellen mit 37 °C warmem PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen. Anschließend wurde die Fixierlösung (siehe Tabelle 1) ebenfalls auf 37 °C erwärmt und die Zellen wurden in jeweils 300 μ L dieser Lösung fixiert. Nach 20 min wurde

die Fixierlösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden drei Mal für je 5 min mit PBS gewaschen.

Nach dem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 45 min langsam schwenkend bei Raumtemperatur blockiert. Dabei wurden jeweils 300 μ L der Blockierlösung verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit je 200 μ L 0,4 % biotinyliertem Hyaluronsäure-bindendem-Protein (HABP) (Calbiochem / Merck-Millipore, Burlington, USA) in PBS mit 2,5 % BSA für 60 min langsam schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit HABP wurde erneut drei Mal für je 5 min mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen für 45 min mit jeweils 250 μ L 0,1 % an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gebundenem Streptavidin (Dako, Carpinteria, USA) in PBS mit 2,5 % BSA langsam schwenkend inkubiert.

Danach wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend die Deckgläser aus der 12-Loch-Platte entfernt. Zur Färbung der Zellkerne und für die spätere Mikroskopie wurden die Deckgläser anschließend mit je 20 μ L *ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI* (Invitrogen, Carlsbad, USA) auf Objektträgern eingebettet.

2.4 Mikroskopie

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen wurden mittels des *Axiovert 40 CFL* Mikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) in Kombination mit der *AxioCam ICM1* (Carl Zeiss, Oberkochen) und der *AxioVision-Software* (Version 4.8.2) (Carl Zeiss, Oberkochen) erstellt.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mittels des *Axio Imager.M2* Mikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) mit der *AxioCam HRc* (Carl Zeiss, Oberkochen) oder des *Axio Observer.Z1* Mikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) mit der *AxioCam MRm* (Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Auch dabei wurde die *AxioVision-Software* verwendet.

2.5 Bestimmung der Hyaluronsäure-Konzentration im Medium

HCASMC wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, auf 6-Loch-Platten ausgesät und stimuliert. Zusätzlich wurde ein weiteres Loch mit Kontrollmedium befüllt, um bei der späteren Photometrie die Absorption des reinen Mediums bestimmen zu können. 24 h nach der Stimulation wurde das Medium in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 100 μ L 0,1 M Natronlauge (Merck-Millipore, Burlington, USA) lysiert. Das Lysat

wurde ebenfalls in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße gegeben und sowohl das Medium, als auch das Zell-Lysat wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Zur quantitativen Bestimmung der HA im Medium wurde das *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix, Broomfield, USA) nach der Herstelleranleitung verwendet. Die Photometrie wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im *Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

Unter Verwendung einer Eichkurve und nach Substraktion der Medium-Leerwert-Absorption von den jeweiligen Absorptionswerten der Mediumproben konnten schließlich die HA-Konzentrationen bestimmt werden. Für die Normierung der Proben wurde die errechnete Menge der HA auf die Proteinmenge der entsprechenden Probe bezogen.

2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge wurde mittels des *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt.

Als Proteinstandard wurde dabei eine lineare Albumin-Messreihe (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 0,4 bis 2,8 µg Albumin je Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte verwendet. Das Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt und die Löcher der Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 200 µL des Reagenzes und 30 µL der Proteinproben befüllt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurde die Absorption bei 595 nm mittels des *Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometers* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen.

2.7 RNA-Isolation

HCASMC wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, auf 6-Loch-Platten ausgesät und stimuliert. 6 h nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und jeweils 1 mL Trizol (PeqLab, Erlangen) auf die Zellen gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat zunächst bei -80 °C tiefgefroren. Die RNA wurde später gemäß der Anleitung des Herstellers extrahiert.

Dabei wurde nach Ausschütteln mit 200 µL Chloroform (VWR Chemicals, Radnor, USA) und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm (*Centrifuge 5424 R*, Eppendorf, Hamburg) eine Auftrennung in drei Phasen vorgenommen und anschließend die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die wässrige Phase wurde mit dem identischen Volumen 70 % Isopropanol (Merck-Millipore, Burlington, USA) versetzt und die RNA wurde durch Zentrifugation für

45 min mit 13.000 rpm bei 4 °C (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg) gefällt. Nach Absaugen des Überstandes wurde anschließend die gefällte RNA mit 1 mL 75 % Ethanol (Merck-Millipore, Burlington, USA) unter erneuter Zentrifugation für 15 min mit 13.000 rpm bei 4 °C gewaschen. Nach vorsichtigem Absaugen des Ethanols wurde das Pellet für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 15 µL Reinstwasser (Merck-Millipore, Burlington, USA) für 5 min bei 65 °C und 300 rpm (*Thermomixer comfort*, Eppendorf, Hamburg) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und die Menge und Reinheit der RNA wurde mittels Photometrie im *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Zuletzt wurden die Proben bei -80 °C tiefgefroren.

2.8 cDNA-Synthese

Zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurde gemäß der Herstelleranleitung jeweils 1 µg der zuvor extrahierten RNA mit Reinstwasser (Merck-Millipore, Burlington, USA) auf ein Gesamtvolumen von 12 µL gebracht. Anschließend wurden jeder Probe 2 µL *gDNA-Wipeout Buffer* (Qiagen, Hilden) hinzugefügt und die Proben wurden für 2 min auf 42 °C erhitzt. Danach wurden jeder Probe 4 µL *Quantiscript RT Buffer*, 1 µL *RT Primer Mix* und 1 µL *Quantiscript Reverse Transcriptase* (jeweils Qiagen, Hilden) hinzugefügt.

Die Proben wurden für die Reverse-Transkriptase-Reaktion bei 42 °C für 30 min inkubiert und anschließend wurde die Reverse-Transkriptase für 5 min bei 95 °C inaktiviert. Abschließend wurden den Proben jeweils 100 µL Reinstwasser (Merck-Millipore, Burlington, USA) hinzugefügt und sie wurden bei 4 °C gelagert.

Zur Durchführung der reversen Transkription wurden entweder der *primus 96 advanced* (PeqLab, Erlangen) oder der *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Für Arbeitsschritte außerhalb der *Cycler* wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.9 Quantitative *Realtime* PCR

Zur Quantifizierung der zuvor synthetisierten cDNA wurde der *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, USA) im *Applied Biosystems 7300 Real-Time-PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Identische Mengen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden in H₂O gelöst. Jeweils 5 µL der zuvor synthetisierten cDNA-Lösung wurde zu 10 µL *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* und 5 µL der Primer-Stammlösung gegeben. Es ergab sich eine Primer-

Konzentration von 0,625 μ M. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden aus der Literatur übernommen und sind in Tabelle 3 aufgelistet (Twarock *et al.*, 2009; Röck *et al.*, 2011).

Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen bei quantitativer *Realtime* PCR

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' - 3')	Rückwärtsprimer (5' - 3')
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
HAS1	TACAACCAGAAGTTCCTGGG	CTGGAGGTGTACTTGGTAGC
HAS2	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
HAS3v1	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCACTAATACTACTGCACAC

Als endogene Kontrolle wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet (Freudenberger *et al.*, 2011). Sowohl die qPCR der Zielgene, als auch die der endogenen Kontrolle wurden stets als Dublett durchgeführt. Die Zyklen für die Amplifikation wurden anhand der Herstellerangaben gewählt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zyklen der quantitativen *Realtime* PCR

Anzahl Zyklen	Zeit	Temperatur
1	2:00 min	50 °C
1	2:00 min	95 °C
40	0:15 min 0:30 min	95 °C 60 °C

Die digitale Auswertung wurde mit der *7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4* (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Analysen mit inhomogenen Schmelzkurven und Analysen, bei denen die einzelnen C_T -Werte der Doppelbestimmungen über 1 C_T -Wert auseinanderlagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.10 Migrations-Assay

Für die Präparation der 48-Loch Chemotaxis Kammer (NeuroProbe, Gaithersburg, USA) wurde zunächst eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von $10\ \mu\text{M}$ (NeuroProbe, Gaithersburg, USA) mit Kollagen beschichtet. Zu diesem Zweck wurde die Membran vorsichtig mit einer Lösung aus $965\ \mu\text{L}$ $0,05\ \text{M}$ Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe) und $35\ \mu\text{L}$ Kollagen (Advanced BioMatrix, Carlsbad, USA) benetzt.

Die unteren Kammern der 48-Loch Chemotaxis Kammer wurden dann mit Medium gefüllt. Zwischen die Kammern wurde zunächst die mit Kollagen beschichtete Polycarbonat-Membran und anschließend eine Silikondichtung gelegt. Auf die Silikondichtung wurde dann der obere Teil der Kammer gelegt und die beiden Teile der 48-Loch Chemotaxis Kammer verschraubt.

HCASMC wurden wie oben beschrieben durch Trypsinieren in Suspension gebracht und gezählt. Jeweils $40\ \mu\text{L}$ Medium mit je 20.000 bzw. 10.000 Zellen wurden in die oberen Kammern gegeben. Die 48-Loch Chemotaxis Kammer wurde anschließend für $6\ \text{h}$ bzw. $24\ \text{h}$ bei $37\ ^\circ\text{C}$ und $5\ \%$ CO_2 inkubiert.

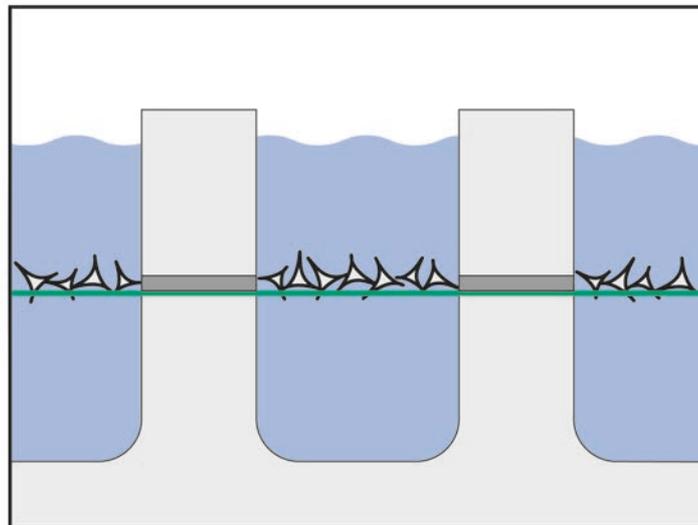


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Migrationsversuches – Querschnitt durch die Chemotaxiskammer zu Beginn des Versuches. Die Zellen befinden sich in der oberen Kammer auf der mit Kollagen beschichteten Polycarbonat-Membran, welche sie von der unteren Kammer trennt.

Für eine Versuchsdauer von $6\ \text{h}$ wurde die Migration von Zellen, welche in der Oberkammer durch MPA (bzw. NET-A) stimuliert wurden, entgegen PDGF-BB in der Unterkammer untersucht. In einem alternativen Versuchsaufbau wurde über eine Versuchsdauer von $24\ \text{h}$ die Migration von Zellen in serumfreiem Medium der Oberkammer entgegen PDGF-BB und MPA (bzw. NET-A) in der Unterkammer im

Vergleich zur Migration gegen PDGF-BB alleine evaluiert. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die Membran aus der Kammer entfernt und die Oberseite jeweils drei Mal nacheinander mit PBS benetzt und dann an einer Gummilippe abgezogen. Die migrierten Zellen an der Unterseite der Membran wurden schließlich mit Coomassie-Lösung gefärbt. Durchgeführte Arbeitsschritte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Coomassie-Färbung

	Zeit	Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	
	5 min	Fixierung	Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
	10 min	Trocknen		
	8 min	Färbung	Coomassie-Lösung	siehe Tabelle 1
3 x	5 min	Waschen	PBS	siehe Tabelle 1

Für die Färbung wurde die Membran zunächst 5 min in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert, anschließend 10 min getrocknet und darauf folgend für 8 min in Coomassie-Lösung (siehe Tabelle 1) gefärbt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurde die Membran abschließend gescannt.

Zum Scan der Membran wurde der *LI-COR Odyssey* Infrarot-Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) verwendet. Bei der Auswertung mittels der zugehörigen Software (Version 3.0.30) wurden nur die Intensitätswerte (*integrated intensity*, I.I.) bestimmt, bei deren zugehöriger Membranfläche keine deutlichen ungefärbte Anteile, zum Beispiel durch Luftblasen oder Beschädigungen, zu erkennen waren.

Nach der Auswertung wurde für jede Membran das arithmetische Mittel aus allen ausgewerteten Löchern einer Bedingung gebildet. Dabei wurden mindestens Triplets analysiert. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 6 exemplarisch ein Migrationsversuch dargestellt, welcher zusätzlich mit 10 % FCS als Positivkontrolle sowie unstimulierten Zellen als Negativkontrolle durchgeführt wurde.

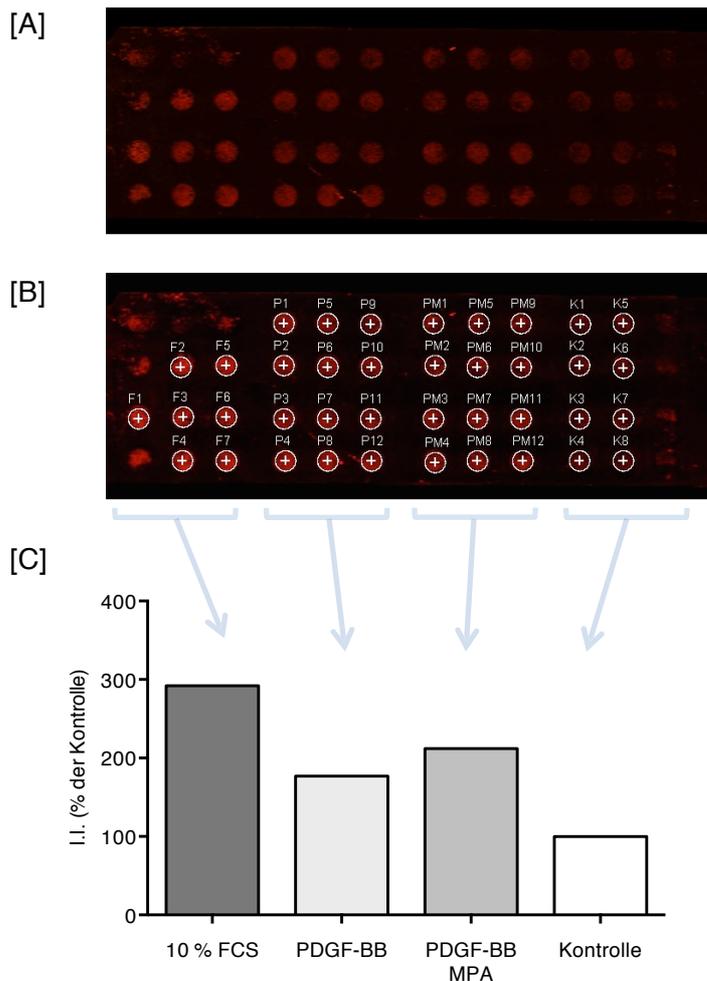


Abb. 6: Auswertung eines Migrationsversuches. [A] Gescannte Membran mit vier verschiedenen Bedingungen in je 12 Löchern der Migrationskammer - von links nach rechts: 10 % FCS, 10 ng/mL PDGF-BB, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M MPA, nicht stimulierte Kontrolle. [B] Auswahl der auswertbaren Membranflächen. [C] Arithmetische Mittel der gemessenen Intensitätswerte (I.I. = *Integrated Intensity*) (n=1)

2.11 Tritium-Thymidin-Inkorporation

HCASMC wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, auf 24-Loch-Platten ausgesät und jeweils in 250 μ L Medium stimuliert. 18 h nach Beginn der Stimulation wurde mit Tritium ($[^3\text{H}]$) markiertes Thymidin (PerkinElmer, Waltham, USA) 1:40 in PBS verdünnt und es wurden 10 μ L in jedes Loch gegeben, so dass sich eine Aktivität von 1 μ Ci/mL ergab. Nach 6 h $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit je 1 mL kaltem PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen. Danach wurden die Zellen ebenfalls zwei Mal für je 2 min mit je 500 μ L 0,1 M Perchlorsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Die Perchlorsäure wurde schließlich abgesaugt und danach wurden je 350 μ L 0,1 M Natronlauge (Merck-Millipore, Burlington, USA) auf die Zellen gegeben und diese wurden für 20 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ lysiert. Anschließend

wurden jeweils 50 µL der Proben für die Proteinbestimmung entnommen und bei -20 °C gelagert. Die restlichen 300 µL Lysat wurden zusammen mit 4,5 mL Szintillationslösung (Carl Roth, Karlsruhe) in Szintillationsröhrchen (Zinsser Analytic, Eschborn) gegeben und gründlich geschwenkt. Anschließend wurde der radioaktive Zerfall pro Minute (*desintegrations per minute*, DPM) mittels der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie im *Beckmann LS 6000 IC* (Beckmann Coulter, Brea, USA) gemessen und in der Auswertung auf die entsprechende Proteinkonzentration der Probe bezogen.

2.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinfractionen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde angelehnt an die von Laemmli beschriebene Methode durchgeführt (Laemmli, 1970). Dabei wurden zunächst HCASMC, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, in 6-Loch-Platten ausgesät und stimuliert. Je nach Fragestellung wurde das Medium nach 5 min, 60 min oder 24 h abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen. Danach wurden je 100 µL Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 1) auf die Zellen gegeben.

Die Ablösung der Zellen von der Kulturschale wurde manuell mittels einer abgeknickten Pipettenspitze unterstützt, das Lysat in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße gegeben und bei -20 °C gelagert. Für die Elektrophorese wurden zweiphasige Gele in 1,5 mm Dicke, bestehend aus einem Sammelgel (obere Phase) und einem Trenngel (untere Phase), gegossen. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 6 zu entnehmen:

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

	Sammelgel	Trenngel	Hersteller
H ₂ O	3,25 mL	3,6 mL	
40 % Acrylamid	0,563 mL	1,875 mL	Carl Roth, Karlsruhe
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	1,875 mL	siehe Tabelle 1
1 M Tris (pH 6,8)	0,563 mL	-	siehe Tabelle 1
10 % SDS	45 µL	75,0 µL	Serva, Heidelberg
TEMED	5 µL	7,5 µL	Carl Roth, Karlsruhe
10 % APS	45 µL	75,0 µL	Carl Roth, Karlsruhe

Nach dem Einspannen der Gele in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und dem Befüllen der Kammer mit Laufpuffer (siehe Tabelle 1) wurden die Proben aufgetaut, für 10 min bei 95 °C erhitzt (*Thermomixer comfort*, Eppendorf, Hamburg) und in die Lauftaschen gefüllt.

Zur Verifizierung der Proteinauftrennung und zur Größenbestimmung der Proteine wurde in eine Lauftasche ein vorgefärbter Proteinmarker für Molekülgrößen von 10 - 170 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gefüllt.

Anschließend wurde eine Spannung von 80 V für die Laufzeit im Sammelgel angelegt. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 120 V heraufgesetzt.

Die Elektrophorese wurde beendet, bevor die gefärbte Lauffront das Gel vollständig durchlaufen hatte.

2.13 Western-Blotting

Das Übertragen der Proteine der PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde mittels eines *Semidry*-Verfahrens durchgeführt. Das Blotpapier (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und die Nitrozellulose-Membran wurden für mindestens 5 min in Blotpuffer (siehe Tabelle 1) äquiliert. Danach wurden zunächst drei Lagen des getränkten Blotpapiers auf die untere Leiterplatte der *Semidry*-Blotkammer (PeqLab, Erlangen) gelegt. Darauf wurde erst die Nitrozellulosemembran und dann das Polyacrylamid-Gel geschichtet. Nach Überdecken mit weiteren drei Lagen Blotpapier wurde der Deckel mit der oberen Leiterplatte aufgelegt und verschlossen. Bei einer Stromstärke von 1000 mA wurde der Blot-Vorgang für 1:15 h durchgeführt.

Nach dieser Zeit wurde die Nitrozellulose-Membran aus der Blotkammer entnommen und unspezifische Bindungsstellen wurden für 60 min unter leichtem Schwenken in TBS/T mit 5 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) blockiert (Burnette, 1981).

Mit Ausnahme des Erstantikörpers anti- β -Tubulin wurden die Membranen anschließend mit den in Tabelle 7 aufgeführten Erstantikörpern in TBS/T mit 5 % BSA über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert.

Tabelle 7: Western-Blot Erstantikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Wirt	Firma
anti β -Tubulin	1 : 10.000	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti p38	1 : 1.000	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
anti phospho-p38	1 : 1.000	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
anti p44/42	1 : 1.000	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
anti phospho-p44/42	1 : 1.000	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 5 min in TBS/T gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit β -Tubulin-Antikörpern in TBS/T und 5 % BSA unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS/T wurde die Membran mit zwei verschiedenfarbig fluoreszierenden Zweitantikörpern lichtgeschützt für 45 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Zweitantikörper waren ebenfalls in TBS/T mit 5 % BSA gelöst und sind in Tabelle 8 aufgeführt:

Tabelle 8: Western-Blot Zweitantikörper

Zweitantikörper	Verdünnung	Wirt	Firma
<i>Goat-anti-Rabbit</i> 800 nm	1 : 5.000	Ziege	LI-COR, Lincoln, USA
<i>Goat-anti-Mouse</i> 680 nm	1 : 5.000	Ziege	LI-COR, Lincoln, USA

Anschließend wurde die Membran ein letztes Mal drei Waschgängen für je 5 min in TBS/T unterzogen.

Für die Datenerhebung wurde sie schließlich mit dem *Odyssey* Infrarot-Scanner (LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA) digitalisiert und mittels der Herstellersoftware (Version 3.0.30) ausgewertet.

2.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden sämtliche Daten auf die entsprechende Kontrolle normiert. Eventuelle Ausreißer wurden anhand *Dixon's Q-Test* identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen (Rorabacher, 1991). Für die statistische Testung wurde *GraphPad Prism* (Version 6.02) (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Bei zwei Datensätzen, bestehend aus Kontrolle und Stimulation, wurde der *Mann-Whitney-Test* zur

Prüfung auf Signifikanz verwendet. Bei mehreren Datensätzen, zum Beispiel bei unterschiedlichen Konzentrationen in der Stimulation, wurde mit dem *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's multiple comparisons test* geprüft. Bei berechneten p-Werten $< 0,05$ wurde der Unterschied als statistisch signifikant erachtet. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde ebenfalls *GraphPad Prism* verwendet. Dabei sind sowohl in den Grafiken als auch im Fließtext die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardfehler (*Standard Error of the Mean*, SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Mikroskopie von glatten Gefäßmuskelzellen

Um einen Eindruck von der Größe und Morphologie des untersuchten Zelltyps zu erhalten, wurden HCASMC auf einer 6-Loch-Platte ausgesät und 24 h später unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Die Zellen wuchsen adhärent am Boden von Kulturflaschen und Kulturplatten. In Abb. 7 sind die Zellen zu sehen, bevor sie mit PBS gewaschen und durch Serumentzug synchronisiert wurden.

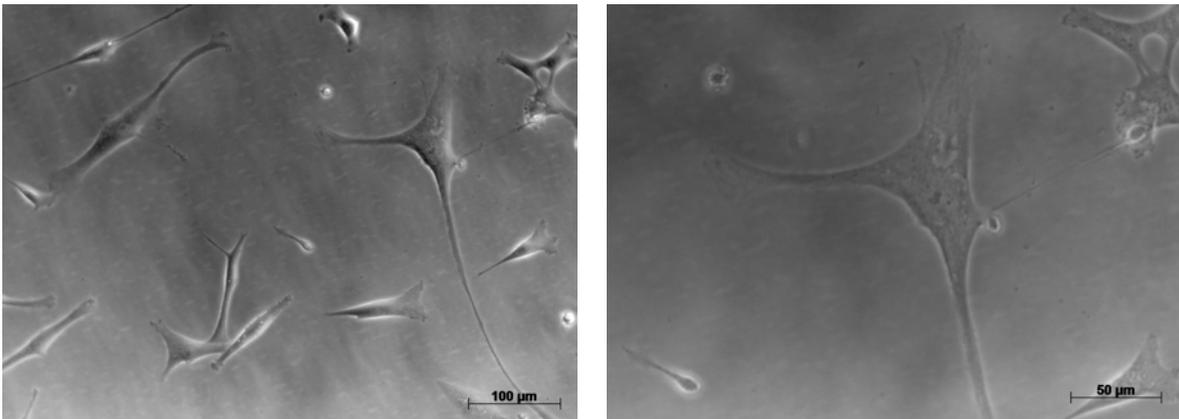


Abb. 7: Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HCASMC

Zur orientierenden Darstellung der zellulären und perizellulären HA wurden HCASMC auf Deckgläser in 12-Loch-Platten ausgesät und nach 24 h Serumentzug für 24 h mit 10 ng/mL PDGF-BB stimuliert. Anschließend wurden sie gemäß der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Methodik gefärbt. Bei der hier durchgeführten Färbung ließen sich strangförmige HA-Strukturen erkennen (Abb. 8).

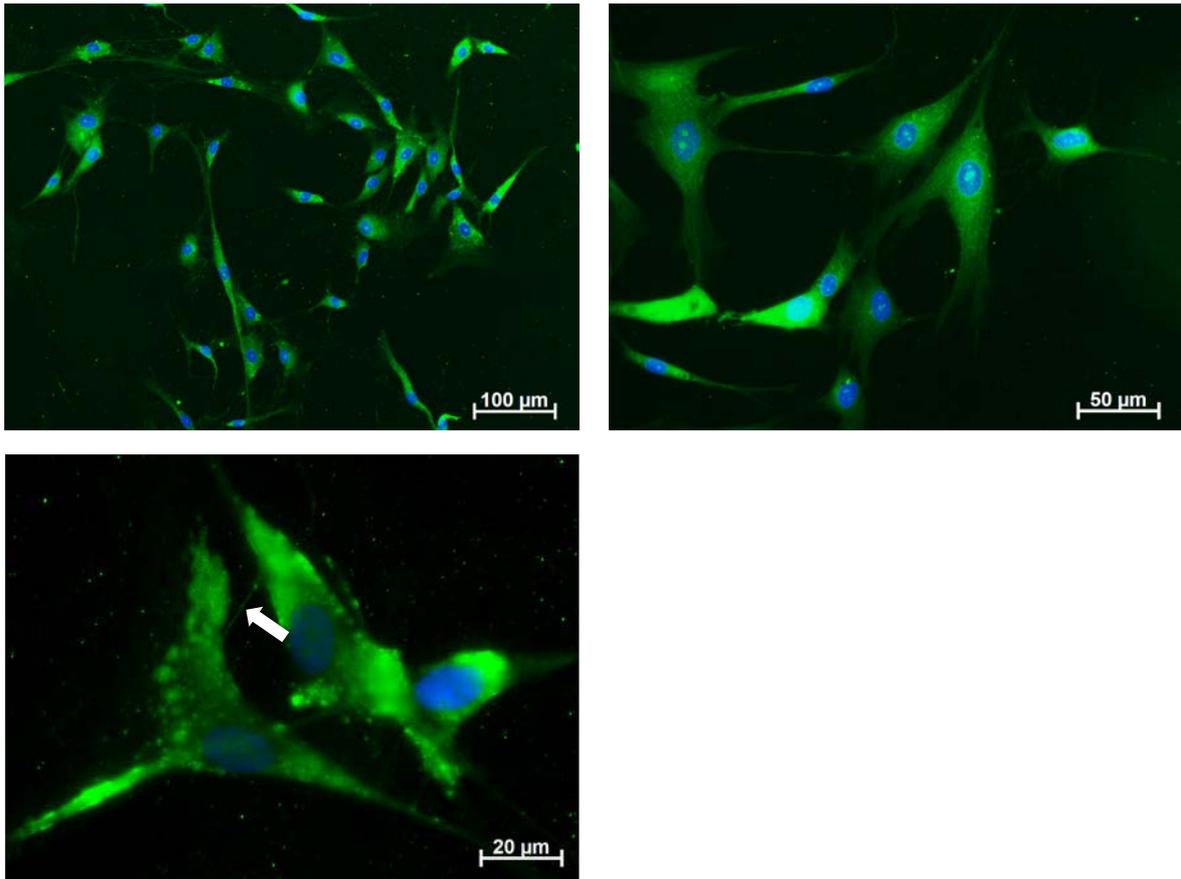


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopie von HCASMC nach Stimulation mit PDGF-BB. Strangförmige HA-Struktur mit Pfeil markiert

3.2 Effekte von MPA

3.2.1 Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems

3.2.1.1 Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach Stimulation mit MPA

Die von HCASMC in das Medium sezernierte HA-Menge wurde durch Messungen der Konzentration im Medium nach 24 h Stimulation evaluiert. Dabei führte MPA zu einer Reduktion der HA-Konzentration im Medium [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM MPA: 69,1 % \pm 3,8 %, 10 μ M MPA: 47,3 % \pm 6,6 %, n=7-8, *, p < 0,05] (Abb. 9 A). Auch bei gleichzeitiger Stimulation mit PDGF-BB, welches die HA-Synthese von glatten Muskelzellen stimuliert (siehe Abschnitt 1.4), wurde eine Verminderung der HA-Konzentration im Kulturmedium beobachtet [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM MPA: 66,3 % \pm 3,6 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M MPA: 49,1 % \pm 3,9 %, n=8, *, p < 0,05] (Abb. 9 B).

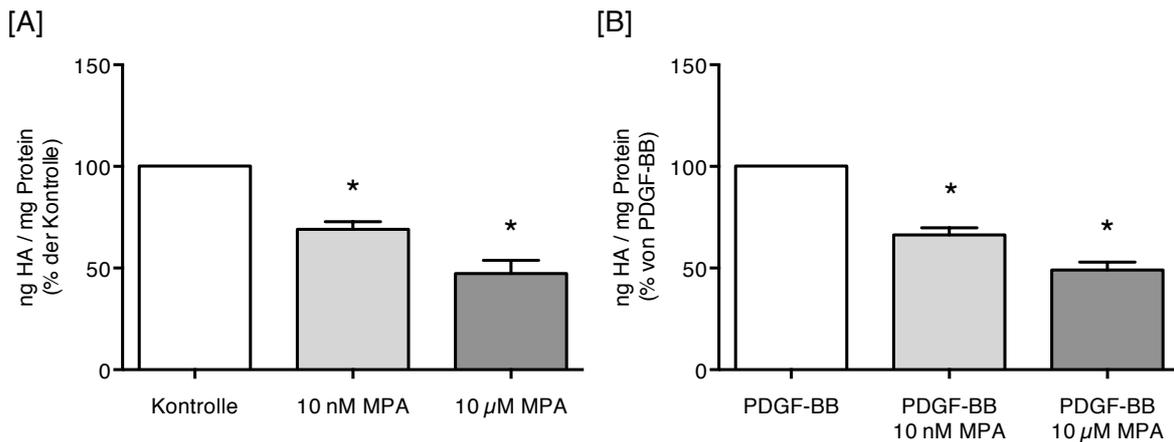


Abb. 9: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach MPA-Stimulation. [A] Hyaluronsäurekonzentration nach 24 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA im Vergleich mit der Kontrolle (n=7-8, *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] Hyaluronsäurekonzentration nach 24 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA und 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=8; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.2.1.2 Einfluss von MPA auf die Genexpression von HAS2 und HAS3

Zur Evaluation, ob die signifikante Verminderung der HA-Konzentration im Medium nach MPA-Stimulation (siehe Abschnitt 3.2.1.1) mit einer verminderten Genexpression der HAS einhergeht, wurde die mRNA-Expression der drei Isoformen HAS1, HAS2 und HAS3 mittels qPCR analysiert. Bei ersten Analysen erfüllten die Expressiondaten der HAS1, im Gegensatz zu denen der HAS2 und HAS3, die gewählten Einschlusskriterien (siehe Abschnitt 2.9) überwiegend nicht, so dass eine Aussage zu möglichen Änderungen in der mRNA-Expression der HAS1 nicht getroffen werden kann.

Bei der Analyse der HAS2-mRNA kam es nach alleiniger Stimulation mit MPA zu einer signifikanten Hemmung der Expression durch beide verwendeten Konzentrationen [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM MPA: 67,7 % ± 6,1 %, 10 μM MPA : 63,9 % ± 7,7 %, n=9, *, p < 0,05]. Die simultane Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB zeigte für die geringere MPA-Konzentration von 10 nM lediglich einen Trend zur Verminderung der HAS2-mRNA-Expression. Bei der höheren MPA-Konzentration von 10 μM war dieser hemmende Effekt signifikant [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM MPA: 79,6 % ± 10,7 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μM MPA: 65,3 % ± 3,7 %, n=8-9, *, p < 0,05] (Abb. 10).

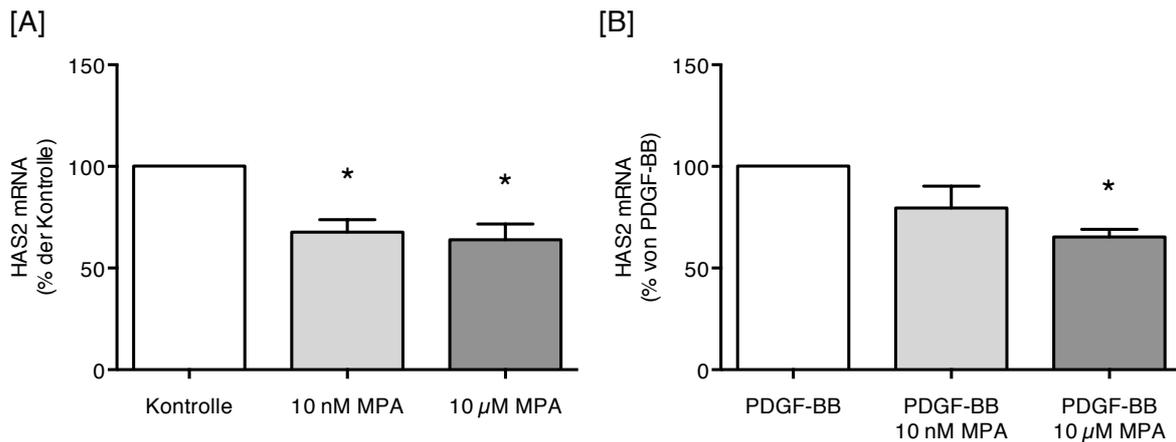


Abb. 10: HAS2-mRNA-Expression nach MPA-Stimulation. [A] HAS2-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA im Vergleich zur Kontrolle (n=9; *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] HAS2-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA in Kombination mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB (n=8-9; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

Auch die mRNA-Expression der HAS3 wurde durch Stimulation mit MPA signifikant gehemmt. Der Effekt trat sowohl bei alleiniger Stimulation mit MPA [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM MPA: 69,0 % ± 5,6 %, 10 μM MPA: 39,1 % ± 3,0 %, n=9, *, p < 0,05], als auch bei gleichzeitiger Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM MPA: 76,1 % ± 4,0 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μM MPA: 54,4 % ± 4,8 %, n=8-9, *, p < 0,05] auf. Analog zu den Messungen der HA-Konzentration im Medium (siehe Abschnitt 3.2.1.1) war die Hemmung der mRNA-Expression dabei umso stärker ausgeprägt, je höher die verwendete MPA-Konzentration war (Abb. 11).

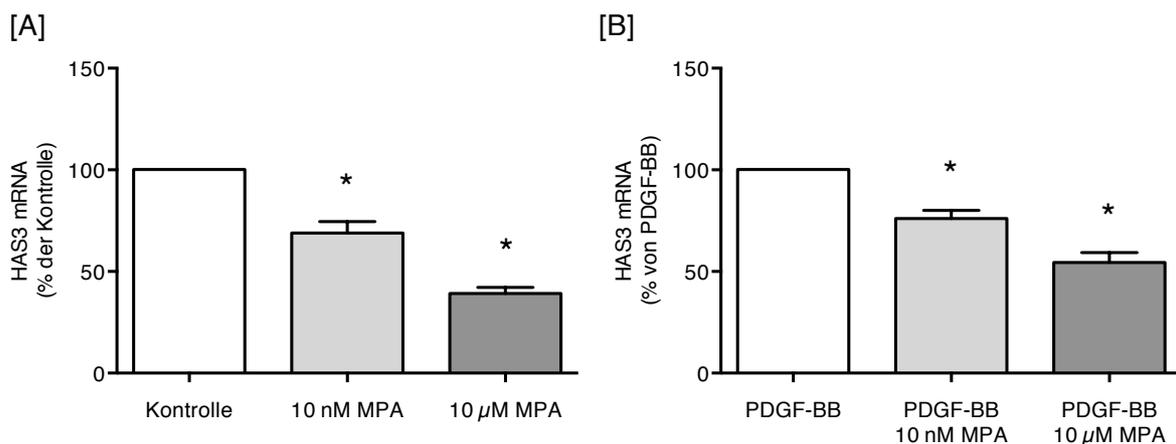


Abb. 11: HAS3-mRNA-Expression nach MPA-Stimulation. [A] HAS3-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA im Vergleich zur Kontrolle (n=9, *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] HAS3-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μM MPA in Kombination mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB (n=8-9, *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.2.2 Funktionelle Effekte

3.2.2.1 Zellproliferation nach Stimulation mit MPA

Um eine mögliche funktionelle Bedeutung der reduzierten HAS2- und HAS3-mRNA-Expression sowie der verminderten HA-Sekretion nach Stimulation mit MPA zu untersuchen, wurde die [³H]-Thymidin-Inkorporation von HCASMC bestimmt.

Die Beeinflussung der DNA-Synthese als Maß für die Proliferation wurde sowohl unter alleiniger Verwendung von MPA als auch bei gleichzeitiger Stimulation mit PDGF-BB evaluiert. Die alleinige Stimulation mit MPA hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die [³H]-Thymidin-Inkorporation [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM MPA: 122,5 % ± 11,2 %, 10 μM MPA: 102,4 % ± 8,8 %, n=12]. Auch gleichzeitige Stimulation mit PDGF-BB und MPA zeigte keinen signifikanten Effekt auf die proliferative Aktivität von HCASMC [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM MPA: 119,1 % ± 6,6 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μM MPA: 86,3 % ± 6,7 %, n=12]. Die Ergebnisse der Messungen der [³H]-Thymidin-Inkorporation sind in Abb. 12 dargestellt.

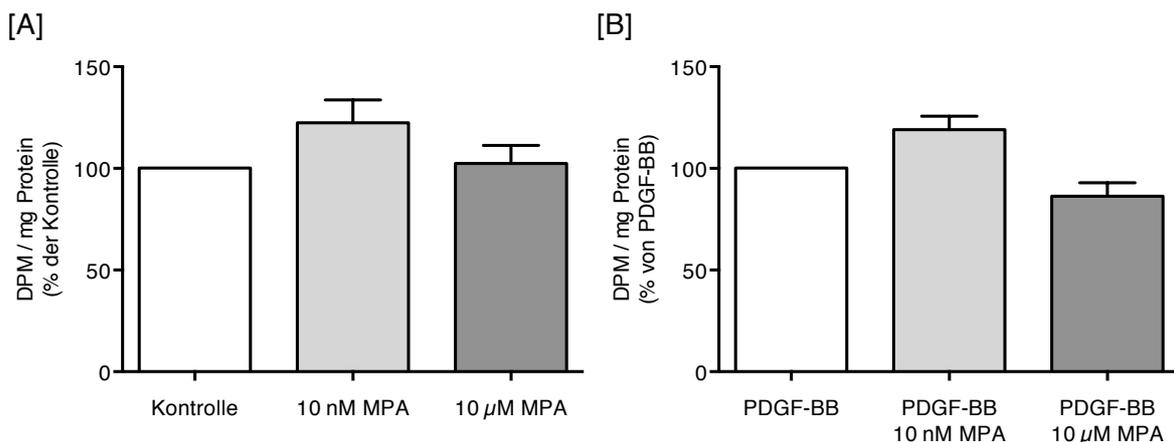


Abb. 12: Zellproliferation nach MPA-Stimulation. [A] Inkorporation von [³H]-Thymidin in HCASMC nach Stimulation mit 10 nM und 10 μM MPA im Vergleich zur Kontrolle (n=12). [B] Inkorporation von [³H]-Thymidin in HCASMC nach Stimulation mit 10 nM und 10 μM MPA zusammen mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB (n=12).

3.2.2.2 Zellmigration nach Stimulation mit MPA

Im Rahmen der durchgeführten [³H]-Thymidin-Inkorporationsversuche zeigte sich weder für die Stimulation mit MPA noch für die Kostimulation mit MPA und PDGF-BB ein signifikanter Effekt. Ergänzend zu den durchgeführten Proliferationsversuchen wurde die Migration von HCASMC nach Stimulation mit MPA mittels Chemotaxiskammer untersucht. Es wurden dabei unterschiedliche experimentelle Bedingungen evaluiert. Zum einen

wurde MPA direkt zu den Zellen in der oberen Kammer gegeben und ihr Migrationsverhalten gegen PDGF-BB in der unteren Kammer mit dem der Kontrolle verglichen. Dabei konnte für eine Stimulationsdauer von 6 h kein Effekt gemessen werden [Kontrolle: 100 % vs. 10 μ M MPA: 95,3 % \pm 3,5 %, n=5] (Abb. 13 A). Zum anderen wurde das Migrationsverhalten von HCASMC in serumfreiem Medium gegen MPA und PDGF-BB in der unteren Kammer mit dem Migrationsverhalten gegen PDGF-BB alleine verglichen. Bei 24 h Versuchsdauer bestand unter diesen Bedingungen ebenfalls kein Effekt [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M MPA: 96,4 % \pm 11,0 %, n=4] (Abb. 13 B).

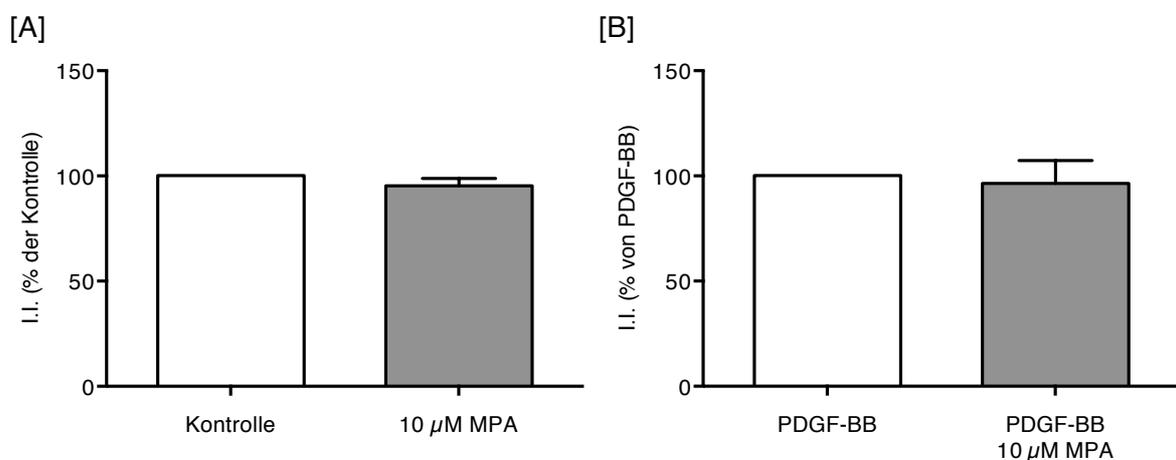


Abb. 13: Zellmigration nach MPA-Stimulation. [A] Stimulation für 6 h; MPA 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle; Stimulus in oberer Kammer (n=5). [B] Stimulation für 24 h; 10 μ M MPA + 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zu 10 ng/mL PDGF-BB alleine; Stimuli in unterer Kammer (n=4).

3.2.3 Signaltransduktion

3.2.3.1 Einfluss von MPA auf die p38 MAPK

Stimulation mit MPA führte zu einer Verminderung der HAS2- und HAS3-mRNA-Expression. Dieser Effekt trat bei alleiniger Verwendung des Gestagens und bei Kostimulation mit PDGF-BB auf (Abb. 10 und Abb. 11). Dabei kam es zu einer Verminderung der HA-Sekretion in das Kulturmedium (Abb. 9). Im Folgenden wurde für MPA ein möglicher involvierter Signaltransduktionsweg untersucht.

Wie eingangs beschrieben, ist von der p38 MAPK bekannt, dass sie in die Regulation der mRNA-Expression der HAS involviert sein kann (Rauhala *et al.*, 2013; Röck *et al.*, 2011). Weiterhin führt MPA in Interleukin-1 β -stimulierten Fibroblasten zu einer verminderten

Phosphorylierung der p38 MAPK (Zhou *et al.*, 2012). Es war somit von Interesse, ob die p38 MAPK in die Hemmung der HA-Sekretion durch MPA involviert sein könnte.

Bei Evaluation mittels der PAGE und des *Western-Blottings* zeigte sich, dass die Stimulation von HCASMC mit 10 nM MPA zu einer signifikanten Hemmung der Phosphorylierung p38 MAPK führte [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM MPA: 67,5 % ± 5,3 %, n=5, *, p < 0,05]. Unter Verwendung von 10 µM MPA bestand hingegen ein Trend zu einer Hemmung, jedoch kein signifikanter Effekt [Kontrolle: 100 % vs. 10 µM MPA: 78,3 % ± 7,6 %, n=5] (Abb. 14 A).

Auch die Kostimulation mit PDGF-BB und MPA führte zu einer Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung bei der niedrigeren verwendeten MPA-Konzentration im Vergleich zu PDGF-BB alleine. Auch hier konnte für die höhere verwendete MPA-Konzentration der Trend zu einer Verminderung beobachtet werden [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM MPA: 67,1 % ± 7,6 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 µM MPA: 84,5 % ± 19,0 %, n=5, *, p < 0,05] (Abb. 14 B).

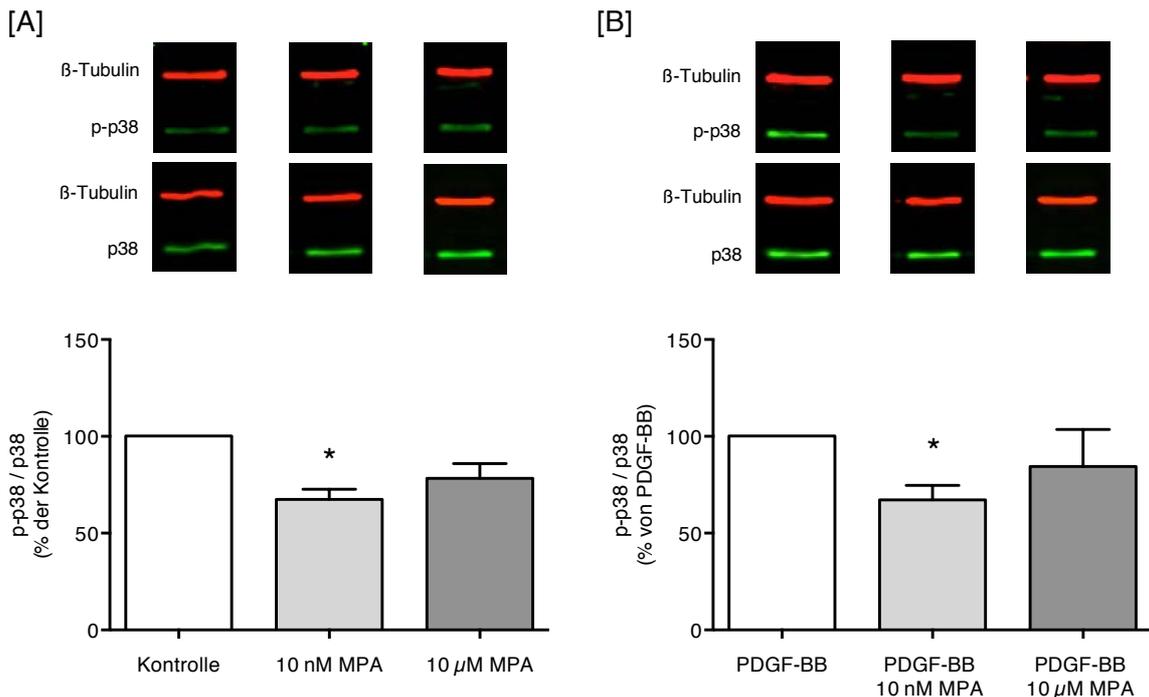


Abb. 14: Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit MPA. [A] Anteil von phosphorylierter p38 MAPK an gesamter p38 MAPK (p-p38/p38) nach Stimulation von HCASMC für 60 min mit 10 nM oder 10 µM MPA (n=5, *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] Anteil von phosphorylierter p38 MAPK an gesamter p38 MAPK (p-p38/p38) nach Stimulation von HCASMC für 60 min mit 10 nM oder 10 µM MPA und gleichzeitiger Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=5, *, p < 0,05 vs. PDGF-BB). Verwendung von β-Tubulin als endogene Kontrolle.

3.3 Effekte von NET-A

3.3.1 Beeinflussung des Hyaluronsäuresystems

3.3.1.1 Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach Stimulation mit NET-A

Nach der Evaluation von MPA sollte mit NET-A ein weiteres Gestagen untersucht werden welches, wie bereits in Abschnitt 1.3.1.2 beschrieben, ein von MPA abweichendes Rezeptor-Bindungsprofil aufweist. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei der Reduktion der mRNA-Expression von HAS2 und HAS3 und der damit verbundenen Verminderung der HA-Menge durch MPA um einen substanzspezifischen Effekt handelt, oder ob dieser auch durch weitere synthetische Gestagene hervorgerufen wird, wurden die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Experimente auch mit NET-A durchgeführt.

Auch bei der Verwendung von NET-A wurde die HA-Sekretion von HCASMC signifikant gehemmt. Wie schon bei der Stimulation mit MPA war der beobachtete Effekt konzentrationsabhängig (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Analog zu den Ergebnissen der Stimulation mit MPA trat der Effekt sowohl bei alleiniger Stimulation mit NET-A [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM NET-A: 66,8 % \pm 8,0 %, 10 μ M NET-A: 54,3 % \pm 4,5 %, n=8, *, p < 0,05], als auch bei Kostimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM NET-A: 73,5 % \pm 3,0 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 64,1 % \pm 4,1 %, n=8, *, p < 0,05] auf (Abb. 15).

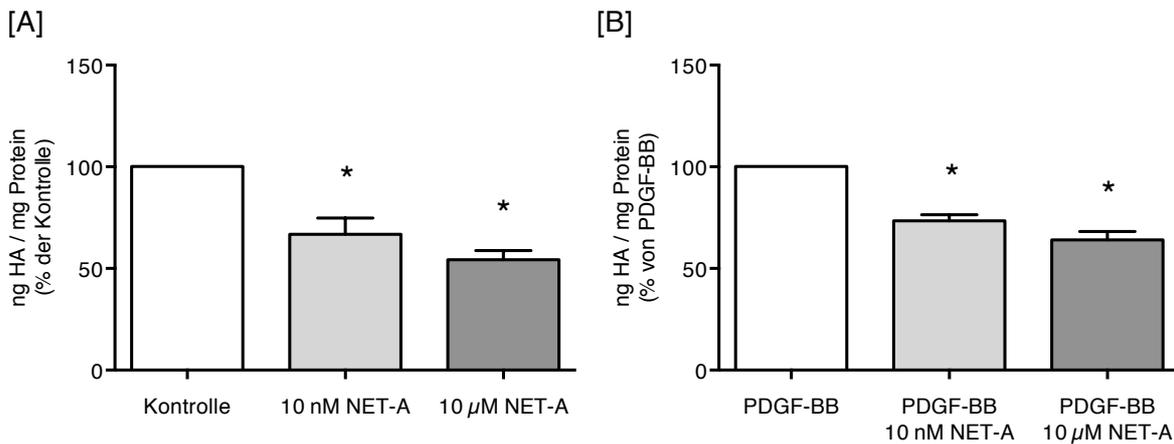


Abb. 15: Hyaluronsäurekonzentration des Mediums nach NET-A-Stimulation. [A] Hyaluronsäurekonzentration nach 24 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A im Vergleich mit der Kontrolle (n=8; *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] Hyaluronsäurekonzentration nach 24 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=8; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.3.1.2 Einfluss von NET-A auf die Genexpression von HAS2 und HAS3

NET-A führt wie schon MPA zu einer Verminderung der HA-Konzentration im Medium (siehe Abschnitt 3.2.1.1 und 3.3.1.1). Bei der Stimulation mit MPA ging dieser Effekt mit einer Reduktion der mRNA-Expression von HAS2 und HAS3 einher (siehe Abschnitt 3.2.1.2).

Auch bei alleiniger Stimulation mit NET-A zeigte sich nach 6 h eine signifikante Reduktion der HAS2-mRNA-Expression, wenngleich dieser Effekt nur bei einer Konzentration von 10 μ M auftrat [Kontrolle: 100 % vs. 10 μ M NET-A: 82,2 % \pm 8,9 %, n=9, *, p < 0,05]. Bei einer Konzentration von 10 nM ist, wie in Abb. 16 A zu sehen, lediglich ein geringer Trend zu einer Verminderung zu erkennen [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM NET-A: 90,4 % \pm 4,4 %, n=9].

Die gleichzeitige Stimulation mit NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB führte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB zu einer signifikanten Hemmung der HAS2-mRNA-Expression. Dieser Effekt ist mit zunehmender Konzentration stärker ausgeprägt [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM NET-A: 79,1 % \pm 6,5 %, 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 70,7 % \pm 3,3 %, n=8-9, *, p < 0,05] (Abb. 16 B).

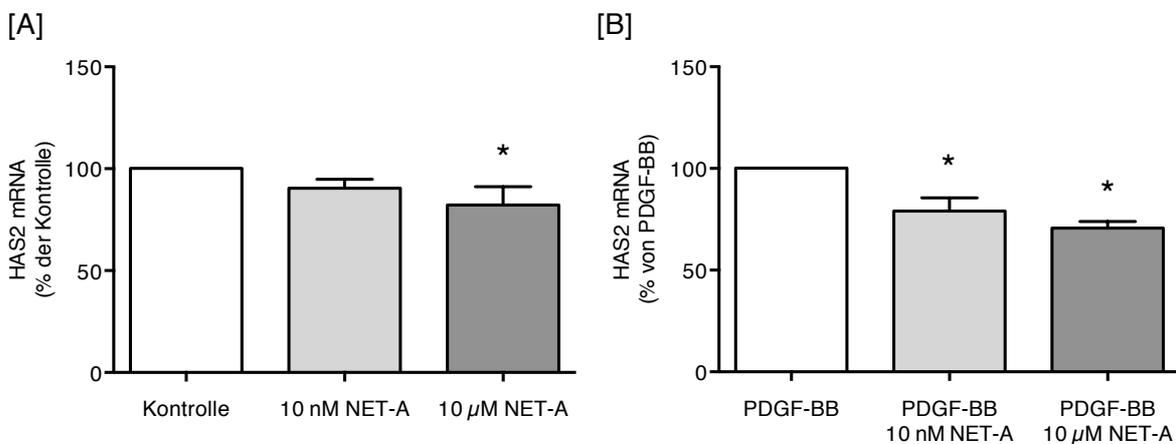


Abb. 16: HAS2-mRNA-Expression nach NET-A-Stimulation. [A] HAS2-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A im Vergleich zur Kontrolle (n=9; *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] HAS2-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A in Kombination mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB (n=8-9, *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

Auch die mRNA-Expression der HAS3 wurde nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 μ M NET-A, wie in Abb. 17 A dargestellt, signifikant reduziert [Kontrolle: 100 % vs. 10 μ M NET-A: 80,4 % \pm 6,3 %, n=9, *, p < 0,05]. Bei der Stimulation mit 10 nM NET-A

zeigte sich lediglich ein Trend zur Reduktion der HAS3-mRNA-Expression [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM NET-A: 89,8 % \pm 4,1 %; n=9].

Im Gegensatz dazu war, wie in Abb. 17 B dargestellt, bei gleichzeitiger Stimulation mit PDGF-BB, die Hemmung der HAS3-mRNA-Expression lediglich bei der verwendeten niedrigen NET-A-Konzentration signifikant vermindert [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM NET-A: 85,9 % \pm 4,8 %, n=9, *, p < 0,05]. Bei der höheren NET-A-Konzentration konnte kein Effekt nachgewiesen werden [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 93,2 % \pm 2,7 %, n=8].

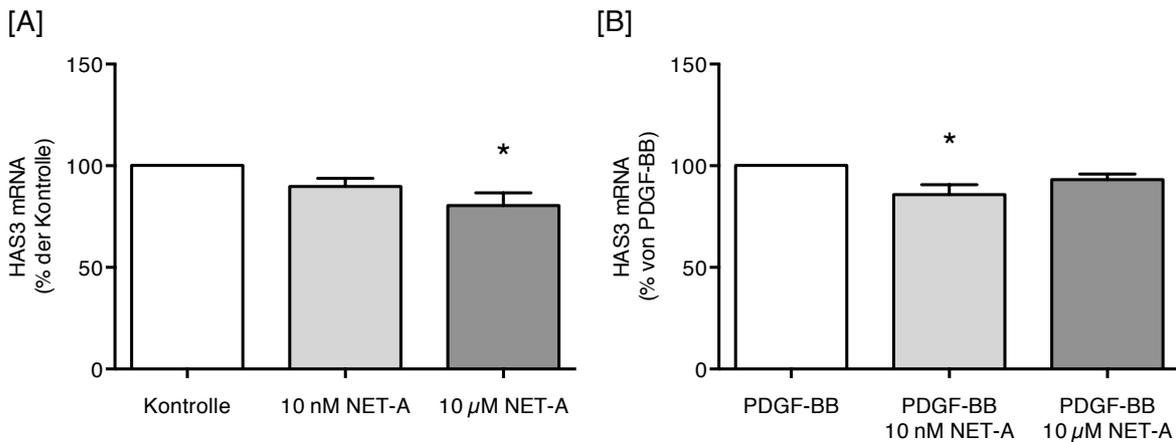


Abb. 17: HAS3-mRNA-Expression nach NET-A-Stimulation. [A] HAS3-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A im Vergleich zur Kontrolle (n=9, *, p < 0,05 vs. Kontrolle). [B] HAS3-mRNA-Expression nach 6 h Stimulation von HCASMC mit 10 nM oder 10 μ M NET-A in Kombination mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB (n=8-9, *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.3.2 Funktionelle Effekte

3.3.2.1 Zellproliferation nach Stimulation mit NET-A

Wie MPA führte auch NET-A zu einer Hemmung der mRNA-Expression der HAS2 und HAS3 (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 16 und Abb. 17) und zu einer Verminderung der HA-Konzentration im Medium (Abb. 9 und Abb. 15). Die Stimulation mit MPA führte trotz der genannten Effekte nicht zu einer Veränderung der Migration oder Proliferation von HCASMC (Abb. 12 und Abb. 13). Um zu untersuchen, ob NET-A anders als MPA einen Einfluss auf die Proliferation von HCASMC hat, wurde auch für NET-A die Beeinflussung der Aufnahme von [³H]-Thymidin gemessen. Die Stimulation mit NET-A alleine führte dabei zu keiner Veränderung der [³H]-Thymidin-Inkorporation im Vergleich mit der Kontrolle [Kontrolle: 100 % vs. 10 nM NET-A: 111,3 % \pm 6,3 %, 10 μ M NET-A: 84,0 % \pm

10,9 %, n=7-8]. Während auch nach Stimulation mit 10 nM NET-A in Kombination mit PDGF-BB kein Effekt auf die proliferative Aktivität bestand [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 nM NET-A: 96,7 % ± 5,0 %, n=8], war die [³H]-Thymidin-Inkorporation nach Stimulation mit 10 μM NET-A in Kombination mit 10 ng/ml PDGF-BB im Vergleich zu PDGF-BB alleine signifikant reduziert [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μM NET-A: 39,2 % ± 5,5 %, n=8, *, p < 0,05]. Die Daten der [³H]-Thymidin-Inkorporationsversuche sind in Abb. 18 grafisch dargestellt.

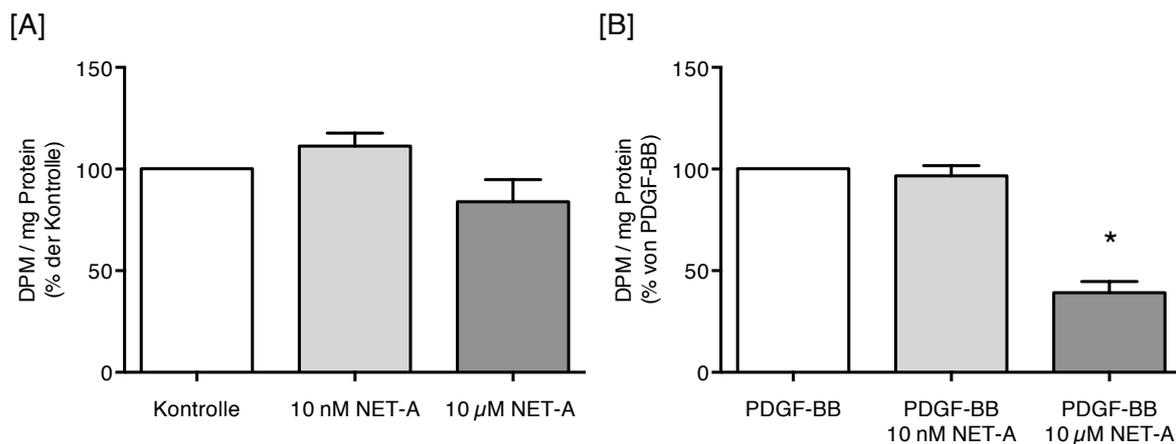


Abb. 18: Zellproliferation nach NET-A-Stimulation. [A] Inkorporation von [³H]-Thymidin in HCASMC nach Stimulation mit 10 nM und 10 μM NET-A im Vergleich zur Kontrolle (n=7-8). [B] Inkorporation von [³H]-Thymidin in HCASMC nach Stimulation mit 10 nM und 10 μM NET-A in Kombination mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=8; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Reduktion der Proliferation durch die Kombination von 10 μM NET-A und PDGF-BB nicht um einen zytotoxischen Effekt handelte, wurden die Zellen für alle in diesem Versuch aufgeführten Bedingungen lichtmikroskopisch kontrolliert. Es zeigte sich dabei keine augenscheinliche Veränderung der Kultur (Abb. 19).

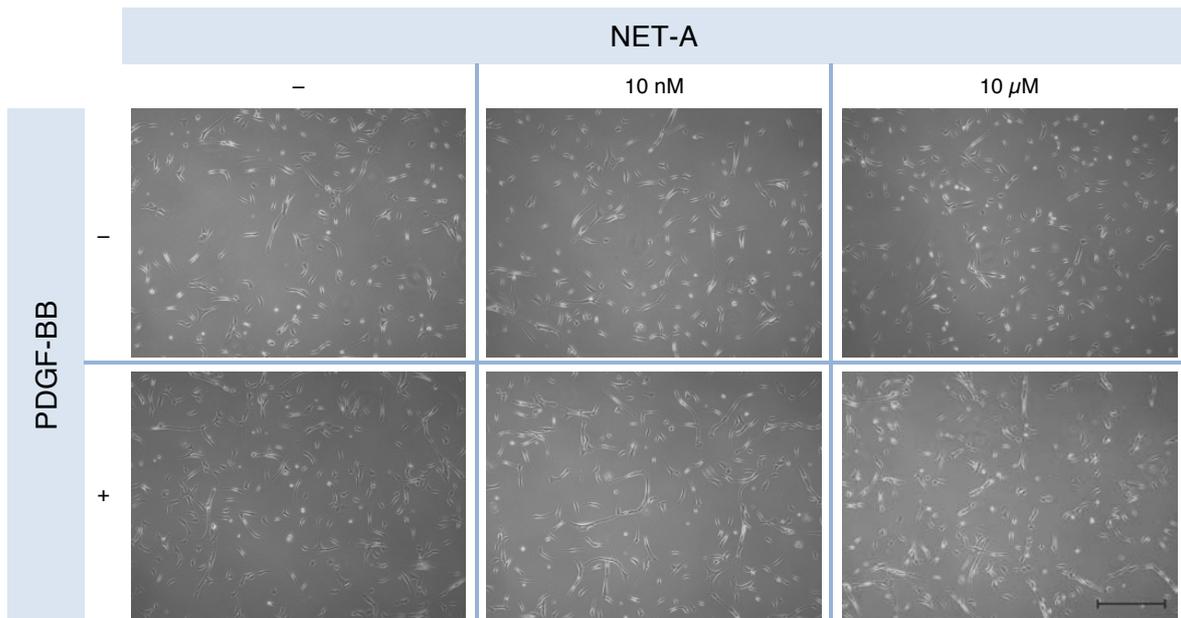


Abb. 19: Durchlichtmikroskopie nach Stimulation von HCASMC mit NET-A 10 nM und 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) gleichzeitiger Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (Maßstabsleiste: 500 μ m)

3.3.2.2 Zellproliferation nach Stimulation mit PG

In den zuvor durchgeführten Versuchen zeigte sich bei simultaner Stimulation mit PDGF-BB und NET-A in der Konzentration 10 μ M eine Hemmung der [3 H]-Thymidin-Inkorporation von HCASMC (Abb. 18 B). Da NET-A agonistisch am Progesteronrezeptor wirkt, wurde dieses Experiment ergänzend unter der Verwendung von PG durchgeführt, auch wenn andere Autoren zuvor keinen Effekt der Kostimulation mit PDGF-BB und PG auf die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen zeigen konnten (Suzuki *et al.*, 1996; Stanczyk *et al.*, 2013).

Dabei resultierte die Stimulation von HCASMC mit PDGF-BB und 10 μ M PG in einer signifikanten Reduktion der [3 H]-Thymidin-Inkorporation [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M PG: 11,0 % \pm 2,7 %, n=4, *, p < 0,05]. Der Effekt der Stimulation mit PG und PDGF-BB auf die [3 H]-Thymidin-Inkorporation von HCASMC ist in Abb. 20 dargestellt.

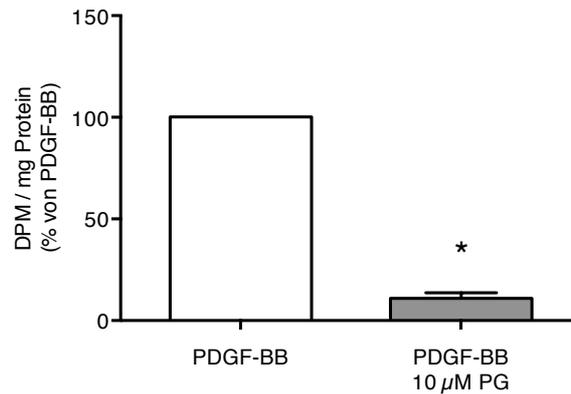


Abb. 20: Zellproliferation nach PG-Stimulation. Inkorporation von [³H]-Thymidin in HCASMC nach Stimulation mit 10 µM PG zusammen mit 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=4; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.3.2.3 Zellmigration nach Stimulation mit NET-A

Unter Verwendung von MPA kam es nicht zu einer Änderung der Proliferation und Migration von HCASMC (Abb. 12 und Abb. 13). Da Stimulation mit 10 µM NET-A und PDGF-BB jedoch zu einer Hemmung der [³H]-Thymidin-Inkorporation führte, wurde im Folgenden auch für NET-A ein möglicher Effekt auf die Migration von HCASMC untersucht. Zu diesem Zweck wurden, analog zu den Migrationsversuchen mit MPA (siehe Abschnitt 3.2.2.2), zwei unterschiedliche experimentelle Bedingungen analysiert.

Zunächst wurde das Migrationsverhalten von HCASMC in Richtung PDGF-BB in der Unterkammer evaluiert. Es wurden Zellen, zu denen NET-A in die Oberkammer gegeben wurde, mit Zellen unter Kontrollbedingungen verglichen. Dabei zeigte sich nach 6 h kein Unterschied im Vergleich von NET-A und Kontrolle [Kontrolle: 100 % vs. 10 µM NET-A: 99,3 % ± 1,7 %, n=4] (Abb. 21 A).

Anschließend wurde das Migrationsverhalten von HCASMC unter serumfreien Bedingungen in der Oberkammer entgegen PDGF-BB und NET-A in der Unterkammer untersucht. Dabei wurde die Migration über 24 h im Vergleich zu PDGF-BB alleine signifikant gehemmt [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 µM NET-A: 84,8 % ± 1,3 %, n=4, *, p < 0,05] (Abb. 21 B).

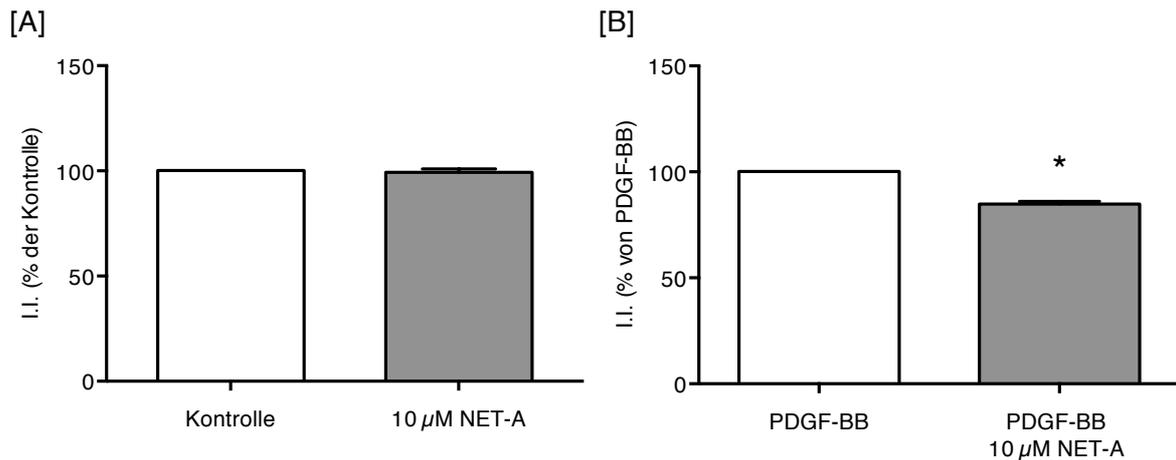


Abb. 21: Zellmigration nach NET-A-Stimulation. [A] Stimulation für 6 h: 10 µM NET-A im Vergleich zur Kontrolle; Stimulus in der oberen Kammer (n=4). [B] Stimulation für 24 h: 10 µM NET-A + 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zu 10 ng/mL PDGF-BB; Stimuli in unterer Kammer (n=4, *, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

3.3.3 Signaltransduktion

3.3.3.1 Einfluss von NET-A auf die p38 MAPK

Aus den bis hier aufgeführten Ergebnissen ist zu ersehen, dass sowohl MPA als auch NET-A die HA-Konzentration im Kulturmedium und die mRNA-Expression der HAS2 und HAS3 vermindern. Im Gegensatz zur gleichzeitigen Stimulation mit PDGF-BB und MPA werden durch gleichzeitige Stimulation mit PDGF-BB und NET-A in hoher Konzentration Proliferation und Migration als funktionelle Parameter gehemmt (Abb. 12 B, Abb. 13 B, Abb. 18 B und Abb. 21 B). Es wurden daher potenziell in diese Effekte involvierte Proteinkinasen untersucht. Effekte von NET-A auf die Migration und die Proliferation von HCASMC traten zuvor bei Kostimulation mit 10 µM NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB auf. Wie schon für die MPA-Stimulation (siehe Abschnitt 3.2.3.1) wurde daher auch für diese Kombination der Effekt auf die Phosphorylierung der p38 MAPK evaluiert. Die Stimulation führte nicht zu einer Veränderung der Phosphorylierung der p38 MAPK zum untersuchten Zeitpunkt [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 µM NET-A: 98,0 % ± 16,3 %, n=6] (Abb. 22).

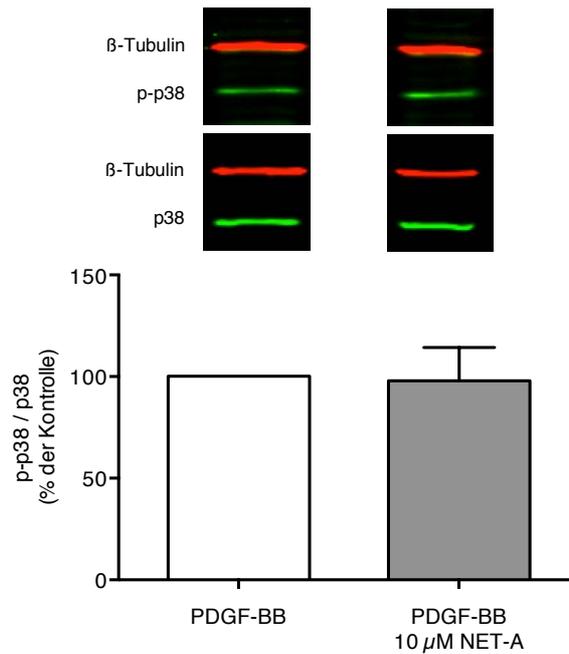


Abb. 22: Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit NET-A. Anteil von phosphorylierter p38 MAPK an gesamter p38 MAPK (p-p38/p38) nach Stimulation von HCASMC für 60 min mit 10 μ M NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB (n=6). Verwendung von β -Tubulin als endogene Kontrolle.

3.3.3.2 Einfluss von NET-A auf die p44/42 MAPK

Als weitere mögliche involvierte Proteinkinase wurde die p44/42 MAPK untersucht. Die Phosphorylierung von ERK wurde 5 min, 60 min und 24 h nach Stimulation mit 10 μ M NET-A und PDGF-BB analysiert.

Wie in Abb. 23 A dargestellt, kam es nach 5 min Kostimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB und 10 μ M NET-A zu einer signifikanten Hemmung der Phosphorylierung von ERK [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 87,7 % \pm 7,2 %, n=7, *, p < 0,05]. Im Gegensatz dazu zeigte sich weder nach 60 min [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 106,1% \pm 23,1 %, n=4] noch nach 24 h [10 ng/mL PDGF-BB: 100 % vs. 10 ng/mL PDGF-BB + 10 μ M NET-A: 82,6 % \pm 13,5 %, n=6] ein Effekt auf die ERK-Phosphorylierung (Abb. 23 B bzw. Abb. 23 C).

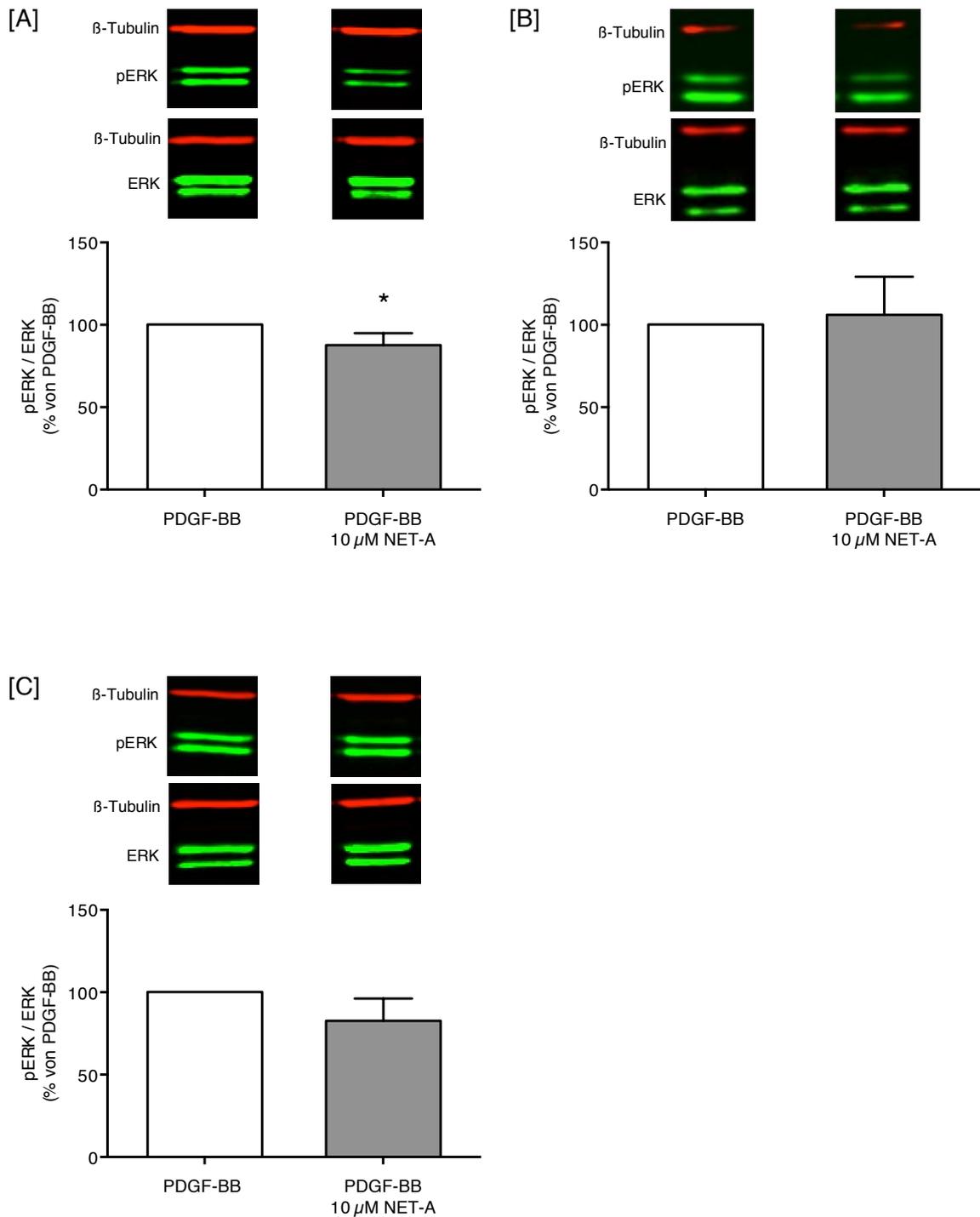


Abb. 23: Phosphorylierung von p44/42 MAPK nach Stimulation mit NET-A. [A] Anteil phosphorylierter p44/42 MAPK an gesamter p44/42 MAPK (pERK/ERK) 5 min nach Stimulation von HCASMC mit 10 μM NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB (n=7; *, p < 0,05 vs. PDGF-BB). [B] Anteil phosphorylierter p44/42 MAPK an gesamter p44/42 MAPK (pERK/ERK) 60 min nach Stimulation von HCASMC mit 10 μM NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB (n=4). [C] Anteil phosphorylierter ERK an gesamter ERK (pERK/ERK) 24 h nach Stimulation von HCASMC mit 10 μM NET-A und 10 ng/mL PDGF-BB (n=6). Verwendung von β-Tubulin als endogene Kontrolle.

4 Diskussion

Die bei einer HT verwendeten Gestagene besitzen unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften und verursachen unterschiedliche Nebenwirkungen, obwohl einige Risiken von Gestagenen Klasseneffekten zugeschrieben werden (Sitruk-Ware, 2000).

Im Rahmen der durchgeführten Experimente war es somit von besonderem Interesse, ob die Effekte auf HCASMC in Abhängigkeit des verwendeten Gestagens unterschiedlich ausfallen. Aus diesem Grunde wurden für die Versuche neben PG zwei synthetische Gestagene ausgewählt, welche zum einen bei großen klinischen Studien Verwendung fanden und zum anderen unterschiedliche Wirkprofile aufweisen (Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002; Schierbeck *et al.*, 2012; Stanczyk *et al.*, 2013).

4.1 Hemmung der Hyaluronsäuresynthese

In den durchgeführten Messungen wurde die HA-Konzentration im Medium von HCASMC sowohl durch MPA als auch durch NET-A gehemmt. Der Effekt trat bei alleiniger Stimulation mit den Gestagenen ebenso auf wie bei Kostimulation mit PDGF-BB (Abb. 9 und Abb. 15).

Eine Quantifizierung der HAS-mRNA-Expression zeigte, dass die Stimulation von HCASMC sowohl bei der Verwendung von MPA als auch von NET-A zu einer Hemmung der mRNA-Expression von HAS2 und HAS3 führte (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 16 und Abb. 17). Dieser Effekt stellte sich konzentrationsabhängig dar und war bei den Versuchen mit MPA lediglich für HAS2 bei Stimulation mit PDGF-BB und der niedrigeren verwendeten MPA-Konzentration nicht signifikant. Ein Trend zeichnete sich allerdings auch dort ab (Abb. 10 B).

Bei der Verwendung von NET-A lässt sich ebenfalls größtenteils eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes auf die mRNA-Expression von HAS2 und HAS3 erkennen, auch wenn dieser ohne gleichzeitige Stimulation mit PDGF-BB lediglich bei der höheren verwendeten NET-A-Konzentration signifikant war und für HAS3 bei Kostimulation mit PDGF-BB und NET-A in hoher Konzentration ein geringerer Effekt auf die Hemmung der mRNA-Expression resultierte als in der niedrigen Konzentration (Abb. 16 A und Abb. 17 B).

Auch wenn in diesem Kontext andere regulatorische Mechanismen, wie z.B. die Veränderung von Enzymaktivitäten mittels Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, nicht berücksichtigt wurden, ist davon auszugehen, dass die beobachtete Verminderung

der HA-Konzentration im Medium zumindest teilweise einer reduzierten Expression von HAS2 und HAS3 zugrunde liegt.

Bezüglich der Beeinflussung der HA-Synthese von HCASMC durch Stimulation mit Gestagenen ist bislang wenig bekannt. Freudenberger *et al.* beobachteten eine Verminderung des HA-Gehaltes in Aortenursprüngen von Apo-E-defizienten Mäusen nach Ovariectomie und subkutaner Verabreichung von MPA (Freudenberger *et al.*, 2009). Glatte Muskelzellen sind in großer Zahl in den Gefäßwänden des arteriellen Systems vorhanden (siehe Abschnitt 1.1.1), jedoch lassen die Untersuchungen von Freudenberger *et al.* keine Rückschlüsse auf den Zelltyp zu, welcher für die Verminderung des HA-Gehaltes verantwortlich ist. Tanaka *et al.* beschrieben von PG, dass es die Produktion von HA in humanen Fibroblasten des Gebärmutterhalses vermindert (Tanaka *et al.*, 1997). Fibroblasten sind zwar glatten Muskelzellen sehr ähnlich und in der Zellkultur rein morphologisch von ihnen sehr schwer zu unterscheiden, stellen jedoch einen anderen Zelltyp mit eigenen Eigenschaften dar (Hofmann und Goger, 1976; Kacem und Sercombe, 2006).

4.1.1 Mögliche Beeinflussung der Atherogenese

Bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques spielt HA eine entscheidende Rolle (siehe Abschnitt 1.5.3). MPA und NET-A könnten über eine Verminderung der HA-Synthese der Entwicklung atherosklerotischer Plaques entgegenwirken. Es wurde gezeigt, dass HA in der Lage ist, Komplexe mit LDL zu bilden, deren Aufnahme durch Makrophagen im Vergleich zu nativem LDL beschleunigt ist (Seike *et al.*, 2006). Tabata *et al.* beschrieben eine Steigerung der Aufnahme von oxLDL in humanen Monozyten durch den Einfluss von HA (Tabata *et al.*, 2007). Daher ist vorstellbar, dass eine Hemmung der HA-Synthese von glatten Muskelzellen durch MPA oder NET-A zu einer verminderten Bildung von Schaumzellen aus Monozyten / Makrophagen führen könnte. Obwohl der überwiegende Anteil der Schaumzellen einer atherosklerotischen Läsion monozytärer Herkunft ist, können auch glatte Muskelzellen zu Schaumzellen differenzieren (Viola *et al.*, 2013). Inwiefern auch dieser Vorgang abhängig von HA ist und ob eine Hemmung der HA-Synthese somit auch Einfluss auf die Ausbildung von Schaumzellen aus glatten Muskelzellen haben könnte, sollte zukünftig untersucht werden.

In Abhängigkeit ihrer Molekülgröße hat HA unterschiedlichen Einfluss auf das inflammatorische Geschehen. Hochmolekulare HA wirkt antiinflammatorisch, antiangiogen und immunsuppressiv. Im Gegensatz dazu stimuliert niedermolekulare HA die Expression

von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Sokolowska *et al.*, 2014). Bereits synthetisierte hochmolekulare HA kann in entzündlichen Läsionen zu niedermolekularer HA degradiert werden. Dies geschieht unter Einwirkung von Sauerstoffradikalen oder enzymatisch mittels HYAL, β -Glukuronidasen oder Hexosaminidasen (Powell und Horton, 2005). Die Veränderung der HA-Matrix hat somit Auswirkung auf die Atherogenese. Bei den durchgeführten HA-Messungen wurde jedoch lediglich die gesamte HA-Konzentration des Mediums quantifiziert. Daher kann hier keine Aussage getroffen werden, ob sich das Molekulargewicht der HA verändert und dadurch Leukozyten beeinflusst werden könnten.

4.1.2 Mögliche Beeinflussung der Integrität atherosklerotischer Plaques

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von stabilen und erodierten Plaques ist unterschiedlich. An der Oberfläche erodierter Plaques zeigt sich eine deutliche Akkumulation von HA und Versican. Demgegenüber enthält die Oberfläche stabiler Plaques nur wenig HA (Kolodgie *et al.*, 2002).

Zusätzlich ist bekannt, dass Thrombozyten über CD44 an HA binden können und dass HA daher Plättchenaggregation vermitteln kann (Koshiishi *et al.*, 1994; Kolodgie *et al.*, 2004). Es wird also davon ausgegangen, dass Ansammlungen von HA und Versican im Bereich von Plaqueerosionen Koronarthrombosen begünstigen (Kolodgie *et al.*, 2002). Eine Verminderung des HA-Gehaltes durch MPA oder NET-A könnte somit protektiv im Hinblick auf die Entstehung von Plaqueerosionen und von atherothrombotischen Ereignissen wirken.

Dieser Hypothese steht entgegen, dass in einem ApoE-defizienten-Mausmodell gezeigt wurde, dass die Substitution ovariektomierter Mäuse mit MPA zu einem erhöhten atherothrombotischen Risiko führte, das – zumindest partiell – in einem erhöhten endogenen Thrombinpotential begründet lag (Freudenberger *et al.*, 2009). Durch Hemmung der HA-Synthese bedingte potenziell protektive Effekte könnten somit von anderen Effekten synthetischer Gestagene antagonisiert werden.

Weiter ist beschrieben, dass Adhäsion, Wachstum und Überleben von Endothelzellen auf HA-Substraten vermindert ist. So wird vermutet, dass das verminderte Überleben von Endothelzellen die Plaqueerosion begünstigt und deren Apoptose zu einer Exposition von Matrixkomponenten und damit zur Plättchenaggregation führen kann (Bot *et al.*, 2008). Daraus ergibt sich, dass ein verminderter HA-Gehalt der Plaques sowohl die

Plaqueeosion als solche als auch die durch sie vermittelte Thrombusbildung vermindern könnte.

Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass sich an Orten der Plaqueruptur im Vergleich mit stabilen Plaques nur wenig HA befindet (Kolodgie *et al.*, 2002). Eine Verminderung der Produktion von HA durch synthetische Gestagene wie MPA oder NET-A könnte so zur Entstehung vulnerabler Regionen in Plaques führen. Solche Regionen können schließlich Ursprungsort von Plaquerupturen sein und demnach vaskuläre Ereignisse fördern.

4.2 Funktionelle Effekte

4.2.1 Einfluss von MPA auf die Proliferation von HCASMC

Die Proliferation glatter Muskelzellen spielt als funktioneller Parameter eine entscheidende Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Ross und Glomset, 1973; Ross, 1999). Sie wird auch durch HA beeinflusst. So wurde gezeigt, dass der HA-Synthese-Hemmstoff 4-MU die Proliferation aortaler glatter Muskelzellen hemmt (Vigetti *et al.*, 2009). Auch HA-Oligosaccharide führen zu einer Verminderung der Proliferation und der Migration aortaler glatter Muskelzellen. Als kurzkettige HA-Moleküle hemmen HA-Oligosaccharide die Bindung extrazellulärer HA an die Zelloberfläche und die Neubildung von HA-Matrix (Evanko *et al.*, 1999).

Aufgrund des funktionellen Zusammenhanges von HA und zellulärer Proliferation wurde evaluiert, ob die verminderte HA-Synthese durch HCASMC nach Stimulation mit MPA \pm PDGF-BB zu einer Veränderung der [³H]-Thymidin-Inkorporation von HCASMC führt. Dabei kam es jedoch weder durch die alleinige Stimulation mit MPA, noch durch die Stimulation mit MPA und PDGF-BB zu einer Änderung der Proliferation (Abb. 12).

Aus der Literatur gehen bisher diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse hervor. Zum einen zeigten Seeger *et al.*, dass direkte Stimulation mit MPA eine Zunahme des Zellwachstums von HCASMC bewirkt. Allerdings handelt es sich bei den durchgeführten Experimenten um Zellzählungen nach einer Stimulationsdauer von einer Woche ohne Serumentzug. Eine Kostimulation mit PDGF-BB wurde nicht untersucht (Seeger *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnten Dubey *et al.* keine Beeinflussung der [³H]-Thymidin-Inkorporation oder der Zellzahl aortaler glatter Muskelzellen nach Stimulation mit MPA feststellen (Dubey *et al.*, 2008). Auch bei den Versuchen von Rönnemaa *et al.* führte die direkte MPA-Stimulation aortaler glatter Muskelzellen nicht zu einem Effekt auf die Zellzahl und die DNA-Menge. Sie konnten jedoch eine Hemmung des Zellwachstums

durch Stimulation mit Blutseren von Frauen, welche zuvor MPA erhalten hatten, beobachten (Rönnemaa *et al.*, 1987).

4.2.2 Einfluss von MPA auf die Migration von HCASMC

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, spielt die Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die (Neo-) Intima eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques (Ross, 1999; Lacolley *et al.*, 2012). Es wurde publiziert, dass HA zelluläre Migration vermitteln kann. Evanko *et al.* beobachteten unter anderem, dass glatte Muskelzellen in Bewegung im Vergleich zu stationären Zellen eine besonders deutliche perizelluläre HA-Matrix ausbilden. Zusätzlich wiesen sie nach, dass die Migration von glatten Muskelzellen durch HA-Oligonukleotide gehemmt werden kann (Evanko *et al.*, 1999).

Zusätzlich ist bekannt, dass HA die Migration glatter Muskelzellen über RHAMM-aktivierte Signalkaskaden vermittelt (Goueffic *et al.*, 2006). Außerdem ist beschrieben, dass gealterte aortale glatte Muskelzellen eine gesteigerte HA-Synthese aufweisen und ein schnelleres Migrationsverhalten als junge Zellen aufwiesen (Vigetti *et al.*, 2008). Da eine MPA-Stimulation die HA-Synthese von HCASMC vermindert (Abb. 9) und HA zelluläre Migration vermitteln kann, wäre eine Hemmung der Migration glatter Muskelzellen durch MPA denkbar.

Die Ergebnisse der durchgeführten Migrationsversuche in der Chemotaxiskammer zeigten allerdings keinen Unterschied zwischen der Migration MPA-stimulierter Zellen in Richtung PDGF-BB im Vergleich zur Migration der Kontrolle in Richtung PDGF-BB (Abb. 13 A). Auch die Migration von HCASMC in Richtung MPA mit PDGF-BB war im Vergleich zur Migration gegen PDGF-BB alleine nicht verändert (Abb. 13 B).

Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Dubey *et al.*, die ebenfalls keine Beeinflussung der Migration aortaler glatter Muskelzellen bei der Verwendung von MPA und PDGF-BB zeigen konnten (Dubey *et al.*, 2008).

4.2.3 Verminderte Proliferation nach Stimulation mit NET-A und PDGF-BB

Wie bereits für MPA wurde auch für NET-A die [³H]-Thymidin-Inkorporation nach 24 h mit und ohne PDGF-BB-Kostimulation analysiert. Ungeachtet der Tatsache, dass die Stimulation mit NET-A alleine, wie schon die alleinige Stimulation mit MPA, keinen Effekt zeigte, führte die kombinierte Stimulation mit 10 µM NET-A und PDGF-BB zu einer Hemmung der [³H]-Thymidin-Inkorporation als Maß für die Proliferation (Abb. 18 B). Bei

dieser Kombination der Stimulanzen kam es ebenfalls zu einer Hemmung der HA-Synthese und zu einer verminderten mRNA-Expression der HAS2 (Abb. 15 B und Abb. 16 B). Für HAS3 bestand keine signifikante Verminderung der mRNA-Expression jedoch zumindest ein schwacher Trend dazu (Abb. 17 B). Da HA unter anderem die Proliferation glatter Muskelzellen vermitteln kann (siehe Abschnitt 1.5.3), kann vermutet werden, dass der Effekt der Kombination aus PDGF-BB und 10 μ M NET-A auf die Proliferation über dessen Effekt auf die HA-Synthese vermittelt wird.

Um die Hypothese eines kausalen Zusammenhanges zu stützen, wäre es von Interesse, zukünftig zu evaluieren, ob sich dieser Effekt auf die Proliferation von HCASMC mittels der Gabe exogener HA aufheben lässt.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist die Proliferation glatter Muskelzellen wie deren Migration ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen. Der hemmende Effekt von NET-A auf die Proliferation könnte eine potenziell protektive Wirkung bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques bedingen.

Verglichen mit den Messungen der HA-Konzentration im Medium ist anzumerken, dass die verwendete niedrigere NET-A-Konzentration zwar zu einer Verminderung der HA-Menge führte, jedoch nicht in einer Hemmung der Proliferation resultierte. Ebenso hemmte die niedrigere verwendete NET-A-Konzentration von 10 nM bei Kostimulation mit PDGF-BB die HA-Konzentration (Abb. 15 A), die Proliferation wurde jedoch von dieser Kombination nicht beeinflusst (Abb. 18 B). Es war also bei den Messungen der [³H]-Thymidin-Inkorporation kein konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten, wie diese bei den Messungen der HA-Konzentration und näherungsweise bei den Messungen der HAS2 und der HAS3 der Fall war. Da bekannt ist, dass beispielsweise die Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen vermindert, hätte auch bei der Hemmung der HA-Konzentration durch NET-A eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation vermutet werden können (Vigetti *et al.*, 2009). In welchem Maß die Hemmung der Proliferation von HCASMC durch PDGF-BB und 10 μ g NET-A von der, ebenfalls unter diesen Bedingungen auftretenden, Verminderung der HA-Menge im Medium abhängig ist, könnte zukünftig untersucht werden.

Interessanterweise trat der beobachtete funktionelle Effekt von NET-A auf die Proliferation nur bei gleichzeitiger Stimulation mit PDGF-BB auf (Abb. 18), das als ein wichtiger Wachstumsfaktor im Rahmen der Neointima-Bildung beschrieben wurde (George *et al.*,

1996). Die alleinige Stimulation mit NET-A hemmte zwar die HA-Sekretion (Abb. 15 A), im Gegensatz zur Kostimulation mit NET-A und PDGF-BB ging dieser Effekt jedoch nicht mit einer Verminderung der Proliferation von HCASMC einher (Abb. 18). PDGF-BB selbst führt zu einer Steigerung der Proliferation glatter Muskelzellen (Jiang *et al.*, 1996). Möglicherweise setzt die Hemmung der Proliferation durch NET-A eine parallele Stimulation des untersuchten Zelltyps voraus. Eine weitere Möglichkeit für diese Beobachtung könnte sein, dass die PDGF-BB-induzierte Verschiebung des Messbereiches zu höheren Werten für eine bessere Detektion des hemmenden Effektes von NET-A verantwortlich ist.

4.2.4 Verminderte Proliferation nach Stimulation mit PG und PDGF-BB

Wie das physiologische Gestagen PG wirkt NET-A agonistisch an Progesteronrezeptoren (Stanczyk *et al.*, 2013). Es wurde vergleichend untersucht, ob eine Kostimulation mit PG und PDGF-BB einen vergleichbar hemmenden Effekt auf die proliferative Aktivität von HCASMC zur Folge hat, wie die Kostimulation mit NET-A und PDGF-BB.

In diesem Kontext ist bereits beschrieben, dass PG die Proliferation von glatten Muskelzellen vermindert (Morey *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003). Suzuki *et al.* konnten durch Kombination von PDGF-BB und PG jedoch keinen Effekt auf die [³H]-Thymidin-Inkorporation aortaler glatter Muskelzellen zeigen. Diese verwendeten jedoch mit 1 nM eine höhere Konzentration PDGF-BB und mit maximal 1 μ M niedrigere PG-Konzentrationen als bei den hier durchgeführten Versuchen (Suzuki *et al.*, 1996). Vergleiche mit gemessenen Serumkonzentrationen von PG nach Verabreichung *in vivo* machen deutlich, dass sowohl die in dieser Arbeit, als auch die von Suzuki *et al.* verwendeten PG-Konzentrationen deutlich im supraphysiologischen Bereich lagen. So wurde durch Miles *et al.* nach intramuskulärer Gabe von 50 mg PG eine Serumkonzentration nach 6 h bis ca. 51 nM gemessen, was deutlich unter den hier *in vitro* verwendeten Konzentrationen liegt (Miles *et al.*, 1994).

Wie schon für die Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB und 10 μ M NET-A (Abb. 18 B) führte auch die Stimulation mit 10 ng/mL PDGF-BB und 10 μ M PG zu einer signifikanten Hemmung der [³H]-Thymidin-Inkorporation (Abb. 20).

Ergänzend könnte in weiterführenden Experimenten eruiert werden, ob die Hemmung der Proliferation von HCASMC bei Stimulation mit PG und PDGF-BB auch mit einer Hemmung der HA-Synthese einhergeht. Tanaka *et al.* zeigten bereits, dass die

HA-Synthese von Fibroblasten bei alleiniger Stimulation mit PG gehemmt wird (Tanaka *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse zur proliferativen Kapazität von HCASMC nach Stimulation mit den synthetischen Gestagenen MPA und NET-A lassen darauf schließen, dass NET-A eine Wirkung zeigt, welche dem physiologischen Gestagen PG entspricht, wohingegen MPA davon abweicht.

4.2.5 Hemmung der Migration durch NET-A bei Kostimulation mit PDGF-BB

Wie für MPA wurden auch für NET-A Migrationsversuche in einer Chemotaxiskammer durchgeführt. Dabei war die Migration von HCASMC in Richtung NET-A und PDGF-BB im Vergleich zur Migration gegen PDGF-BB alleine signifikant vermindert (Abb. 21 B). Beim Vergleich der Migration gegen PDGF-BB zeigten NET-A-stimulierte Zellen keinen Unterschied zu Zellen der Kontrolle (Abb. 21 A).

NET-A vermittelt in Kombination mit PDGF-BB im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB neben der Hemmung der Migration in der Chemotaxiskammer eine Hemmung der durch HAS vermittelten HA-Synthese (Abb. 15 B, Abb. 16 B und Abb. 17 B). Aus der Literatur geht hervor, dass HA von Bedeutung für die Migration glatter Muskelzellen ist (Evanko *et al.*, 1999; Goueffic *et al.*, 2006). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Hemmung der Migration (zumindest teilweise) durch die Hemmung der HA-Synthese hervorgerufen wird.

Wie bereits im Kontext der Proliferation diskutiert (siehe Abschnitt 4.2.3), ist es von Interesse, die Vermutung des möglichen Kausalzusammenhanges experimentell zu stützen. Zu diesem Zweck könnte auch hier versucht werden, den Effekt von NET-A durch zusätzliche Gabe exogener HA aufzuheben.

Im Gegensatz zur Stimulation mit MPA und PDGF-BB führte die Stimulation mit NET-A und PDGF-BB zu einer Hemmung der Proliferation und Migration von HCASMC (Abb. 12 B, Abb. 13 B, Abb. 18 B und Abb. 21 B). Im Hinblick auf die Messungen der [³H]-Thymidin-Inkorporation war der Effekt von NET-A und PDGF-BB gleichsinnig zum Effekt der Stimulation mit dem natürlichen Gestagen PG und PDGF-BB (Abb. 18 B und Abb. 20). Zukünftig könnte unter den hiesigen Versuchsbedingungen untersucht werden, ob auch die Stimulation mit PG und PDGF-BB zu einer Hemmung der Migration führt, wie es bei Stimulation mit NET-A und PDGF-BB der Fall war (Abb. 21 B). Aus der Literatur geht diesbezüglich bereits hervor, dass sowohl die alleinige PG-Stimulation aortaler glatten Muskelzellen aus Ratten, als auch die Stimulation mittels 500 nM PG in

Anwesenheit von 5 ng/mL PDGF-BB zu einer Hemmung der Migration *in vitro* führt (Hsu *et al.*, 2011).

Da die Migration glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Komponente bei der Bildung einer Neointima darstellt, könnte NET-A durch die Hemmung der Migration einen protektiven Effekt im Hinblick auf die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen aufweisen (Vigetti *et al.*, 2008).

4.3 Signaltransduktion

4.3.1 Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit MPA

Wie bereits in Abschnitt 1.6.3.1 beschrieben, kann über die Aktivierung der p38 MAPK die Expression von HAS vermittelt werden. So ist beispielsweise bekannt, dass die Steigerung der HA-Synthese nach Stimulation fibroblastenähnlicher Synoviozyten mit Chondroitinsulfat mit einer Stimulation der p38 MAPK einhergeht und dass Hydrocortison über eine Hemmung der p38 MAPK die HAS1-mRNA-Expression reduziert (David-Raoudi *et al.*, 2009; Stuhlmeier und Pollaschek, 2004). Außerdem vermindert eine Hemmung der p38 MAPK die Expression der HAS1-, HAS2- und HAS3-mRNA in Interleukin-1 β -stimulierten Fibroblasten (Chung *et al.*, 2014).

Von Steroidhormonen ist beschrieben, dass sie auch schnelle nicht-genomische Effekte bewirken, welche schon nach Sekunden bis Minuten auftreten können (Falkenstein *et al.*, 2000b). So wurde beispielsweise gezeigt, dass Östrogen bereits nach 10 min Stimulation zu einer Änderung der Aktivität der p38 MAPK führen kann (Razandi *et al.*, 2000). Dies verdeutlicht, dass HA-Synthese, p38 MAPK und deren Beeinflussung durch Steroidhormone in funktionellem Zusammenhang stehen können.

In den hier durchgeführten Experimenten führte die Stimulation mit MPA zu einer Verminderung der Phosphorylierung der p38 MAPK. Dieser Effekt trat bei alleiniger Stimulation mit MPA und bei Kostimulation mit PDGF-BB auf, auch wenn sich für die höhere verwendete MPA-Konzentration mit und ohne Kostimulation mit PDGF-BB lediglich ein Trend zu einer verminderten Aktivierung der untersuchten Kinase beobachtet werden konnte (Abb. 14). Dabei könnte es möglich sein, dass es durch die höhere Konzentration von MPA zu weiteren Effekten kommt, welche wiederum die, bei der niedrigeren Konzentration beobachtete, Hemmung der p38-MAPK aufheben könnte.

Die beschriebenen Zusammenhänge und der Effekt der MPA-Stimulation auf die p38 MAPK können vermuten lassen, dass die beobachtete Hemmung der mRNA-Expression der HAS2 und HAS3 (Abb. 10 und Abb. 11) und die damit einhergehende Verminderung der HA-Sekretion (Abb. 9) durch eine Hemmung der p38 MAPK vermittelt werden könnten. Von einem kausaler Zusammenhang kann an dieser Stelle jedoch nicht unkritisch ausgegangen werden. Zum einen kommt es nur bei der niedrigeren verwendeten MPA-Konzentration zu einem signifikanten Effekt auf die Aktivität der p38 MAPK. Für die höhere MPA-Konzentration besteht lediglich der Trend zu einer verminderten Phosphorylierung der untersuchten Kinase (Abb. 14). Demgegenüber lässt sich eine signifikante Hemmung der HAS sowie der HA-Konzentration des Kulturmediums für beide Konzentrationen nachweisen. Ausgenommen davon war lediglich die Hemmung der HAS2-mRNA, welche für PDGF-BB und 10 nM MPA keine Signifikanz zeigte (Abb. 9, Abb. 10 und Abb. 11). Zum anderen sollte der Verdacht eines kausalen Zusammenhanges einer Hemmung der p38 MAPK durch MPA mit der Folge der Hemmung des HA-Systems durch weitere Versuche untermauert werden. Zu diesem Zweck scheint es sinnvoll zu evaluieren, ob eine Hemmung der p38 MAPK, beispielsweise mittels eines MAPK-Inhibitors wie SB203580, ebenfalls mit einer Verminderung der mRNA-Expression von HAS2 und HAS3 und in Folge der HA-Menge im Medium einhergeht.

4.3.2 Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit NET-A

Wie bereits erwähnt, führte eine Stimulation mit NET-A oder MPA zu einer verminderten mRNA-Expression von HAS2 und HAS3. Dieser Effekt trat sowohl bei alleiniger Stimulation als auch bei Kostimulation mit PDGF-BB auf (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 16 und Abb. 17). Bei beiden synthetischen Gestagenen ging dies mit einer Hemmung der HA-Synthese einher (Abb. 9 und Abb. 15).

Es ist beschrieben, dass über p38 MAPK eine Expression von HAS vermittelt werden kann (Stuhlmeier und Pollaschek, 2004; David-Raoudi *et al.*, 2009; Röck *et al.*, 2011; Rauhala *et al.*, 2013). Bei den hier durchgeführten Versuchen ging die verminderte Expression der mRNA von HAS2 und HAS3 und die damit verbundene Verminderung der HA-Konzentration im Medium durch MPA-Stimulation mit verminderter Phosphorylierung der p38 MAPK einher (Abb. 14). Da auch NET-A-Stimulation die HA-Synthese vermindert (Abb. 15), stellte sich die Frage, ob eine Stimulation mit NET-A ebenfalls zu einer Beeinflussung der p38 MAPK führt.

Ein Effekt von NET-A auf die Proliferation als funktionellen Parameter von HCASMC trat nur bei der hohen verwendeten NET-A-Konzentration von 10 μ M in Kostimulation mit PDGF-BB auf (Abb. 18 B). Bei dieser Stimulanzien-Konzentration zeigte sich auch ein Effekt auf die zelluläre Migration (Abb. 21 B). Daher wurde eine mögliche Beeinflussung der p38 MAPK ebenfalls unter den genannten Bedingungen untersucht. Dabei wurde für NET-A keine Veränderung des phosphorylierten Anteiles der p38 MAPK gemessen (Abb. 22). Als weitere Proteinkinasen, welche in die Regulation der HAS-Expression involviert sein könnten, kommen beispielsweise ERK, die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) in Frage (Li *et al.*, 2007; David-Raoudi *et al.*, 2009; Röck *et al.*, 2011). Neben der p38 MAPK wurde in dieser Arbeit die Beeinflussung von ERK durch NET-A untersucht.

4.3.3 Phosphorylierung der p44/42 MAPK nach Stimulation mit NET-A

In Fibroblasten bewirkt die Hemmung der p44/42 MAPK eine verminderte Expression der HAS2 (Röck *et al.*, 2011). Umgekehrt könnte auch eine Änderung der HA-Synthese die Aktivität der p44/42 MAPK beeinflussen. Vigetti *et al.* zeigten, dass die erhöhte Produktion von HA durch gealterte aortale glatte Muskelzellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK führt und diese durch HA-Oligosaccharide oder CD44-Antikörper vermindert wird (Vigetti *et al.*, 2008). Kashima *et al.* stimulierten Gefäßmuskelzellen mit HA, was zu einer Aktivierung von ERK führte (Kashima *et al.*, 2013). Zudem wurde beschrieben, dass Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen durch PG-Stimulation mit einer Verminderung der ERK-Aktivität einhergeht (Morey *et al.*, 1997).

Da die Stimulation mit PDGF-BB und 10 μ M NET-A zu einer Hemmung der Migration und der Proliferation von HCASMC führte, wurde, wie schon bei der Untersuchung der p38 MAPK, die Beeinflussung der p44/42 MAPK unter diesen Bedingungen untersucht. Dabei wurde für eine Stimulation über 5 min eine Hemmung der Phosphorylierung der p44/42 MAPK im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PDGF-BB beobachtet, die nach 60 min nicht mehr nachweisbar war (Abb. 23).

Es ist beschrieben, dass Hemmung von ERK in stimulierten Fibroblasten die verminderte Expression von HAS1, HAS2 und HAS3 bewirken kann (Chung *et al.*, 2014). Zusätzlich ist HA von großer Bedeutung für zelluläre Migration und Proliferation (Evanko *et al.*, 1999). So kann spekuliert werden, dass NET-A über die schnelle Hemmung der ERK-Phosphorylierung zu einer Verminderung der HAS2- und HAS3-mRNA-Expression führen

könnte. Dies könnte wiederum mit einer Verminderung der HA-Synthese und in Folge einer Verminderung der Migration und Proliferation einhergehen (Abb. 24).

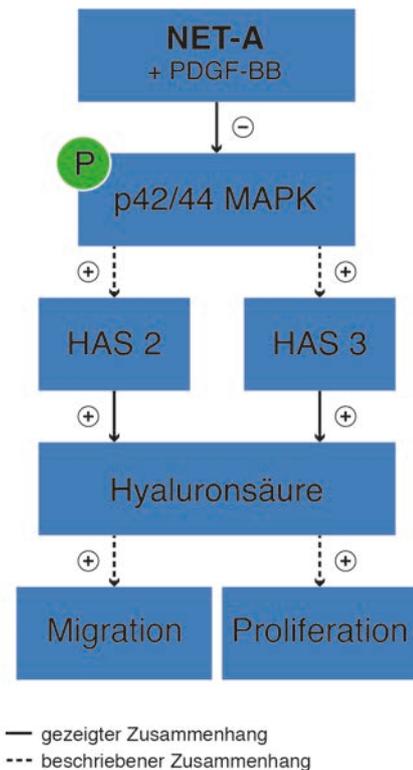


Abb. 24: Schematischer Überblick der Effekte von NET-A auf HCASMC. Dargestellt ist die mögliche Beeinflussung der untersuchten Parameter nach Stimulation von HCASMC mit NET-A und PDGF-BB.

Es wäre zur Stützung dieser Hypothese interessant zu untersuchen, ob sich bei Stimulation von HCASMC mit PDGF-BB und einem ERK-Inhibitor ähnliche Effekte wie bei Stimulation mit NET-A ergeben und ob die Zugabe exogener HA vor der Stimulation mit NET-A den Effekt auf Migration und Proliferation von HCASMC aufzuheben oder zumindest abzuschwächen vermag.

4.4 Gegenüberstellung der Effekte von MPA und NET-A

Zur Veranschaulichung der beobachteten Effekte von MPA, NET-A und PG wurden die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit in Tabelle 9 vereinfacht dargestellt.

Die synthetischen Gestagene MPA und NET-A führen zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der HAS2- und HAS3-mRNA-Expression (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 16 und Abb. 17). Dies geht sowohl bei MPA, als auch bei NET-A mit einer ebenfalls konzentrationsabhängigen Hemmung der HA-Synthese einher (Abb. 9 und Abb. 15).

An dieser Stelle muss erneut unterstrichen werden, dass beide Substanzen zwar den synthetischen Gestagenen zugeordnet werden, diese dabei jedoch deutlich

unterschiedliche Rezeptor-Bindungsprofile aufweisen (Stanczyk *et al.*, 2013). Da MPA und NET-A ungeachtet der unterschiedlichen Bindungsprofile zu einer Hemmung der HA-Menge im Medium führten, kann vermutet werden, dass es sich hierbei um einen Klasseneffekt synthetischer Gestagene handelt. Zur weiteren Untermauerung dieser Hypothese könnten Messungen der HA-Synthese und Quantifizierung der Expression von HAS2 und HAS3 auch nach Stimulation mit weiteren synthetischen Gestagenen erfolgen.

Tabelle 9: Übersicht der Effekte von MPA und NET-A auf HCASMC

	MPA	NET-A	PG
HA	↓ d.a.	↓ d.a.	
mRNA	HAS2 ↓ d.a. HAS3 ↓ d.a.	HAS2 ↓ d.a. HAS3 ↓ (d.a.)	
Proliferation	-	inkonsistent ↓ (d.a.)	↓
Migration	-	↓	
Signaltransduktion	p44/42 MAPK ↓	p38 MAPK ↓	

Vereinfachte Gegenüberstellung der Effekte von MPA, NET-A und PG im Rahmen der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit. (d.a.= dosisabhängig)

Eine Verminderung des HA-Gehaltes atherosklerotischer Läsionen kann sich sowohl „positiv“ als auch „negativ“ auf deren Genese oder Integrität auswirken (siehe Abschnitt 4.1). Die reine Verminderung der HA-Synthese durch MPA und NET-A lässt sich in diesem Kontext also nicht pauschal bewerten. Freudenberger *et al.* zeigten in einem ApoE-defizienten Mausmodell mit beschleunigter Atherosklerose keine Veränderung des HA-Gehaltes der Plaques im Aortenursprung nach bilateraler Ovariectomie und subkutaner Substitution von MPA, wobei die Gesamtplaquefläche in der Aorta der behandelten Tiere vermindert war. Bei kombinierter Substitution von MPA und Östradiol nach bilateraler Ovariectomie war der HA-Gehalt in Plaques des Aortenursprungs dieser Tiere hingegen gesteigert (Freudenberger *et al.*, 2009).

Die verminderte HA-Synthese durch HCASMC nach MPA-Stimulation (\pm PDGF-BB) geht mit einer Hemmung der Phosphorylierung der p38 MAPK einher (Abb. 14). Dieser Effekt deckt sich mit den Experimenten von Zhou *et al.* an Fibroblasten. MPA verminderte bei diesen die Interleukin-1 β -vermittelte Phosphorylierung der p38 MAPK, jedoch nicht die von ERK (Zhou *et al.*, 2012). Demgegenüber ist bei Stimulation von HCASMC mit NET-A

und PDGF-BB die Phosphorylierung der p44/42 MAPK nach 5 min vermindert (Abb. 23 A). Bei Untersuchung der Phosphorylierung von p38 MAPK kommt es zum untersuchten Zeitpunkt zu keinem Effekt (Abb. 22). Zukünftig sollte untersucht werden, ob Kostimulation von HCASMC mit PDGF-BB und 10 μ g MPA für 5 min ebenfalls zu einer Hemmung der p44/42 MAPK führt, oder ob dieser Effekt nur bei der Verwendung von NET-A auftritt.

Abgesehen von unterschiedlichen involvierten Proteinkinasen kam es im Vergleich von MPA und NET-A nur bei Stimulation mit NET-A und PDGF-BB zu einer Hemmung der Migration und Proliferation von HCASMC (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 18 und Abb. 21). Sowohl Migration als auch Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen werden von HA beeinflusst, so dass die Verminderung der HA-Synthese zu einer Hemmung von Migration und Proliferation führen könnte, wie dies für NET-A und PDGF-BB gezeigt wurde (Abb. 18 B und Abb. 21 B) (Evanko *et al.*, 1999).

Obwohl MPA auch die mRNA-Expression der HAS2 und HAS3 hemmt und die HA-Synthese nach MPA-Stimulation vermindert ist, konnte nach MPA-Stimulation kein Effekt auf Migration oder Proliferation als funktionelle Parameter beobachtet werden. Dies lässt jedoch vermuten, dass ein hier nicht weiter untersuchter Mechanismus einen möglichen hemmenden Effekt der verminderten HA-Synthese auf Migration und/oder Proliferation antagonisiert (Abb. 25).

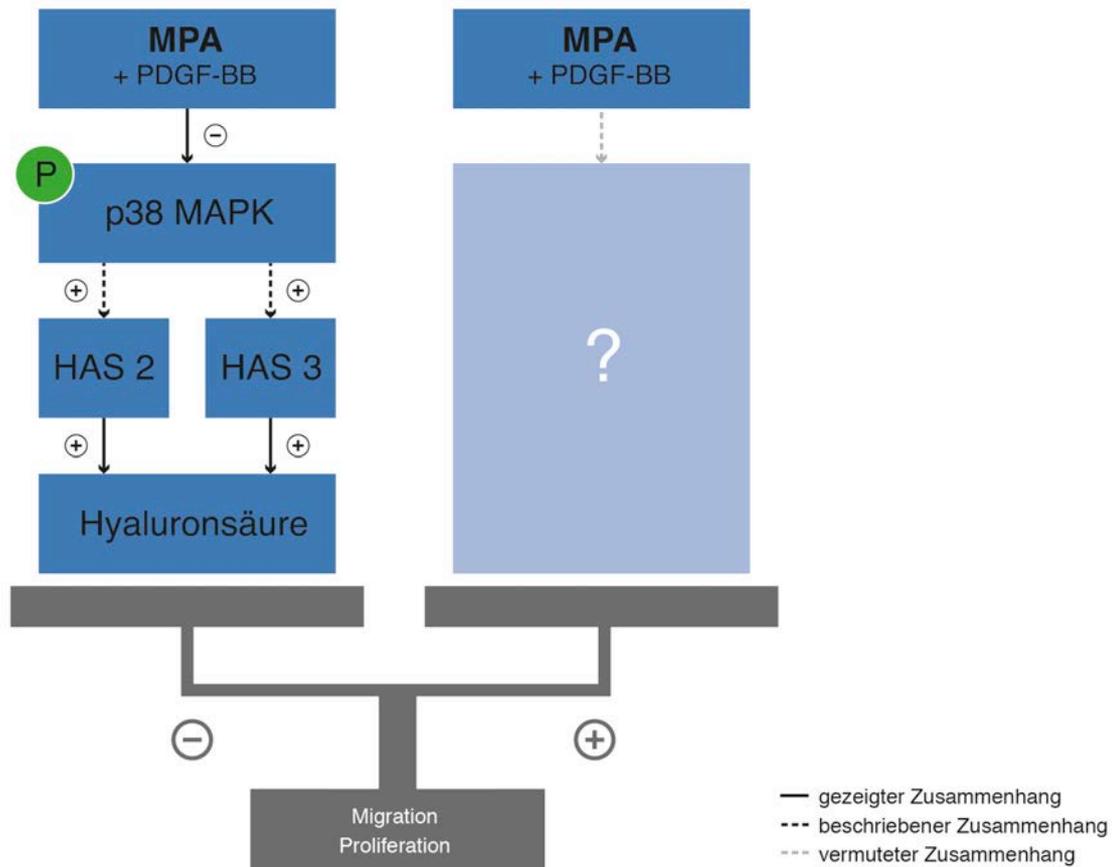


Abb. 25: Schematischer Überblick der Effekte von MPA auf HCASMC. Dargestellt ist die mögliche Beeinflussung der Migration und Proliferation nach Stimulation von HCASMC mit MPA und PDGF-BB, veranschaulicht anhand einer Waage. Die Verminderung der HA-Synthese lässt eine Hemmung der Migration und Proliferation von HCASMC vermuten (linke Waagschale) welche jedoch experimentell nicht gezeigt werden konnte und daher möglicherweise durch einen eventuellen weiteren MPA-Effektes (Fragezeichen) antagonisiert werden könnte (rechte Waagschale).

Gefäßmuskelzellen exprimieren Androgen-, Östrogen-, Progesteron-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptoren (Fujimoto *et al.*, 1994; Karas *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2005; McCurley *et al.*, 2013). Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt, unterscheiden sich MPA und NET-A hinsichtlich ihrer Affinität zu den verschiedenen Rezeptoren. Im Vergleich zu NET-A besitzt MPA vor allem eine höhere Affinität zum Glukokortikoidrezeptor (Stanczyk *et al.*, 2013). Es wäre daher zu vermuten, dass die fehlende Hemmung der Proliferation und Migration durch MPA im Vergleich zu NET-A auf eine glukokortikoide Wirkung zurückzuführen ist. Im Hinblick auf die gleichsinnige Wirkung von PG und NET-A auf die Proliferation erscheint dies jedoch unwahrscheinlich, da PG ähnlich wie MPA ebenfalls Affinität zum Glukokortikoidrezeptor aufweist, auch wenn diese deutlich geringer ist (Kuhl, 2005).

Zusätzlich unterscheiden sich MPA und NET-A in ihrer Affinität zu Mineralokortikoidrezeptoren. Während MPA und PG eine vergleichbar hohe Affinität wie die Referenzsubstanz Aldosteron aufweisen, hat NET-A keine mineralokortikoide Wirkung (Kuhl, 2005). Der Unterschied zwischen NET-A und PG diesbezüglich bei gleichsinniger Beeinflussung der Proliferation von HCASMC lassen eine Vermittlung des Effektes über Mineralokortikoidrezeptoren ebenfalls nicht vermuten.

Ob unterschiedliche Affinitäten der Gestagene zu den Subtypen der Steroidrezeptoren für die unterschiedlichen Wirkungen auf die Migration und die Proliferation von HCASMC verantwortlich sind könnte zukünftig untersucht werden. Dabei könnte sich die gezielte Blockade einzelner Steroidrezeptoren als nützlich erweisen. Ähnlich wie Gestagene selbst, haben die zu diesem Zweck verfügbaren Substanzen selbst jedoch ebenfalls keine absolute Selektivität. Im Hinblick auf die gezielte Blockade von Glukokortikoidrezeptoren erscheint beispielsweise der verbreitete Steroidrezeptor-Antagonist Mifepriston (RU486) dazu nicht geeignet. Dieser wirkt hauptsächlich am Progesteronrezeptor und erzielt erst bei hohen Konzentrationen Wirkung am Glukokortikoidrezeptor (Mohler *et al.*, 2007).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle kein Rückschluss auf eine Rezeptorabhängigkeit der unterschiedlichen funktionellen Effekte von MPA und NET-A gezogen werden, weshalb weitere Forschung notwendig ist.

Übertragen auf klinische Wirkungen könnte anhand der vorstehend beschriebenen Beobachtungen vermutet werden, dass NET-A im Rahmen einer HT einen protektiven Effekt aufweisen könnte, da es die PDGF-BB-stimulierte Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmt (Abb. 18 B und Abb. 21 B). Diese Vermutung deckt sich beispielsweise mit den Ergebnissen von Schierbeck *et al.*, die eine Verminderung von Mortalität, Myokardinfarkten und Herzversagen bei Verwendung von NET-A in Kombination mit Östradiol bei einer HT ab der frühen Postmenopause zeigen konnten (Schierbeck *et al.*, 2012).

Demgegenüber führte die Kombinationstherapie mit MPA und CEE während der *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study* (HERS) zu keinem signifikanten Gesamteffekt bezüglich des Eintretens kardiovaskulärer Endpunkte. Interessanterweise erhöhte die Intervention jedoch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse innerhalb des ersten Jahres und verminderte es im weiteren Verlauf (Hulley *et al.*, 1998). Aufgrund des fehlenden

positiven Gesamteffektes und des erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse zu Beginn der Therapie konnte die Verwendung von MPA und CEE zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse laut Hulley *et al.* nicht empfohlen werden (Hulley *et al.*, 1998).

In der *Womens Health Initiative* Studie (WHI) wurde hingegen unter Substitution von MPA und CEE eine Zunahme des Eintretens kardiovaskulärer Endpunkte beobachtet, wenngleich die Studie, aufgrund des Überschreitens der Abbruchgrenze für das Auftreten von Brustkrebs-Fällen, vorzeitig beendet wurde (Rossouw *et al.*, 2002).

Verglichen mit den in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten unterschiedlichen Effekten von MPA und NET-A auf Proliferation und Migration von HCASMC *in vitro* kann spekuliert werden, ob diese Effekte partiell auch zu den unterschiedlichen Wirkungen beider Gestagene mit Hinblick auf kardiovaskuläre Endpunkte in den oben genannten klinischen Studien beigetragen haben könnten.

4.5 Schlussfolgerungen

Stimulation von HCASMC mit MPA oder NET-A führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der Expression von HAS2 und HAS3. Dieser Effekt trat sowohl bei alleiniger Stimulation mit den beiden Gestagenen, als auch bei Kostimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB auf. Aus der Hemmung der beiden HAS-Isotypen resultierte eine verminderte Sekretion von HA in das Wachstumsmedium. Auch die Ausprägung dieses Effektes war konzentrationsabhängig. Die gleichartige Wirkung der unterschiedlichen Stimulanzen deutet im Hinblick auf die Regulation der HA-Synthese auf einen möglichen Klasseneffekt synthetischer Gestagene hin.

Ungeachtet dieses gleichartigen Effektes auf die HA-Synthese von HCASMC zeigten sich Unterschiede der untersuchten Gestagene bei der Beeinflussung der Signaltransduktion und funktionellen Parametern. Die Stimulation von HCASMC mit MPA führt zu einer verminderten Phosphorylierung der p38 MAPK in Anwesenheit und in Abwesenheit von PDGF-BB. Bei Kostimulation von HCASMC mit NET-A und PDGF-BB kommt es nicht zu einer veränderten Phosphorylierung der p38 MAPK, jedoch ist die Aktivität der p44/42 MAPK vermindert. Zusätzlich bedingt die Stimulation mit NET-A und PDGF-BB eine Hemmung der Migration und Proliferation der untersuchten Zellen. Bei der Verwendung von MPA \pm PDGF-BB ließ sich ein ähnlicher Effekt nicht nachweisen.

Die in dieser Arbeit untersuchte Wirkung auf HA-Synthese, Proliferation und Migration von HCASMC stellt einen weiteren Schritt zum Verständnis der zellulären Wirkung der ausgewählten Gestagene dar. Es ist denkbar, dass die dargestellten Effekte zu möglichen Auswirkungen einer HT auf das kardiovaskuläre System beitragen. Die unterschiedliche Wirkung von MPA und NET-A im Rahmen der hier dargestellten Forschungsergebnisse verdeutlicht, dass synthetische Gestagene aufgrund ihrer unterschiedlichen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik auch in diesem Kontext nicht ohne Weiteres als homogene Substanzgruppe verstanden werden dürfen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADAMS, M. R., REGISTER, T. C., GOLDEN, D. L., WAGNER, J. D. & WILLIAMS, J. K. 1997. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 217-21.
- AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. B. & STARKE, K. 2013. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, München, Urban & Fischer Elsevier.
- ALLAHVERDIAN, S., PANNU, P. S. & FRANCIS, G. A. 2012. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res*, 95, 165-72.
- ALVAREZ, R. H., KANTARJIAN, H. M. & CORTES, J. E. 2006. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc*, 81, 1241-57.
- BARRETT-CONNOR, E. & GRADY, D. 1998. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health*, 19, 55-72.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. 2013. *Stryer Biochemie*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- BERLINER, J. A., NAVAB, M., FOGELMAN, A. M., FRANK, J. S., DEMER, L. L., EDWARDS, P. A., WATSON, A. D. & LUSIS, A. J. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91, 2488-96.
- BORNFELDT, K. E., RAINES, E. W., NAKANO, T., GRAVES, L. M., KREBS, E. G. & ROSS, R. 1994. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest*, 93, 1266-74.
- BOT, P. T., HOEFER, I. E., PIEK, J. J. & PASTERKAMP, G. 2008. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Curr Med Chem*, 15, 786-91.
- BOT, P. T., PASTERKAMP, G., GOUMANS, M. J., STRIJDER, C., MOLL, F. L., DE VRIES, J. P., PALS, S. T., DE KLEIJN, D. P., PIEK, J. J. & HOEFER, I. E. 2010. Hyaluronic acid metabolism is increased in unstable plaques. *Eur J Clin Invest*, 40, 818-27.
- BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- CAGLAYAN, E., VANTLER, M., LEPPANEN, O., GERHARDT, F., MUSTAFOV, L., TEN FREYHAUS, H., KAPPERT, K., ODENTHAL, M., ZIMMERMANN, W. H., TALLQUIST, M. D. & ROSENKRANZ, S. 2011. Disruption of platelet-derived growth factor-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma 1 activity abolishes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointima formation in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 57, 2527-38.
- CHUNG, S. A., JEON, B. K., CHOI, Y. H., BACK, K. O., LEE, J. B. & KOOK, K. H. 2014. Pirfenidone attenuates the IL-1beta-induced hyaluronic acid increase in orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 2276-83.
- DAHIYA, P. & KAMAL, R. 2013. Hyaluronic Acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci*, 5, 309-15.

- DAVID-RAOUDI, M., DESCHREVEL, B., LECLERCQ, S., GALERA, P., BOUMEDIENE, K. & PUJOL, J. P. 2009. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: Role of p38 and Akt. *Arthritis Rheum*, 60, 760-70.
- DE LIGNIERES, B. 1999. Oral micronized progesterone. *Clin Ther*, 21, 41-60; discussion 1-2.
- DUBEY, R. K., JACKSON, E. K., GILLESPIE, D. G., ZACHARIA, L. C., WUNDER, D., IMTHURN, B. & ROSSELLI, M. 2008. Medroxyprogesterone abrogates the inhibitory effects of estradiol on vascular smooth muscle cells by preventing estradiol metabolism. *Hypertension*, 51, 1197-202.
- EVANKO, S. P., ANGELLO, J. C. & WIGHT, T. N. 1999. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1004-13.
- FALKENSTEIN, E., NORMAN, A. W. & WEHLING, M. 2000a. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2072-5.
- FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H. C., CHRIST, M., FEURING, M. & WEHLING, M. 2000b. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52, 513-56.
- FISCHER, J. W. & SCHRÖR, K. 2007. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 98, 287-95.
- FORCE, T. & BONVENTRE, J. V. 1998. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*, 31, 152-61.
- FRASER, J. R., LAURENT, T. C. & LAURENT, U. B. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, 242, 27-33.
- FREUDENBERGER, T., OPPERMAN, M., MARZOLL, A., HEIM, H. K., MAYER, P., KOJDA, G., WEBER, A. A., SCHROR, K. & FISCHER, J. W. 2009. Differential effects of medroxyprogesterone acetate on thrombosis and atherosclerosis in mice. *Br J Pharmacol*, 158, 1951-60.
- FREUDENBERGER, T., RÖCK, K., DAI, G., DORN, S., MAYER, P., HEIM, H. K. & FISCHER, J. W. 2011. Estradiol inhibits hyaluronic acid synthase 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 106, 1099-109.
- FUJIMOTO, R., MORIMOTO, I., MORITA, E., SUGIMOTO, H., ITO, Y. & ETO, S. 1994. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 50, 169-74.
- GENNARO, G., MENARD, C., GIASSON, E., MICHAUD, S. E., PALASIS, M., MELOCHE, S. & RIVARD, A. 2003. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 204-10.
- GEORGE, S. J., WILLIAMS, A. & NEWBY, A. C. 1996. An essential role for platelet-derived growth factor in neointima formation in human saphenous vein in vitro. *Atherosclerosis*, 120, 227-40.
- GOUEFFIC, Y., GUILLUY, C., GUERIN, P., PATRA, P., PACAUD, P. & LOIRAND, G. 2006. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. *Cardiovasc Res*, 72, 339-48.
- GRAF, K., XI, X. P., YANG, D., FLECK, E., HSUEH, W. A. & LAW, R. E. 1997. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 29, 334-9.
- GRODSTEIN, F., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E., COLDITZ, G. A., WILLETT, W. C., ROSNER, B., SPEIZER, F. E. & HENNEKENS, C. H. 1996. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 335, 453-61.

- GUSSENHOVEN, E. J., ESSED, C. E., LANCEE, C. T., MASTIK, F., FRIETMAN, P., VAN EGMOND, F. C., REIBER, J., BOSCH, H., VAN URK, H., ROELANDT, J. & ET AL. 1989. Arterial wall characteristics determined by intravascular ultrasound imaging: an in vitro study. *J Am Coll Cardiol*, 14, 947-52.
- HANSSON, G. K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352, 1685-95.
- HELDIN, C. H. & WESTERMARK, B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79, 1283-316.
- HELDIN, P., BASU, K., OLOFSSON, B., PORSCHE, H., KOZLOVA, I. & KAHATA, K. 2013. Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem*, 154, 395-408.
- HOFMANN, W. & GÖGER, D. 1976. A simple method for differentiating vascular smooth muscle cells and fibroblasts in tissue culture. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 370, 77-83.
- HSU, S. P., CHEN, T. H., CHOU, Y. P., CHEN, L. C., KUO, C. T., LEE, T. S., LIN, J. J., CHANG, N. C. & LEE, W. S. 2011. Extra-nuclear activation of progesterone receptor in regulating arterial smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis*, 217, 83-9.
- HULLEY, S., GRADY, D., BUSH, T., FURBERG, C., HERRINGTON, D., RIGGS, B. & VITTINGHOFF, E. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, 280, 605-13.
- ITANO, N. & KIMATA, K. 2002. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54, 195-9.
- JIANG, B., YAMAMURA, S., NELSON, P. R., MUREEBE, L. & KENT, K. C. 1996. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery*, 120, 427-31; discussion 432.
- JIANG, D., LIANG, J. & NOBLE, P. W. 2011. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*, 91, 221-64.
- KACEM, K. & SERCOMBE, R. 2006. Differing influence of sympathectomy on smooth muscle cells and fibroblasts in cerebral and peripheral muscular arteries. *Auton Neurosci*, 124, 38-48.
- KARAS, R. H., PATTERSON, B. L. & MENDELSON, M. E. 1994. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*, 89, 1943-50.
- KASHIMA, Y., TAKAHASHI, M., SHIBA, Y., ITANO, N., IZAWA, A., KOYAMA, J., NAKAYAMA, J., TANIGUCHI, S., KIMATA, K. & IKEDA, U. 2013. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PLoS One*, 8, e58760.
- KAUFMANN, M. 2013. *Die Gynäkologie*, Berlin [u.a.], Springer.
- KOLODGIE, F. D., BURKE, A. P., FARB, A., WEBER, D. K., KUTYS, R., WIGHT, T. N. & VIRMANI, R. 2002. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1642-8.
- KOLODGIE, F. D., BURKE, A. P., WIGHT, T. N. & VIRMANI, R. 2004. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol*, 15, 575-82.
- KOSHIISHI, I., SHIZARI, M. & UNDERHILL, C. B. 1994. CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan. *Blood*, 84, 390-6.
- KUHL, H. 2005. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*, 8 Suppl 1, 3-63.

- LACOLLEY, P., REGNAULT, V., NICOLETTI, A., LI, Z. & MICHEL, J. B. 2012. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*, 95, 194-204.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. & FRASER, J. R. 1995. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis*, 54, 429-32.
- LEE, W. S., HARDER, J. A., YOSHIZUMI, M., LEE, M. E. & HABER, E. 1997. Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat Med*, 3, 1005-8.
- LEE, W. S., LIU, C. W., JUAN, S. H., LIANG, Y. C., HO, P. Y. & LEE, Y. H. 2003. Molecular mechanism of progesterone-induced antiproliferation in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*, 144, 2785-90.
- LI, L., ASTERIOU, T., BERNERT, B., HELDIN, C. H. & HELDIN, P. 2007. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem J*, 404, 327-36.
- LIBBY, P. & THEROUX, P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, 3481-8.
- MAGLIANO, D. J., ROGERS, S. L., ABRAMSON, M. J. & TONKIN, A. M. 2006. Hormone therapy and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 113, 5-14.
- MCCURLEY, A., MCGRAW, A., PRUTHI, D. & JAFFE, I. Z. 2013. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors: role in vascular function and contribution to cardiovascular disease. *Pflugers Arch*, 465, 1661-70.
- MENDELSON, M. E. 2002. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*, 89, 12E-17E; discussion 17E-18E.
- MILES, R. A., PAULSON, R. J., LOBO, R. A., PRESS, M. F., DAHMOUSH, L. & SAUER, M. V. 1994. Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study. *Fertil Steril*, 62, 485-90.
- MOHLER, M. L., HE, Y., WU, Z., HONG, S. S. & MILLER, D. D. 2007. Non-steroidal glucocorticoid receptor antagonists: the race to replace RU-486 for anti-glucocorticoid therapy. *Expert Opin Ther Pat*, 17, 59-81.
- MORETTO, P., KAROUSOU, E., VIOLA, M., CAON, I., D'ANGELO, M. L., DE LUCA, G., PASSI, A. & VIGETTI, D. 2015. Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes. *J Diabetes Res*, 2015, 167283.
- MOREY, A. K., PEDRAM, A., RAZANDI, M., PRINS, B. A., HU, R. M., BIESIADA, E. & LEVIN, E. R. 1997. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology*, 138, 3330-9.
- NAKAMURA, Y., SUZUKI, T., INOUE, T., TAZAWA, C., ONO, K., MORIYA, T., SAITO, H., ISHIBASHI, T., TAKAHASHI, S., YAMADA, S. & SASANO, H. 2005. Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. *Endocr J*, 52, 245-52.
- NIEDHART, C. 2016. [Osteoporosis: Diagnostics and Therapy According to the German Guidelines]. *Z Orthop Unfall*, 154, 237-44.
- NILSEN, J. & BRINTON, R. D. 2002. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*, 143, 205-12.
- ONO, K. & HAN, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13.

- ORTMANN, O., DOREN, M., WINDLER, E. & ASSOCIATION OF SCIENTIFIC MEDICAL SOCIETIES IN GERMANY, A. 2011. Hormone therapy in perimenopause and postmenopause (HT). Interdisciplinary S3 Guideline, Association of the Scientific Medical Societies in Germany AWMF 015/062-short version. *Arch Gynecol Obstet*, 284, 343-55.
- ORTMANN, O. & LATTRICH, C. 2012. The treatment of climacteric symptoms. *Dtsch Arztebl Int*, 109, 316-23; quiz 324.
- PAPAKONSTANTINO, E., KARAKIULAKIS, G., ROTH, M. & BLOCK, L. H. 1995. Platelet-derived growth factor stimulates the secretion of hyaluronic acid by proliferating human vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9881-5.
- PASONEN-SEPPÄNEN, S., TAKABE, P., EDWARD, M., RAUHALA, L., RILLA, K., TAMMI, M. & TAMMI, R. 2012. Melanoma cell-derived factors stimulate hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts by upregulating HAS2 through PDGFR-PI3K-AKT and p38 signaling. *Histochem Cell Biol*, 138, 895-911.
- PHILIBERT, D., BOUCHOUX, F., DEGRYSE, M., LECAQUE, D., PETIT, F. & GAILLARD, M. 1999. The pharmacological profile of a novel norpregnane progestin (trimegestone). *Gynecol Endocrinol*, 13, 316-26.
- POWELL, J. D. & HORTON, M. R. 2005. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res*, 31, 207-18.
- PREHM, P. 1984. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J*, 220, 597-600.
- RAINES, E. W. 2004. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15, 237-54.
- RAUHALA, L., HÄMÄLÄINEN, L., SALONEN, P., BART, G., TAMMI, M., PASONEN-SEPPÄNEN, S. & TAMMI, R. 2013. Low dose ultraviolet B irradiation increases hyaluronan synthesis in epidermal keratinocytes via sequential induction of hyaluronan synthases Has1-3 mediated by p38 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling. *J Biol Chem*, 288, 17999-8012.
- RAZANDI, M., PEDRAM, A. & LEVIN, E. R. 2000. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem*, 275, 38540-6.
- REED, R. K., LILJA, K. & LAURENT, T. C. 1988. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand*, 134, 405-11.
- REGITZ-ZAGROSEK, V. 2006. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 425-38.
- RÖCK, K., GRANDOCH, M., MAJORA, M., KRUTMANN, J. & FISCHER, J. W. 2011. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling. *J Biol Chem*, 286, 18268-76.
- RÖNNEMAA, T., JÄRVELÄINEN, H., LEHTONEN, A., GRÖNROOS, M., MARNIEMI, J. & RAUTIO, A. 1987. Growth of human aortic smooth muscle cells cultured with human serum is retarded when serum lipids are lowered by medroxyprogesterone. *Atherosclerosis*, 67, 223-8.
- RORABACHER, D. B. 1991. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. *Analytical Chemistry*, 63, 139-146.
- ROSS, R. 1989. Platelet-derived growth factor. *Lancet*, 1, 1179-82.
- ROSS, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-9.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- ROSS, R., GLOMSET, J. & HARKER, L. 1977. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, 86, 675-84.

- ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B. & HARKER, L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1207-10.
- ROSS, R. & GLOMSET, J. A. 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180, 1332-9.
- ROSS, R., MASUDA, J., RAINES, E. W., GOWN, A. M., KATSUDA, S., SASAHARA, M., MALDEN, L. T., MASUKO, H. & SATO, H. 1990. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science*, 248, 1009-12.
- ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M., OCKENE, J. & WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE, I. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288, 321-33.
- RUTHERFORD, C., MARTIN, W., CARRIER, M., ANGGARD, E. E. & FERNS, G. A. 1997. Endogenously elicited antibodies to platelet derived growth factor-BB and platelet cytosolic protein inhibit aortic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. *Int J Exp Pathol*, 78, 21-32.
- SADOWITZ, B., SEYMOUR, K., GAHTAN, V. & MAIER, K. G. 2012. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *J Surg Res*, 173, e63-72.
- SATO, A., SHEPPARD, K. E., FULLERTON, M. J., SVIRIDOV, D. D. & FUNDER, J. W. 1995. Glucocorticoid receptor expression is down-regulated by Lp(a) lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 136, 3707-13.
- SCHIERBECK, L. L., REJNMARK, L., TOFTENG, C. L., STILGREN, L., EIKEN, P., MOSEKILDE, L., KOBER, L. & JENSEN, J. E. 2012. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ*, 345, e6409.
- SEEGER, H., WALLWIENER, D. & MUECK, A. O. 2001. Effect of medroxyprogesterone acetate and norethisterone on serum-stimulated and estradiol-inhibited proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. *Menopause*, 8, 5-9.
- SEIKE, M., IKEDA, M., MATSUMOTO, M., HAMADA, R., TAKEYA, M. & KODAMA, H. 2006. Hyaluronan forms complexes with low density lipoprotein while also inducing foam cell infiltration in the dermis. *J Dermatol Sci*, 41, 197-204.
- SHAH, P. K. 2002. Pathophysiology of coronary thrombosis: role of plaque rupture and plaque erosion. *Prog Cardiovasc Dis*, 44, 357-68.
- SITRUK-WARE, R. 2000. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids*, 65, 651-8.
- SITRUK-WARE, R. 2002. Progestogens in hormonal replacement therapy: new molecules, risks, and benefits. *Menopause*, 9, 6-15.
- SITRUK-WARE, R. L. 2003. Hormone therapy and the cardiovascular system: the critical role of progestins. *Climacteric*, 6 Suppl 3, 21-8.
- SOKOLOWSKA, M., CHEN, L. Y., EBERLEIN, M., MARTINEZ-ANTON, A., LIU, Y., ALSAATY, S., QI, H. Y., LOGUN, C., HORTON, M. & SHELHAMER, J. H. 2014. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2alpha and eicosanoid production in monocytes and macrophages. *J Biol Chem*, 289, 4470-88.
- SPAGNOLI, L. G., PALMIERI, G., MAURIELLO, A., ORLANDI, A., BANCHERI, C. & PASETTO, N. 1990. High-dose synthetic progestogens inhibit foam and smooth muscle cell proliferation and atherosclerotic plaque formation in aortas of rabbits fed a hypercholesterolemic diet. *Atherosclerosis*, 82, 27-36.

- STANCZYK, F. Z., HAPGOOD, J. P., WINER, S. & MISHELL, D. R., JR. 2013. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects. *Endocr Rev*, 34, 171-208.
- STARY, H. C., BLANKENHORN, D. H., CHANDLER, A. B., GLAGOV, S., INSULL, W., JR., RICHARDSON, M., ROSENFELD, M. E., SCHAFFER, S. A., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D. & ET AL. 1992. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85, 391-405.
- STARY, H. C., CHANDLER, A. B., GLAGOV, S., GUYTON, J. R., INSULL, W., JR., ROSENFELD, M. E., SCHAFFER, S. A., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D. & WISSLER, R. W. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89, 2462-78.
- STERN, R. 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol*, 83, 317-25.
- STERN, R. & JEDRZEJAS, M. J. 2006. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*, 106, 818-39.
- STUHLMEIER, K. M. & POLLASCHEK, C. 2004. Glucocorticoids inhibit induced and non-induced mRNA accumulation of genes encoding hyaluronan synthases (HAS): hydrocortisone inhibits HAS1 activation by blocking the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Rheumatology (Oxford)*, 43, 164-9.
- SUZUKI, A., MIZUNO, K., INO, Y., OKADA, M., KIKKAWA, F., MIZUTANI, S. & TOMODA, Y. 1996. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res*, 32, 516-23.
- TABAS, I., GARCIA-CARDENA, G. & OWENS, G. K. 2015. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*, 209, 13-22.
- TABATA, T., MINE, S., OKADA, Y. & TANAKA, Y. 2007. Low molecular weight hyaluronan increases the Uptaking of oxidized LDL into monocytes. *Endocr J*, 54, 685-93.
- TANAKA, K., NAKAMURA, T., TAKAGAKI, K., FUNAHASHI, M., SAITO, Y. & ENDO, M. 1997. Regulation of hyaluronate metabolism by progesterone in cultured fibroblasts from the human uterine cervix. *FEBS Lett*, 402, 223-6.
- TERMEER, C., BENEDIX, F., SLEEMAN, J., FIEBER, C., VOITH, U., AHRENS, T., MIYAKE, K., FREUDENBERG, M., GALANOS, C. & SIMON, J. C. 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 195, 99-111.
- TOOLE, B. P. 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*, 4, 528-39.
- TURLEY, E. A., NOBLE, P. W. & BOURGUIGNON, L. Y. 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, 277, 4589-92.
- TWAROCK, S., ROCK, K., SARBIA, M., WEBER, A. A., JANICKE, R. U. & FISCHER, J. W. 2009. Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-cAMP pathway. *Br J Pharmacol*, 157, 234-43.
- VIGETTI, D., RIZZI, M., VIOLA, M., KAROUSOU, E., GENASETTI, A., CLERICI, M., BARTOLINI, B., HASCALL, V. C., DE LUCA, G. & PASSI, A. 2009. The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology*, 19, 537-46.

- VIGETTI, D., VIOLA, M., KAROUSOU, E., RIZZI, M., MORETTO, P., GENASETTI, A., CLERICI, M., HASCALL, V. C., DE LUCA, G. & PASSI, A. 2008. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *J Biol Chem*, 283, 4448-58.
- VIOLA, M., BARTOLINI, B., VIGETTI, D., KAROUSOU, E., MORETTO, P., DELEONIBUS, S., SAWAMURA, T., WIGHT, T. N., HASCALL, V. C., DE LUCA, G. & PASSI, A. 2013. Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 288, 29595-603.
- WAINWRIGHT, C. L., MILLER, A. M. & WADSWORTH, R. M. 2001. Inflammation as a key event in the development of neointima following vascular balloon injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28, 891-5.
- WAKATSUKI, A., OKATANI, Y., IKENOUE, N. & FUKAYA, T. 2001. Effect of medroxyprogesterone acetate on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation*, 104, 1773-8.
- WANG, D., WANG, Q., YAN, G., QIAO, Y. & TANG, C. 2015. Phloretin Inhibits Platelet-derived Growth Factor-BB-induced Rat Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, and Neointimal Formation After Carotid Injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 65, 444-55.
- WELSCH, U., DELLER, T. & KUMMER, W. 2014. *Lehrbuch Histologie*, München, Elsevier Urban & Fischer.
- XU, W., GUO, T., ZHANG, Y., JIANG, X., ZHANG, Y., ZEN, K., YU, B. & ZHANG, C. Y. 2011. The inhibitory effect of dexamethasone on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration through up-regulating PGC-1alpha expression. *Exp Cell Res*, 317, 1083-92.
- YAMAMOTO, H., TSURUOKA, S., IOKA, T., ANDO, H., ITO, C., AKIMOTO, T., FUJIMURA, A., ASANO, Y. & KUSANO, E. 2006. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 69, 1780-5.
- YANG, G., LI, J. Q., BO, J. P., WANG, B., TIAN, X. R., LIU, T. Z. & LIU, Z. L. 2015. Baicalin inhibits PDGF-induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells. *Int J Clin Exp Med*, 8, 20532-9.
- YAO, L. Y., MOODY, C., SCHONHERR, E., WIGHT, T. N. & SANDELL, L. J. 1994. Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol*, 14, 213-25.
- ZHOU, H., KIMURA, K., ORITA, T., NISHIDA, T. & SONODA, K. H. 2012. Inhibition by medroxyprogesterone acetate of interleukin-1beta-induced collagen degradation by corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 4213-9.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Lösungen	18
Tabelle 2: Verwendete Stimulanzen in der Zellkultur.....	21
Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen bei quantitativer Realtime PCR.....	25
Tabelle 4: Zyklen der quantitativen Realtime PCR	25
Tabelle 5: Coomassie-Färbung	27
Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	29
Tabelle 7: Western-Blot Erstantikörper.....	31
Tabelle 8: Western-Blot Zweitantikörper	31
Tabelle 9: Übersicht der Effekte von MPA und NET-A auf HCASMC	61

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Medroxyprogesteron-acteat (MPA)	7
Abb. 2: Norethisteron-acetat (NET-A)	7
Abb. 3: Progesteron (PG)	8
Abb. 4: Hyaluronsäure und die Hyaluronsäuresynthasen	10
Abb. 5: Schematische Darstellung eines Migrationsversuches.....	26
Abb. 6: Auswertung eines Migrationsversuches.....	28
Abb. 7: Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HCASMC	33
Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopie von HCASMC nach Stimulation mit PDGF-BB.....	34
Abb. 9: Hyaluronsäurekonzentration im Medium nach MPA-Stimulation	35
Abb. 10: HAS2-mRNA-Expression nach MPA-Stimulation.....	36
Abb. 11: HAS3-mRNA-Expression nach MPA-Stimulation.....	36
Abb. 12: Zellproliferation nach MPA-Stimulation	37
Abb. 13: Zellmigration nach MPA-Stimulation	38
Abb. 14: Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit MPA	39
Abb. 15: Hyaluronsäurekonzentration des Mediums nach NET-A-Stimulation	40
Abb. 16: HAS2-mRNA-Expression nach NET-A-Stimulation.....	41
Abb. 17: HAS3-mRNA-Expression nach NET-A-Stimulation.....	42
Abb. 18: Zellproliferation nach NET-A-Stimulation	43
Abb. 19: Durchlichtmikroskopie nach Stimulation von HCASMC mit NET-A.....	44
Abb. 20: Zellproliferation nach PG-Stimulation.....	45

Abb. 21: Zellmigration nach NET-A-Stimulation	46
Abb. 22: Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit NET-A	47
Abb. 23: Phosphorylierung von p44/42 MAPK nach Stimulation mit NET-A	48
Abb. 24: Schematischer Überblick der Effekte von NET-A auf HCASMC	60
Abb. 25: Schematischer Überblick der Effekte von MPA auf HCASMC	63

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Fischer für die Ermöglichung und die Begleitung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt außerdem Dr. Till Freudenberger für die Betreuung und die Unterstützung bei Konzeption und Umsetzung.

Weiter danke ich Dr. Dr. Sören Twarock für Korrekturlesungen und die stets konstruktive Hilfe.

Zusätzlich möchte ich mich bei Beate Weyrauther für ihre Unterstützung im Zellkultur-Labor und bei Irmhild Rüter für ihre wertvolle Hilfe bei Hyaluronsäure-Bestimmungen und bei Proliferationsmessungen bedanken.

Vielen Dank auch Dr. Inga Kretschmer und Dr. Alexandra Schütze für die vielen produktiven und ehrlichen Gespräche, sowie für Hilfe bei PCR-Bestimmungen. Ohne euch wären die Nächte und Wochenenden im Labor nicht so unterhaltsam gewesen.

Für Hilfe bei den PCR-Bestimmungen möchte ich mich zusätzlich bei Dr. Lena Kiene, Petra Rompel und Dr. Julia Maier bedanken.

Selbstverständlich danke ich auch dem gesamten übrigen Team des pharmakologischen Labors für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung jeglicher Art. Insbesondere danke ich Kerstin Freidel, Prof. Dr. Maria Grandoch, Benjamin Kellner, Dr. Julia Müller, Dr. Katharina Röck, Bärbel Reupert und Annika Zimmermann für ihre Unterstützung.

Außerdem möchte ich außerordentlich bei meinen Eltern für ihre stets bedingungslose Unterstützung danken, welche ich nicht nur während meiner Ausbildung, meines Studiums und der Promotion erhalten habe.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Julia für ihre Korrekturlesungen und ihre vielen liebevollen Ermutigungen.