

**Aktivierung von humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch  
Hyaluronsäure-Synthase 3:  
Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Berit Rabausch

aus Düsseldorf

Mai 2008

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

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

Referent: Prof. Dr. J. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. J. Jose

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2008

# INHALTSVERZEICHNIS

# I-III

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	HYALURONSÄURESYNTHESE .....	1
1.2	REGULATION DER HAS-ISOFORMEN.....	3
1.3	FUNKTIONEN DER HA .....	3
1.4	HYALADHÄRINE UND HYALURONSÄUREREZEPTOREN.....	6
1.4.1	<i>Hyaluronsäurerezeptor CD44</i> .....	6
1.4.2	<i>Receptor of Hyaluronan mediated motility (RHAMM)</i> .....	7
1.4.3	<i>Toll-Ähnliche-Rezeptoren 2 und 4</i> .....	8
1.5	ATHEROSKLEROSE .....	8
1.6	HYALURONSÄURE IN DER ÄTHEROSKLEROSE .....	12
1.6.1	<i>HA und vaskuläre Entzündung</i> .....	13
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
2.1	SUBSTANZEN .....	16
2.2	ANTIKÖRPER.....	18
2.3	PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR IMMUNOBLOTS .....	20
2.4	GERÄTE UND MATERIAL.....	21
2.3	KULTIVIERUNG VON ZELLEN .....	23
2.3.1	<i>Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen</i> .....	23
2.4.1	<i>Kultivierung der monozytären Zelllinie U937</i> .....	23
2.5	PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA.....	24
2.5.1	<i>Quantifizierung der mRNA mittels Real-Time RT-PCR</i> .....	24
2.5.2	<i>Semiquantitative RT-PCR</i> .....	26
2.5.3	<i>Densitometrische Auswertung der RT-PCR</i> .....	27
2.6	ANALYSE DES VSMC-PHÄNOTYPS.....	28
2.6.1	<i>Migrations-Assay</i> .....	28
2.6.2	<i>DNA-Neusynthese</i> .....	28
2.6.3	<i>Hyaluronsäurequantifizierung</i> .....	29
2.6.4	<i>Biochemische Analyse der perizellulären und intrazellulären HA</i> .....	30
2.6.5	<i>Visualisierung der perizellulären Hyaluronsäurematrix</i> .....	30
2.6.6	<i>Morphometrische Analyse humaner, glatter Gefäßmuskelzellen</i> .....	31
2.6.7	<i>Kokultivierung von VSMC mit U937-Zellen</i> .....	31
2.6.8	<i>Morphometrische Analyse des Aktinzytoskletts und der Fokalen Adhäsionen</i> .....	31
2.6.9	<i>Färbung von CD44 und HA</i> .....	32
2.6.10	<i>Größenausschlusschromatographie</i> .....	33

2.7	LENTIVIRALE TRANSFEKTION.....	35
2.7.1	<i>Das Drei-Plasmid-System</i> .....	35
2.7.2	<i>Produktion der Lentiviren in HEK293T Zellen</i> .....	36
2.7.3	<i>Transduktion von humanen VSMC</i> .....	36
2.7.4	<i>Klonierung der humanen Hyaluronsäuresynthase 3</i> .....	37
2.7.5	<i>Lentiviraler knock down der humanen HAS3</i> .....	37
2.8	TRANSFEKTION VON siRNA OLIGONUKLEOTIDEN .....	37
2.9	PROTEINANALYSE MITTELS <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	39
2.10	PROTEINBESTIMMUNG FÜR PROLIFERATIONUNTERSUCHUNGEN UND HYALURONSÄUREMESSUNGEN .....	40
2.11	ANALYSE HUMANER ATHEROSKLEROTISCHER LÄSIONEN.....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
3.1	ZYTKINABHÄNGIGE HYALURONSÄUREREGULATION.....	42
3.2	IDENTIFIZIERUNG DER DURCH ZYTKINE INDUZIERTEN HA-SYNTHESE .....	45
3.3	AKTIVIERUNG VON NFkB FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN HAS3 TRANSKRIPTION.....	48
3.4	MODIFIZIERUNG DER HAS3 EXPRESSION .....	53
3.4.1	<i>HAS3 knock down mittels RNA-Interferenz</i> .....	53
3.4.1.1	Migration und Proliferation von VSMC .....	54
3.4.2	<i>HAS3 Überexpression</i> .....	57
3.4.3	<i>Untersuchung der HAS3 vermittelten Signalkaskaden</i> .....	66
3.4.4	<i>Untersuchung der FAK nachgeschalteten Signalkaskaden</i> .....	68
3.4.5	<i>HAS3 verstärkt PDGF-BB induzierte Signaltransduktion</i> .....	70
3.4.6	<i>Regulation von Proliferation und Migration</i> .....	71
3.5	HUMANE ATHEROSKLEROTISCHE LÄSIONEN .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>75</b>
4.1	ZYTKIN VERMITTELTE HA-INDUKTION .....	75
4.2	EINFLUSS DER ZYTKINE AUF DIE HAS-ISOFORM EXPRESSION .....	76
4.3	MECHANISMUS DER ZYTKIN ABHÄNGIGEN HAS3-REGULATION .....	77
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER DURCH IL-1B INDUZIERTEN HA .....	80
4.4.1	<i>IL-1<math>\beta</math> induziert nicht die Zunahme der perizellulären HA-Matrix</i> .....	80
4.4.2	<i>IL-1<math>\beta</math> induziert niedermolekulare HA-Polymere</i> .....	81
4.5	FUNKTIONSANALYSE DER HAS3 AN HUMANEN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN .....	81
4.5.1	<i>HAS3 unterstützt die Migration von humanen VSMC</i> .....	82
4.5.2	<i>HAS3 fördert die Proliferation humaner VSMC</i> .....	84
4.5.3	<i>Überexpression von HAS3v1</i> .....	85
4.5.3.1	Etablierung und Validierung der HAS3v1 Überexpression.....	87
4.5.3.2	HAS3 abhängige Veränderungen der Morphologie von VSMC .....	88
4.5.3.3	Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskomplexe nach Überexpression von	

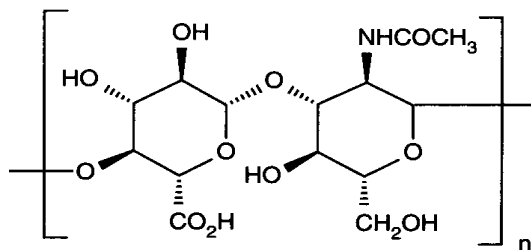
---

HAS3v1 .....	91
4.5.3.4 Untersuchung der FAK nachgeschalteten Signaltransduktionen .....	93
4.6 RELEVANZ DER ERGEBNISSE AN KULTIVIERTEN VSMC FÜR DIE HUMANE ATHEROSKLEROSE .....	98
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>100</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>9 VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>117</b>
9.1 TAGUNGEN UND KONGRESSE.....	117
9.2 VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN .....	119
<b>10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>120</b>
<b>11 DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>12 LEBENS LAUF .....</b>	<b>122</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hyaluronsäuresynthese

Hyaluronsäure (HA) liegt typischerweise als hochmolekulares Polymer in der extrazellulären Matrix (EZM) vor. Sie setzt sich aus wiederholenden Disaccharideinheiten, D-Glukuronsäure und N-Acetyl-Glykosamin, die in  $\beta$ -Stellung 1,3 bzw. 1,4 miteinander verknüpft sind (Abbildung 1-1), zusammen<sup>1</sup>. Unter physiologischen Bedingungen besteht HA aus 2000 bis 25000 Disaccharideinheiten mit einem Molekulargewicht von  $10^6$  -  $10^7$  Da und einer Polymerlänge von 2- 25  $\mu\text{m}^2$ .



**Abbildung 1-1** Hyaluronsäurestruktur, bestehend aus wiederholenden Disaccharideinheiten: D-Glukuronsäure  $\beta$ -1,3-N-Acetyl-Glykosamin.

Im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Heparansulfat, Keratansulfat und Heparin, die alle sulfatiert vorliegen, wird HA nicht im Golgi-Apparat oder endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, sondern an der Zytoplasmamembran von drei unterschiedlichen membranständigen Synthasen – Hyaluronsäuresynthasen 1-3 (HAS1-3). Von der HAS3 gibt es zwei Transkriptionsvarianten, die für zwei unterschiedliche Isoformen kodieren – HAS3v1 und HAS3v2. HAS3v1 besteht aus 1659 Basenpaaren und HAS3v2, die kürzere Isoform, aus 846 Basenpaaren<sup>3</sup>. Über Regulationen und Funktionen von HAS3v2 ist nichts bekannt. Auch weiß man

nicht, ob HAS3v2 überhaupt HA synthetisieren kann, da in dieser Isoform das postulierte katalytische Zentrum stark verkürzt ist<sup>4,5</sup>.

UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Acetyl-D-Glykosamin werden durch eine Glykosyltransferasefunktion der Synthasen alternierend miteinander verknüpft. Die wachsende Polysaccharidkette wird durch die Plasmamembran, möglicherweise unter Einbeziehung eines ABC-Transporters, in den extrazellulären Raum extrudiert<sup>6,7</sup>. Die HAS-Isoformen weisen unterschiedliche enzymatische Aktivität und Funktion auf<sup>5</sup>. Dieses wird zum einen in ihrer Regulierbarkeit und zum anderen in der Hyaluronsäurekettenlänge, die von den HA-Isoformen synthetisiert werden, deutlich. In Fibroblasten wird HA mit einer durchschnittlichen Größe von  $2 \times 10^5$  bis  $\sim 2 \times 10^6$  Da von HAS1,  $2 \times 10^6$  Da von HAS2 und  $1 \times 10^5$  bis  $\sim 1 \times 10^6$  Da von HAS3 synthetisiert<sup>8,9</sup>. Die endogen synthetisierte HA wird als hochmolekulare HA bezeichnet. Ob diese Größenverteilung auch für andere Zellarten gilt, ist noch nicht aufgeklärt.

Der Katabolismus hochmolekularer zu niedermolekularer HA bis hin zu Oligomeren erfolgt über eine Reihe aufeinander folgender Enzymreaktionen. Diese Reaktionen werden überwiegend von zwei HA abbauenden Enzymen, der Hyaluronidase 1 (Hyal1) und Hyaluronidase 2 (Hyal2), katalysiert. Extrazelluläre hochmolekulare HA bindet sich über eine Interaktion zwischen CD44 Rezeptor<sup>10</sup> und Hyal2<sup>11</sup> an die Zelloberfläche. Es ist auch denkbar, dass an diesem Prozess noch andere Hyaluronsäurerezeptoren beteiligt sind. Die Hyal2 katalysiert die initiale Spaltung in niedermolekulare HA mit einer Produktgröße von 20 kDa bestehend aus ca. 100 Saccharideinheiten<sup>12,13</sup>. Diese Fragmente werden dann in Lysosomen durch die Hyal1 weiter zu Tetrasacchariden abgebaut. Solche HA-Fragmente, wenn sie in einer *in vitro* Kultur eingesetzt werden, induzieren Hitzeschockproteine und unterdrücken Apoptose<sup>14</sup>. Es ist noch nicht bekannt, ob die intrazellulär gebildeten HA-Fragmente ähnliche biologische Effekte ausüben. Auch ist es unklar, wann der Abbau der HA vom extrazellulären Prozess zum endosomalen oder lysosomalen Prozess wechselt und wodurch er initiiert wird. Man weiß aber, dass fast alle pathophysiologischen Vorgänge, welche die Hyaluronsäuresynthese steigern, auch mit einer Aktivierung der Hyaluronidasen

verbunden sind.

Die Funktion hochmolekularer bzw. niedermolekularer Hyaluronsäure wird derzeit kontrovers diskutiert. Sicher ist, dass Zellen, die proliferieren und migrieren, eine hyaluronsäurereiche perizelluläre Matrix bilden<sup>15-17</sup>. Man weiß auch, dass Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB hochmolekulare HA und perizelluläre HA-Mäntel induzieren und Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aktivieren<sup>18</sup>. Daraus könnte man schließen, dass hochmolekulare HA diese biologischen Prozesse unterstützt. Andererseits gibt es Studien, die zeigen, dass exogen zugefügte niedermolekulare HA Wachstum, Wanderung, Angiogenese und Inflammation von diversen Zellarten unterstützt<sup>19,20</sup>, während hochmolekulare HA oben genannte Prozesse aufhebt<sup>21</sup>. Hieraus wird deutlich, dass neben der HA-Kettenlänge auch der HA-Ursprung und der Zelltyp Auswirkungen auf die Funktionen haben.

## 1.2 Regulation der HAS-Isoformen

Die Expression der Hyaluronsäuresynthasen wird durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen<sup>22</sup>, aber auch durch mechanische Belastungen, wie Scherstress<sup>23</sup>, reguliert. Jedoch ist es nicht möglich, den einzelnen HAS-Isoformen spezifische Modulatoren oder Regulatoren zuzuordnen, die ausschließlich nur eine Isoform regulieren. Vielmehr ist die Regulation der HA-Synthasen, spezie- und zelltypspezifisch. In venösen SMC induzieren Prostaglandine über eine Aktivierung der G<sub>s</sub>-gekoppelten Prostaglandinrezeptoren IP und EP<sub>2</sub> die Expression von HAS1 und -2. Des Weiteren konnte eine Heraufregulation der Has2 Expression in Antwort auf PDGF-BB und Thrombin via PAR1-Rezeptoraktivierung an venösen SMC nachgewiesen werden. HAS3 wurde an diesem Zelltyp nur durch IL-1 $\beta$  induziert<sup>22</sup>.

## 1.3 Funktionen der HA

HA ist ein ubiquitäres, großes, unverzweigtes und unsulfatiertes Kohlenhydrat der extrazellulären Matrix (EZM), das 1934 zum ersten Mal aus dem Glaskörper



des Kuhauges und später aus der Nabelschnur isoliert wurde<sup>24</sup>. Herzklappen, Haut, Knorpel, Glaskörper des Auges, Nabelschnur und die Synovialflüssigkeit sind reich an Hyaluronsäure<sup>25</sup>. Eine bedeutsame Eigenschaft der HA ist große Mengen Wasser zu binden (1000- fache des eigenen Gewichtes). Daher besitzt HA eine biologische Funktion als Schmiermittel in den Gelenken, reduziert Reibung bei Bewegungsabläufen und stellt Elastizität unter statischen Bedingungen her<sup>26</sup>. In der Nabelschnurarterie sind 40 % der Glykosaminoglykanfraktion HA, während HA in erwachsenen Arterien nur noch 4-6 % der Glykosaminoglykane ausmacht. Durch den hohen Hyaluronsäuregehalt in fetalen Gefäßen entsteht eine lockere, hydratisierte EZM, die eine hohe Flexibilität zu Eigen ist und somit unterschiedlichen mechanischen Belastungen Stand hält. Diese HA-reiche Matrix unterstützt auch die Bewegung/ Migration von Gefäßzellen in die jeweiligen Zellschichten (Intima, Media, Adventitia) eines Gefäßes während der Entwicklung<sup>27</sup>. Auch ist eine hohe Hyaluronsäuremenge für die Schließung des *Ductus Arteriosus* während der Geburt unerlässlich<sup>28</sup>.

Einen wichtigen Einblick über die unterschiedliche Funktion der HA-Synthasen gibt eine Studie über die Rolle der HA während der Embryogenese. HA wird während der Embryogenese in großer Menge produziert und spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems. Ein genetischer *knock out* der HAS2 ist embryonal letal, da es zu einer Fehlentwicklung des Herzens und des Gefäßsystems kommt. Ein *knock out* von HAS1 oder HAS3 wirkt sich jedoch nicht auf die embryonale Entwicklung des Herzkreislaufsystems aus<sup>29</sup>.

HAS-1 besitzt die schwächste katalytische Aktivität. HAS2 ist katalytisch aktiver als HAS1 und könnte daher die Synthase sein, die für die gesteigerte HA-Synthese in der Wundheilung und anderen Verletzungen verantwortlich ist. HAS3 synthetisiert die kleinsten HA-Polymere und ist die aktivste Synthase, die möglicherweise auch am stärksten in Signaltransduktionen involviert ist<sup>30</sup>.

Durch pathophysiologische Veränderungen der Gefäßstruktur, wie es zum Beispiel bei atherosklerotischen und restenotischen Läsionen der Fall ist, kommt es zu einer starken Akkumulation der HA in der EZM. Die HA-

Akkumulation ist an Schlüsselprozessen während der Bildung von atherosklerotischen Plaques, wie Volumenexpansion, Entzündungsreaktionen, der phenotypischen Kontrolle von glatten Gefäßmuskelzellen und Matrixremodelling, maßgeblich beteiligt.

Hohe HA-Plasmaspiegel sind mit vielen humanen Krebserkrankungen assoziiert<sup>31-34</sup>. Histologische Studien haben gezeigt, dass fast alle Tumore von einer HA-reichen EZM umgeben sind und eine hohe CD44-Expression aufweisen<sup>35-38</sup>. In diesem Bereich unterstützt HA eine Vielzahl an tumorspezifischen Funktionen, wie Angiogenese, adhäsionsunabhängiges Wachstum, Proliferation, Invasion, Zytostatikaresistenz und Abnahme der Apoptose<sup>39-41</sup>. Es ist belegt, dass es unter Inhibition der Hyaluronsäureproduktion oder einer Blockade des Hyaluronsäurerezeptors CD44 zu einer Reduktion des invasiven Wachstums von Tumorzellen kommt<sup>7,58</sup>. Dies belegt zum einem die Bedeutung der Hyaluronsäure für den malignen Phänotyp und zum anderen die gezielte Beeinflussbarkeit dieses Systems.

Schlussfolgernd sind es gerade die hyaluronsäureabhängigen Prozesse, die während der Embryogenese für Wachstum und Wanderung der Zellen essentiell sind, die beim Erwachsenen pathophysiologische Antworten hervorrufen können.

Ein weiteres Gebiet, in dem HA eine große Rolle spielt, ist die Hautalterung und die damit verbundenen Dehydratations- und Degenerationsprozesse in den verschiedenen Schichten der Haut<sup>42</sup>. Auch bei Gelenkdegeneration ist die Verarmung der *Synovia* an HA ein pathophysiologischer Schlüsselprozess<sup>43</sup>. Die Hyaluronsäure fungiert hier als eine Art „Gelenkschmiere“, so dass die Abnahme von HA im Alter die Entwicklung einer Osteoarthritis unterstützt. Weiterhin kommt es zu einer Erosion des ebenfalls aus HA bestehenden Knorpels, darstellt. Im weiteren Verlauf bildet sich der knorpelnahen Knochen um, einhergehend mit Schmerzen, Schwellungen, Bewegungseinschränkungen und Deformierung der Gelenke<sup>44,45</sup>.

Ein vermehrter Abbau hochmolekularer HA durch Hyaluronidasen führt zur Generierung proinflammatorischer HA-Fragmente. Diese hochaktiven

Oligosaccharide lösen neben einer Arthritis eine zusätzliche Exazerbation des Grundgeschehens aus<sup>44,45</sup>.

## 1.4 Hyaladhärine und Hyaluronsäurerezeptoren

Hyaladhärine und HA-Rezeptoren sind in der Lage HA über eine HA-Bindedomäne kovalent zu binden. Einige HA-Rezeptoren sind mit der Zellmembran assoziiert, wie die Rezeptoren CD44 und RHAMM (*receptor for hyaluronan mediated motility*)<sup>46</sup>. Andere Bindungspartner sind in der extrazellulären Matrix, wie die Proteoglykane, Aggrecan (Knorpel) und Versikan (Blutgefäße), TSG-6 (Tumor Nekrose Faktor stimulierendes Gen-6) und Ial (Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor) zu finden<sup>47-49</sup>. TSG-6, Versikan und Ial dienen als Adaptorproteine, welche die einzelnen extrudierten HA-Stränge in der EZM miteinander verknüpfen. Das Proteoglykan Versikan interagiert über ein Bindeprotein mit Hyaluronsäuresträngen und ermöglicht zusammen mit anderen Hyaladhärienen, die Ausbildung großer perizellulärer und extrazellulärer Netzwerke<sup>50</sup>.

### 1.4.1 Hyaluronsäurerezeptor CD44

CD44 ist ein transmembranständiges Typ 1 Glykoprotein und kommt in einer Vielzahl von Isoformen vor, von denen einige gewebe- und zellspezifisch exprimiert werden. Die häufigste Isoform besteht aus einem 37 kDa großen Kernprotein, das nachträglich extensiv N- und O-glykosiliert wird und so schließlich ein Molekulargewicht von 85-95 kDa erreicht. Diese weit verbreitete Form wird CD44s (s = Standard) genannt und enthält keine variablen Exons. Die meisten Zellen, einschließlich Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Neutrophile, Makrophagen und Lymphozyten exprimieren den CD44-Rezeptor. Die HA-CD44 Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen, Entzündungsreaktionen, T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung, sowie in der Tumorgenese<sup>51,52</sup>. Obwohl an den CD44 Rezeptor noch Heparin-Binding-Growth-Factor, Zytokine und andere EZM-Moleküle, wie Osteopontin und Fibronectin binden können, sind die meisten CD44 vermittelten Funktionen HA

abhängig<sup>53</sup>. Die Bindung von HA an CD44 induziert in Endothelzellen und bösartigen Tumorzellen eine extrazelluläre Klusterung und Aktivierung des Rezeptors. Dies führt zu einer Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von CD44 mit den Tyrosinkinase c-Src und FAK (Fokale-Adhäsions-Kinase), sowie Rho und Rac<sup>54-56</sup>. Dadurch wird eine Assoziation von CD44 mit dem Aktinzytoskelett begünstigt sowie die Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Signalpartnern, wie ERK und AKT eingeleitet. In transformierten Zellen aktiviert die Bindung von HA an CD44 sogar eine direkte Phosphorylierung der MAP-Kinasen und AKT<sup>57,58</sup>. Diese Phosphorylierungen von ERK und AKT induzieren wiederum Transkriptionsfaktoren, die Migrations- und Proliferations-Prozesse einleiten.

#### **1.4.2 Receptor of Hyaluronan mediated motility (RHAMM)**

RHAMM ist sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten, wie dem Zytosol, Zytoskelett, Mitochondrien und sogar im Zellkern lokalisiert. RHAMM kommt in mindestens sechs Spleißvarianten vor, von denen in nicht transformiertem Gewebe ein 70 kDa großes Protein (RHAMM1) vorherrschend ist, während in transformierten Geweben die 73 kDa Variante RHAMM1v4 in den Vordergrund tritt<sup>59</sup>. Eine Interaktion von HA mit Zelloberflächen-assoziiertem RHAMM kann eine Interaktion mit anderen integralen Membranrezeptoren, wie dem PDGF-Rezeptor, induzieren. Nachgeschaltet moduliert diese Interaktion Phosphorylierungsreaktionen an den Tyrosinkinase c-Src, FAK<sup>59</sup> und der Serin/Threonin-Kinase ERK1/2. Zusätzlich erfolgt eine Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Paxillin, einem Protein der fokalen Adhäsionen<sup>60</sup>. Durch den Umsatz der fokalen Adhäsionen reguliert RHAMM die Zellmotilität. Dies erklärt möglicherweise seine transformierende Wirkung bei Überexpression<sup>59,61</sup>. Obwohl die Funktion des intrazellulären RHAMM-Proteins noch nicht hinreichend aufgeklärt ist, zeigten Untersuchungen des Aktinzytoskeletts und der Mikrotubuli der mitotischen Spindel eine Kollokalisierung mit RHAMM, was für eine Funktion von RHAMM bei dem Aufbau des Zytoskeletts spricht<sup>46,62</sup>.

Interaktionen von CD44 und RHAMM mit HA aktivieren eine Vielzahl an Reaktionen, an denen Tyrosinkinasen, Proteinkinase C, FAK, Phosphatidylinositol 3-Kinase, MAPK und RAS, sowie Strukturen des Zytoskeletts<sup>46,54,63,64</sup> beteiligt sind. Obwohl es klar ist, dass CD44 und RHAMM unabhängig voneinander an Migrations- und Proliferationsprozessen beteiligt sind, steht die Untersuchung des jeweiligen Anteils an diesen Prozessen für einzelne Zelltypen und den jeweiligen pathophysiologischen Kontext noch aus.

### 1.4.3 Toll-Ähnliche-Rezeptoren 2 und 4

Die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) 2 und TLR 4 sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die unter anderem durch Bakterientoxine aktiviert werden können. Interessanterweise aktivieren HA-Oligomere TLR 2 und -4 auf dendritischen Zellen<sup>65</sup>, Makrophagen<sup>66</sup> und Endothelzellen<sup>67</sup>. TLR 2 und -4 können daher auch als HA-Rezeptoren betrachtet werden, welche die inflammatorische Antwort von HA-Fragmenten vermitteln. In einem Modell der akuten Lungenentzündung induzieren HA-Fragmente Chemokien Expression (MIP2) in Makrophagen über die Aktivierung von TLR 2 und -4 und rekrutieren so neutrophile Granulozyten zum Ort der Verletzung<sup>66</sup>.

## 1.5 Atherosklerose

Eine gesunde Arterie besteht aus drei distinkt voneinander getrennten Zellschichten, der Intima, Media und Adventitia. Diese Schichten werden von Zellen gebildet, die in eine Matrix, der extrazellulären Matrix (EZM) eingebettet sind. Sowohl der Zelltyp, als auch die Zusammensetzungen der EZM unterscheiden sich in den einzelnen Zellschichten.

Die Intima bildet die innerste dem Gefäßlumen zugewandte Schicht und besteht aus Endothelzellen, die auf einer sogenannten Basalmembran liegen. Die *Lamina Elastika Interna* grenzt die Intima von der Media ab. Die Media besteht aus ruhenden, kontraktile, konzentrisch angeordneten glatten Muskelzellen (VSMC), die von einer dünnen Schicht EZM umgeben sind. Die Adventitia, die

äußerste Gefäßschicht, setzt sich aus Fibroblasten und einer dicht angeordneten EZM zusammen. Während der Atherosklerose und Restenose verändert sich strukturell der Gefäßwandaufbau.

Diverse Faktoren wie z.B. Rauchen, Übergewicht, körperliche Inaktivität, Hyperlipoproteinämie, Typ II Diabetes mellitus und Immunreaktionen des Körpers auf Infektionen (z.B. Chlamydien)<sup>68</sup> führen zu einer Schädigung des Endothels, verbunden mit einer Einschränkung der NO-vermittelten Vasodilatation<sup>69</sup>. Dadurch nimmt die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere im Plasma zirkulierende Stoffe zu. Dies führt zu einer Aktivierung des Endothels, dass folglich vermehrt Adhäsionsmoleküle (P-Selektin, *Vascular cell adhesion molecule-1* VCAM-1) auf der Zelloberfläche exprimiert. Monozyten und T-Lymphozyten interagieren mit diesen Adhäsionsmolekülen auf dem entzündlichen Endothel (endotheliale Dysfunktion)<sup>70</sup>.

Im weiteren Verlauf dringen vor allem Monozyten und in geringerem Ausmaß T-Lymphozyten in den subintimalen Raum ein. Monozyten differenzieren zu Makrophagen und nehmen oxidiertes *low density lipoprotein* (LDL) auf. Es entstehen so genannte Schaumzellen, die charakteristischen Zellen der atherosklerotischen Plaque. Schaumzellen und die eingewanderten T-Lymphozyten sezernieren vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wie Tumor-Neurose-Faktor-alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF-BB)<sup>69,71-74</sup>. Wird die IL-1 $\beta$  vermittelte Signaltransduktion in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen durch genetische Manipulation gehemmt, sinken gleichzeitig das inflammatorische Geschehen und das Ausmaß der Atherosklerose<sup>75</sup>. Durch Entzündungsmechanismen werden glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) in der Media aktiviert. Die VSMC transformieren von einem physiologischen kontraktiven, ruhenden in einen synthetischen Phänotyp<sup>76</sup>. Diese synthetischen VSMC wandern in die Intima ein, proliferieren dort und bilden vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM). Die Migration, Proliferation und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen werden mit einer Akkumulation von HA und Hyaladhärrinen (Versikan, CD44, TSG6) assoziiert und stellen essentielle Schritte in der Pathophysiologie der Atherosklerose dar.

Glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen reagieren nicht nur auf inflammatorische Botenstoffe. Sie sind auch in der Lage, diese selber zu bilden und unterstützen somit zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den entzündlichen Prozess der Plaquentstehung.

Eine fortgeschrittene atherosklerotische Läsion ist typischerweise durch eine ausgeprägte Neointimahyperplasie charakterisiert, die aus VSMC und EZM Molekülen besteht. Apoptose von Zellen, zunehmende Akkumulation von Makrophagen und Schaumzellen bilden im Inneren der Neointima einen nekrotischen Kern (Atherom). Zum Gefäßlumen hin wird die atherosklerotische Plaque durch eine fibromuskuläre Kappe, bestehend aus VSMC und Matrixproteinen, getrennt<sup>74</sup>.

Die Entstehung einer atherosklerotischen Plaque geht nicht zwangsläufig mit einer Verengung des Gefäßlumens einher. Durch eine lokale Dilatation und ein *Remodelling* der Gefäßwand nach außen kann eine Gefäßwandverdickung kompensiert werden. Solche Atherome bleiben meistens klinisch und diagnostisch unauffällig, da sie weder zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff distal gelegener Gewebsareale führen, noch im Angiogramm erkannt werden können<sup>77</sup>. Auch gibt die morphologische Plaquegröße, bzw. die Einengung des Gefäßes durch die Plaque, keine Auskunft über die Stabilität des Atheroms. Es scheint sogar, dass das Ausmaß der Entzündungsreaktionen und die Zusammensetzung der EZM mehr als der Stenosegrad, die Gefahr der Plaqueruptur, der Thrombose und die daraus resultierende Ischämie widerspiegeln<sup>71</sup>. Die EZM nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose ein, da sie die Wirkung von Wachstumsfaktoren, die Lipidakkumulation, Calcifizierung, mechanischen Eigenschaften, sowie thromboembolische Ereignisse, Invasion und Retention von Entzündungszellen und den Phänotyp der VSMC beeinflusst<sup>78</sup>.

Instabile Atherome zeichnen sich durch eine geringe Anzahl an VSMC aber zahlreiche Makrophagen in der fibrösen Kappe aus. Charakteristisch für diese entzündliche Region ist die Produktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die eine Degradation von EZM-Molekülen (z.B. Kollagen, Elastin, Fibronectin und Proteoglykanen) verursachen und

dadurch die fibröse Kappe destabilisieren<sup>79-81</sup>.

Akute koronare Syndrome entstehen durch eine Ruptur der fibrösen Kappe. Dadurch gelangt das Blut in Kontakt mit Kollagen und dem thrombogenen Material des Lipidkerns. Dieser Kontakt initiiert eine Thrombusbildung, die zu einem plötzlichen und möglicherweise totalen Verschluss des betroffenen Gefäßes führen kann<sup>71</sup>. Klinisch manifestiert sich die Plaqueruptur mit Thrombusbildung als instabile *Angina pectoris* oder akuter Myokardinfarkt bzw. Schlaganfall.

Werden Gefäßstenosen rechtzeitig erkannt, können sie mit einer Angioplastie beseitigt werden. Jedoch kommt es durch diese Ballon-Katheterisierung häufig zu einer Verletzung des betroffenen Gefäßes und anschließend erneut zur Akkumulation von VSMC und EZM, welche die Bildung einer Neointima induzieren und den Wiederverschluss des Gefäßes bewirken können<sup>82,83</sup>. Da die EZM mehr als 50 % des Volumens der Neointima einnimmt, ist die Zusammensetzung und Funktion der EZM-Moleküle von großem Interesse. Die EZM der Neointima besteht aus unterschiedlichen Konzentrationen an Proteoglykanen (Versikan, Biglykan, Decorin), HA und Kollagenen (Typ I und III).

Frühe Restenosen nach Stent-Implantation zeigten eine Neointima, die reich an Versikan, HA, VSMC und Collagen TypIII war<sup>83</sup>. In der gleichen Studie wurde eine Kollokalisierung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 mit neointimalen Makrophagen in einer HA-reichen Neointima gezeigt. Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor, der die Hyaluronsäureketten zu stabilen Strukturen verbindet und eine Makrophagenadhäsion erleichtert<sup>84</sup>, kollokalisierte mit HA. Es ist auch bekannt, dass die gesteigerte Proliferation und Migration mit einer vermehrten HA-Synthese assoziiert ist. CD44 wird mit der Rekrutierung von Entzündungszellen und der Aktivierung von VSMC<sup>19</sup> assoziiert. Hingegen zeigten stabilere Plaques einen geringeren Anteil an VSMC, Versikan und HA in der Neointima, dafür aber Akkumulation von Kollagen Typ I und Decorin<sup>83</sup>.



## 1.6 Hyaluronsäure in der Atherosklerose

Atherosklerotische und restenotische Läsionen sind charakterisiert durch Veränderungen der HA-Menge und Verteilung. HA akkumuliert sowohl in frühen als auch in späten Läsionen. In frühen Läsionen sind besonders proliferierende und migrierende VSMC in Kontakt mit HA. Diese HA-Akkumulation wird begleitet durch eine Induktion von HA-bindenden Molekülen, wie Versikan, TSG6, CD44 und RHAMM<sup>50</sup>. Mitogene stimulieren an VSMC die Expression der HAS-Isoenzyme und induzieren so die Bildung von großen perizellulären HA-Mänteln. Werden die HA-bindenden Rezeptoren CD44 und RHAMM blockiert, so nimmt auch die Proliferation, Migration von VSMC und die Neointima-Hyperplasie ab<sup>61,85-88</sup>. Dies bedeutet, dass die HA nicht nur mechanisch, sondern auch durch Aktivierung von intrazellulärer Signaltransduktion via CD44 und RHAMM kausal an der phänotypischen Aktivierung der VSMC beteiligt ist.

Es konnte auch gezeigt werden, dass eine HA- und Versikan-reiche EZM charakteristisch für erodierte Plaques ist. HA könnte somit das Risiko für Plaquerupturen fördern und das Thromboserisiko steigern<sup>82,83</sup>.

Darüber hinaus beeinflusst HA nicht nur den Phänotyp von VSMC, sondern auch von anderen Zellen, die in der Atherogenese eine wichtige Rolle spielen, nämlich Endothelzellen und Leukozyten.

Die HAS-Isoformen bilden chemisch das gleiche Produkt. Die einzige Modifikation ist das Molekulargewicht, das sich auch wie unter 1.5 beschrieben in Abhängigkeit der HAS-Isoformen unterscheidet. Falls die HAS-Isoformen unterschiedliche Funktionen während der Pathogenese der Atherosklerose haben, könnte das Molekulargewicht eine wichtige Rolle spielen. Alternativ könnte die differentielle Regulation zu einer zeitlich oder örtlich differentiellen HA-Synthese und nachfolgenden Funktionen führen. Zusätzlich ist denkbar, dass die unterschiedliche Regulation der HAS-Isoformen mit einer differentiellen Regulation von Hyaladhäringen gekoppelt ist, wodurch die perizelluläre Matrix und Signaltransduktion verändert würde.

In *vitro* Untersuchungen zur HAS2 zeigten, dass die Hemmung der HAS2 eine Abnahme der Zellzyklusprogression zur Folge hatte<sup>18</sup>. Eine Überexpression von

HAS2 in ApoE defizienten Mäusen förderte die Atherosklerose. Diese Studien unterstützen die Theorie, dass der HAS2 proproliferative Eigenschaften zu Eigen sind. Andererseits gibt es auch einige Untersuchungen, die zeigten, dass die Überexpression der HAS-Isoenzyme sogar die Proliferation und Migration hemmen<sup>89</sup>.

Solche Unterschiede sind möglicherweise auch auf HA-Konzentration und Zelldichte zurückzuführen. Bei einer geringen Zelldichte (ähnlich, wie in instabilen atherosklerotischen Läsionen), ist die HA-Sekretion essentiell für das Abrunden und Ablösen der Zellen während der Mitose<sup>90</sup>. Hingegen kann bei einer hohen Zelldichte die Akkumulation von HA zu einer erhöhten Viskosität der EZM führen, die wiederum starre Strukturen ausbildet mit geringer Konduktion für Zellbewegung und Zellteilung<sup>91,92</sup>. Andererseits weiß man auch aus Untersuchungen an Krebszelllinien, dass der HA-Mantel eine Kontaktinhibition zwischen den Zellen hemmt und so Proliferation und Migration induziert<sup>93</sup>.

### **1.6.1 HA und vaskuläre Entzündung**

Die Hyaluronsäure wird auch in atherosklerotischen Regionen detektiert, die Makrophagen und Lymphozyten enthalten<sup>27,94</sup>. Leukozyten aus dem Blut binden über ihren CD44-Rezeptor<sup>95,96</sup> an HA, die über die Rezeptoren CD44<sup>97</sup> und RHAMM<sup>60</sup> mit dem Endothel verknüpft ist. Dieser Befund spiegelt die Bedeutung der HA und der HA-Rezeptoren in der initialen inflammatorischen Phase der Plaquentstehung wieder. In diesem Zusammenhang zeigte eine Studie von Wilkinson 2006, dass die Überexpression der HAS-Isoformen an VSMC, isoliert aus Aorten von Ratten, einen unterschiedlichen Einfluss auf die Monozyten/ Makrophagenadhäsion hatten<sup>82,83</sup>. HAS1 und HAS3 produzierten einen ähnlich großen perizellulären HA-Mantel, aber nur HAS1 transfizierte Zellen führten zu einer Bindung von Monozyten an ihre HA-Matrix. Dies zeigt, wie unterschiedlich die durch HAS1 und HAS3 synthetisierte HA in ihren Eigenschaften als Bindungspartner für Leukozyten sein muss. Eine Kollokalisierung von Makrophagen und VSMC in humanen atherosklerotischen Läsionen wurde von Sussmann *et al.* gezeigt<sup>18</sup>. Typische von Makrophagen

sezernierten Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , induzieren in anderen Zelltypen eine Hyaluronsäureakkumulation<sup>22</sup>. Spekulativ, aber interessant wäre es, einen Teufelskreis zwischen Monozyten/ Makrophagen und der Hyaluronsäure zu postulieren. Eine Verletzung des Endothels führt zur vermehrten HA-Synthese, die mit einer verstärkten Monozytenrekrutierung aus dem Blut einhergeht. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen und sezernieren Zytokine, die wiederum VSMC zu einer gesteigerten HA-Produktion anregen.

Zusätzlich induziert die Bindung von HA an CD44 die Sezernierung von Zytokinen und die Expression von *vascular cell adhesion molecule-1* durch Entzündungszellen und VSMC<sup>19</sup>. Die Bedeutung der HA-CD44-Interaktion für die Pathogenese der Atherosklerose wird durch die Hemmung bzw. Blockierung des CD44-Rezeptors, die zu einer 50-70 % Reduktion der atherosklerotischen Läsion führte<sup>19</sup>, verdeutlicht.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Atherosklerose und ihre Komplikationen sind die häufigsten Todesursachen in Europa, USA und Japan<sup>98</sup>. Ursächlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist eine Funktionsstörung des Endothels, die zu thrombotischen Verschlüssen arterieller Gefäße führen kann. Atherosklerose zählt heute zu den chronischen entzündlichen Erkrankungen. Unter dem Einfluss vermehrt ausgeschütteter Zytokine und Wachstumsfaktoren dedifferenzieren glatte Muskelzellen in frühen Stadien der Atherosklerose und entwickeln ausgeprägte proliferative, migratorische und sekretorische Aktivität. Hyaluronsäure (HA) ist ein Glukosaminoglykan (GAG) der extrazellulären Matrix (EZM), das in atherosklerotischen Läsionen und Restenosen akkumuliert. HA wird von drei verschiedenen HA-Synthase (HAS) Isoformen (HAS-1, -2, -3) synthetisiert und in den Extrazellulärraum extrudiert.

Die Bedeutung der HA hinsichtlich Plaqueprogression und -stabilität, Entzündung sowie die Regulation der HAS-Isoformen ist für humane glatte Muskelzellen noch nicht hinreichend untersucht worden. Insbesondere ist nicht bekannt, ob die HAS-Isoformen unterschiedliche Funktion haben.

Daher standen im Fokus dieser Arbeit Untersuchungen zum Hyaluronsäuresystem an human glatten Gefäßmuskelzellen hinsichtlich:

- Zytokin abhängiger Regulation der HA
- Identifizierung der für die Zytokin vermittelte HA-Induktion verantwortlichen HAS-Isoformen
- Charakterisierung der HAS3 abhängigen biologischen Funktionen der HA in humanen glatten Gefäßmuskelzellen
- Molekularer Mechanismen der HAS3 abhängigen Modulation des zellulären Phänotyps
- Untersuchung der Assoziation von NFκB und HA an humanen atherosklerotischen Läsionen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

*Tabelle 1 Substanzen und Kits*

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ )	Biomol
Tumor Nekrosefaktor Alpha(TNF $\alpha$ )	Biomol
Interleukin 10 (IL10)	Biomol
Inerleukin 6 (IL6)	Biomol
PDGF-BB	Sigma
Lipopolisaccharid, <i>E.Coli</i> (LPS)	Calbiochem
Iloprost	Schering AG
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Axxora, Grünberg
Bay11-7082	Biochemicals
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Aktinomycin D	Sigma-Aldrich
Streptomyces Hyaluronidase	MP Biomedicals
Staurosporin	Sigma-Aldrich
Agarose	Sigma-Aldrich

Propidiumiodid	Fluka
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Anti-human IL-1 $\beta$ (MAB201) Ig class: Mouse IgG	R&D Systems
Anti-human TNF $\alpha$	R&D Systems
mIgG	R&D System
4-Methyl-Umbelliferon	Sigma-Aldrich
[ $^3$ H]-Glucosaminhydrochlorid	Hartmann Analytics
Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung 40 %	BioRad
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas
Pronase	Sigma Aldrich
Protaminsulfat	Sigma Aldrich
Rosswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)	Sigma Aldrich
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell
DMEM	Invitrogen
Sephacryl S-1000	GE Healthcare Europe, München
Sephadex G50	Sigma Aldrich
Tri-Reagent®	Sigma Aldrich
Hoechst 33342	VWR
[ $^3$ H]-Thymidin	Hartmann Analytics
Calcein	Sigma-Aldrich
Entelan <sup>®</sup> (Eindeckmedium)	Merck

TRIZOL <sup>®</sup> Reagenz	Gibco-Invitrogen
Hyaluronic Acid (HA) Test Kit	Corgenix
QIAGEN <sup>®</sup> oneStep RT-PCR Kit	Qiagen
SuperScript <sup>™</sup> III First Stranded c-DNA Synthese Kit	Gibco-Invitrogen
Bradford Reagenz	Biorad
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Mission shRNA	Sigma-Aldrich
RNAiFect Transfektionsreagenz	Qiagen
SYBER Green <sup>®</sup> PCR Master Mix	Applied biosystem
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich
Pronase	Sigma-Aldrich
ECL Advanced Blocking Reagenz	GE-Healthcare Europe
ECL plus Detection Reagenz	GE-Healthcare Europe
Vitrogen 100	Collagen Corp
Vectashield <sup>®</sup> Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories

## 2.2 Antikörper

*Tabelle 2 primäre Antikörper*

<b>Erst-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Rabbit anti-Akt	Cell Signaling	1:500
Rabbit anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling	1:500
Rabbit anti-FAK (A-17)	Santa Cruz,	1:200

Rabbit anti-phospho FAK (Y397)	Santa Cruz,	1:500
Hyaluronsäurebindeprotein, biotinyliert	Seikagaku	40 µg/ml
Rabbit anti-Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/204)	Cell Signaling	1:500
Rabbit anti-p44/42 Map Kinase	Cell Signaling	1:500
Mouse Anti-Beta Tubulin	SantaCruz	1:5000
Mouse anti-CD44	R&D System,	1:500
Mouse anti-Paxillin	BD Transducton Lab	1:500
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich	1:1000

Tabelle 3 sekundär Antikörper

<b>Zweit-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
goat-anti-mouse IgG, Cy3-konjugiert	Sigma Aldrich	1:600
goat-anti-mouse IgG, FITC- konjugiert	Santa Cruz	1:400
goat-anti-rabbit IgG, Cy3-konjugiert	Sigma Aldrich	1:600
goat-anti-rabbit IgG, FITC- konjugiert	Jackson Immuno- Research	1:500
Goat-anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	1:3000
Goat-anti-mouse-IgG-HRP	Santa Cruz	1:5000



### 2.3 Puffer und Lösungen für Immunoblots

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
10 x Laufpuffer	250 mM Tris (Trishydromethylaminomethan) 1,9 mM Glycin 0,1 % SDS
1 x Lysispuffer	1 % SDS 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 10 mM Tris pH 7,4
2 x Auftragspuffer	125 mM Tris pH 6,8 4 % SDS 10 % Glycerol 0,006 % Bromophenol Blau 100 mM DTT
Sammelgel (5 %)	0.5 M Tris pH 6,8 25ml 10 % SDS 50 µl dH <sub>2</sub> O 3,895 ml 40% Acrylamid/Bis-acrylamid 375 µl Temed 5 µl APS 10% 50 µl
Trenngel (10%)	3 M Tris pH 8,7 0,975 ml 10% SDS 75 µl dH <sub>2</sub> O 4,545 ml 40% Acrylamid/Bis-acrylamid 1,875 ml Temed 5 µl APS 10% 25 µl
Blockierlösung	2 % (w/v) ECL Advanced Blocking Reagenz in 1 x TBST

1x Transfer-Puffer	1 x Laufpuffer 20 % Methanol 0,01% SDS
10 x TBS	100 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
1 x TBST	1 x TBS 0,1 % Tween 20
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4

## 2.4 Geräte und Material

Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN <sup>R</sup> 3 PowerPac 200+300 Power Supply	BioRad, München
Filmauswertung	GS-800 Calibrated Densitometer QuantityOne <sup>R</sup> Version 4.4.1	Umax System GmbH, Willich BioRad, München
Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus BX 50 bzw. IX50	Olympus, Hamburg

(Kamera & Software)	Colorview II Kamera mit Soft Imaging System-Software	Soft Imaging System, Münster
Konfokales-Mikroskop	Zeiss LSM510	Zeiss, Oberkochen
Protein Transfer (Western Blot)	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	Peqlab, Erlangen
RNA-/ DNA-Messung	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen
PCR-Maschine	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Realtime RT-PCR Gerät	Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Darmstadt
Fluoreszenzimager	Taiphon 8600 Imager	GE Healthcare Europe, München
Szintillationszähler	LS6000IC	BeckmanCoulter, Krefeld
Zentrifugen	Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Chromatographiepumpe	HiLoad P-50	GE Healthcare Europe, München
Fraktionssammler	Frac-100	GE Healthcare Europe, München
Chromatographiesäule	Tricorn 300/10	GE Healthcare Europe, München
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Maidstone, UK
Blot-Membran	PVDF-Membran	BioRad laboratories, Hercules, CA, USA
Migrationsmembran	Polycarbonat-Membran, 10 µm Poren	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA

Migrationskammer	Boyden-Kammer	Neuroprobe, John, MD, USA	Cabin
------------------	---------------	------------------------------	-------

## 2.3 Kultivierung von Zellen

Die Substanzen für die Nährmedien wurden von Gibco Life Technologies und PromoCell bezogen. Die Kulturgefäße, die 60 cm<sup>2</sup> Schalen, sowie die 6-Lochplatten wurden von der Firma Becton-Dickinson bezogen. Das FCS wurde von den Firmen Gibco Life Technologies (Lot-Nummer: 40Q1130K) und BioWhittaker (Lot-Nummer: 14801F) verwendet.

### 2.3.1 Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Humane, glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) von der Firma PromoCell wurden in Smooth Muscle Cell Growth Medium2 mit SupplementMix C-39267, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,5 mM) passagiert. Für die Versuche wurden die Zellen in einer Dichte von 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Versuche wurden in den Passagen 4-10 durchgeführt. Vor den jeweiligen Experimenten wurden die Zellen, soweit nicht anders vermerkt, zweimal mit PBS gewaschen und für 48 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (DMEM/PS) inkubiert. Danach erfolgte Zugabe der verschiedenen Stimuli in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten.

### 2.4.1 Kultivierung der monzytären Zelllinie U937

Die Kultivierung der U937 (1593, ATCC, LGC Promochem, Wesel) erfolgt in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Glutamax Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe), supplementiert mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, bei 37°C unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub>. Vor den Versuchen wurden die Zellen mit PMA (100 nM, 24 h) und LPS (10 µg/ml, 4 h)

differenziert<sup>99,100</sup>.

## 2.5 Präparation und Analyse von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten humanen Zellen erfolgte mittels Tri-Reagents (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Generell wurde bei der Präparation von RNA Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O verwendet. Die Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Tri-Reagent (1 ml/10 cm<sup>2</sup>) lysiert. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben in sterile Eppendorf-Gefäße überführt, mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (12000 x g, RT, Heraeus Biofuge 13). Die Fällung der RNA aus dem Überstand erfolgte mit 500 µl Isopropanol/ml Trizol bei Raumtemperatur für 10 min und anschließender Zentrifugation für 30 min (12000 x g, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Nach zweimaligem Waschen der RNA mit 75 %-igem Ethanol und jeweiliger Zentrifugation (4 °C, 7500 x g, 5 min) wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde anschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und für 5 min bei 65 °C geschüttelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C oder -80 °C.

Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit dem Spectrophotometer Nano Drop<sup>®</sup> ND-100. Der Quotient der Absorptionswerte 260 nm/280 nm gibt den Reinheitsgrad der RNA an. Dieser Wert sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

### 2.5.1 Quantifizierung der mRNA mittels *Real-Time* RT-PCR

Ein Mikrogramm Gesamt-RNA wurde mittels *Superscript<sup>TM</sup> III First-Strand synthesis-Systems* (Invitogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionen der nachfolgenden PCR wurden unter Benutzung des *SYBER Green<sup>®</sup> PCR Master Mix* (Applied Biosystem, Darmstadt) auf einer Opticon 1 Platte (MJ-Research, Waltham, MA, USA) nach Angabe des Herstellers durchgeführt.) Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz

nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Anhand der Schmelzkurve, wird anschließend gezeigt, dass die eingesetzten Primer immer nur ein einziges Produkt amplifizieren und nicht an andere cDNA-Abschnitte gebunden haben. Der Vergleich der relativen Expressionslevel wurde über die  $2^{[-\Delta\Delta C(T)]}$  Methode errechnet.

Tabelle 4 Real-Time Primersequenz

Gene	Primersequenzen
humane HAS1	5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3' 5'-CTGGAGGTGTACTIONTGGTAGC-3'
humane HAS2	5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3' 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
humane HAS3v1	5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3' 5'-CCCACTAATACACTGCACAC-3'
humane Hyal1	5'-CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA-3' 5'-CCCACTGGTCACGTTTCCAGG-3'
humane Hyal2	5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3' 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
humanes Versikan V0	5'-GCACAAAATTTACCCCTGACATT-3' 5'-CTTCTTTAGATTCTGAATCTATTGGATGAC-3'
humanes Versikan V1	5'-CCCAGTGTGGAGGTGGTCTAC-3' 5'-CGCTCAAATCACTCATTTCGACGTT-3'
humanes TSG6	5'-TCATGTCTGTGCTGCTGGATG-3' 5'-GGGCCCTGGCTTCACAA-3'
CD44	5'-GCA GGT ATG GGT TCA TAG-3' 5'-AGC AAT ATG TGT CAT ACT-3'
RHAMM	5'-ACAAGCTAGATATTGCCAGT-3'

	5'-TCAAGAGACTGCTTAAGGCTT-3'
--	-----------------------------

### 2.5.2 Semiquantitative RT-PCR

Die Untersuchungen zur HAS3-Expression erfolgten auch durch semiquantitative RT-PCR mittels Qiagen One-Step RT-PCR-Kit (Qiagen). Bei jeder Reaktion wurde *GAPDH* als interner Standard koamplifiziert<sup>18</sup>.

*Tabelle 5 RT-PCR Ansatz für 200 ng RNA*

5 µl	5-fach Puffer
1 µl	dNTPs
0,75 µl	HAS3 (20 µM) <i>forward</i> Primer
0,75 µl	HAS3 (20µM) <i>reverse</i> Primer
0,6 µl	GAPDH (15 µM) <i>forward</i> Primer
0,6 µl	GAPDH (15 µM) <i>reverse</i> Primer
1,0 µl	Enzymmix
5,3 µl	RNAse freies Wasser
10 µl	RNA (200 ng)

*Tabelle 6 RT-PCR Bedingungen*

1.	30 Minuten	50°C
2.	15 Minuten	95°C
3.	1 Minute	94°C

4. 1 Minute 60°C  
 5. 1 Minute 72°C  
 6. 3.-5. 35x wiederholen  
 7. 10 Minuten 72°C

Lagerung bei 4°C

*Tabelle 7 Primersequenz für die semiquantitative RT-PCR*

humane HAS3v1	5'-CCAGATCCTCAACAAGTACGACTC-3' 5'-CACCACAATGGTTTTTCGG-3'
Größe des PCR-Produkts	694 bp
humane GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTTGAA-3' 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'
Größe des PCR-Produkts	219 bp

### **2.5.3 Densitometrische Auswertung der RT-PCR**

Zunächst wurde zu den 25 µl RT-PCR-Proben 5 µl Blaumarker pipettiert. Anschließend wurden die RT-PCR Proben in 2 %-igen Agarose-Gelen unter Zusatz von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht, so dass die Intensitäten der Banden densitometrisch ausgewertet werden konnten. Dies erfolgte mit einer Geldoc 2000 Apparatur und mit Hilfe des Programms Quantity One Version 4.1.0 /Geldoc (Biorad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus der Intensität des zu untersuchenden Gens und GAPDH als internen Standard gebildet. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Quotient von nicht-stimulierten Zellen (0 h = Kontrolle) als 1 definiert und die Quotienten von stimulierten Zellen zu diesem Kontrollwert in Relation gesetzt. Angegeben werden diese Werte als relative mRNA-Expression, bezogen auf die Kontrolle.



## 2.6 Analyse des VSMC-Phänotyps

### 2.6.1 Migrations-Assay

Migration von VSMC in Antwort auf chemotaktische Stimuli wurden mit einem modifizierten Boyden Kammer System untersucht. Dafür wurden Polycarbonatfilter (Track-Etch Membrane, Whatman nucleopore, 25 x 80 mm PVDF) der Porengröße 8  $\mu\text{m}$  mit bovinem monomeren Kollagen Typ 1 (PureCol™) beschichtet. Für die Kollagenbeschichtung wurde das Kollagen (35  $\mu\text{l}$ ) mit 965  $\mu\text{l}$  0,05 M Essigsäure verdünnt. Im unteren Teil der 48-Loch Kammer wurde DMEM Medium ohne FCS, mit 10 % FCS oder DMEM mit PDGF-BB (10 ng/ml) als chemotaktischer Stimulus vorgelegt. Nach Platzierung der beschichteten Membran zwischen den Kammern, konnte der obere Teil der Kammer mit in Hungermedium resuspendierten VSMC befüllt werden (18.000 SMC/Loch). Jede Versuchsbedingung war innerhalb eines Experiments 6-fach vertreten. Die Migrationszeit betrug 5-6 h unter normalen Zellkulturbedingungen. Die nicht migrierten Zellen auf der Membranoberseite wurden entfernt bevor die migrierten Zellen auf der Membranunterseite mit 50 %-igen Methanol fixiert wurden. Die Quantifizierung der migrierten Zellen basiert auf einer Propidiumiodid-Färbung (5  $\mu\text{g/ml}$  PBS) der DNA der individuellen Zellkerne<sup>101</sup>. Die Detektion wurde mittels Typhoon 8600 Imager (GE Healthcare Europe, München) bei einer Exzitationswellenlänge von 532 nm und einer Detektionswellenlänge von 580 nm durchgeführt. Fluoreszenzintensität ist proportional zur Dichte der migrierten Zelldichte.

### 2.6.2 DNA-Neusynthese

Die Proliferationsrate der Zellen wurde durch Messung der DNA-Synthese ermittelt. In 24-Loch-Platten ausgesäte VSMC wurden für 48 h in serumarmen Medium („Hungermedium“) synchronisiert und für 24 h mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. Für die letzten 8 h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin (1

$\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; Perkin Elmer) in das Medium gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurde der radioaktive Überstand entsorgt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Fällung der DNA wurden die Zellen fünf Minuten mit kalter Perchlorsäure (0,1 M) inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der DNA in 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (0,4 ml/Loch) unter ständiger Bewegung für 1 Stunde bei 37 °C. Jeweils 380  $\mu\text{l}$  Lysat wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 6000 IC) die Zerfälle gemessen. Die verbleibenden 20  $\mu\text{l}$  wurden für die Zellproteinbestimmung eingesetzt. Innerhalb eines Experimentes war jede Versuchsbedingung 4-fach vertreten; der Mittelwert des Vierfachansatzes entsprach  $n = 1$ .

Die Proteinbestimmung der in den Versuchskammern befindlichen Zellen erfolgte nach Bradford (Biorad). Die Probe wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit dem Reagenz (1:5 in Wasser) vermischt. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe herangezogen. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 595 nm. Das Ergebnis wurde in *cpm* (*counts per minute*) pro Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ ) Protein angegeben.

### 2.6.3 Hyaluronsäurequantifizierung

Die Hyaluronsäurequantifizierung wurde mit Hilfe des *Hyaluronic Acid (HA) Test Kit* von der Firma Corgenix (Corgenix, Colorado, USA) durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf einer Bindung von HA an ein Enzym-gekoppeltes Hyaluronsäure-bindendes Protein (HAbP). Entsprechend verdünnte Zellkulturüberstände und Standards werden im HAbP-beschichteten Reaktionsgefäß inkubiert, wobei in den Proben vorhandene Hyaluronsäure mit dem immobilisierten Bindeprotein (HAbP) reagiert. Nach Entfernung ungebundener Moleküle durch Waschen wird den einzelnen Mikrovertiefungen an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes HAbP zugesetzt, worauf diese Komplexe mit gebundener HA bilden. Die Farbreaktion wird durch Zugabe eines Tetramethylbenzidin-Substrats und Wasserstoffperoxid ausgelöst. Die Farbintensität wird mit einem Photometer bei 450 nm gemessen.

Die gemessene Hyaluronsäurekonzentration wurde immer auf die Proteinmenge der VSMC bezogen.

#### 2.6.4 Biochemische Analyse der perizellulären und intrazellulären HA

VSMC wurden für 48 h in serumfreien DMEM kultiviert. Anschließend wurde für weitere 24 h das Medium erneuert und der Überstand, die intrazelluläre und perizelluläre Fraktion für die HA-Quantifizierung gesammelt.

Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde isoliert und perizelluläre Fraktion genannt. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und intrazelluläre Fraktion genannt.

Intrazelluläre und perizelluläre Fraktionen wurden für 12 h bei 37 °C mit Pronase (500 µg/ml) verdaut, um Verunreinigungen mit Proteinen zu beseitigen. Die anschließende Inaktivierung der Pronase erfolgte bei 100 °C für 20 Minuten. Dieses Vorgehen zur Bestimmung intra- und perizellulären HA wurde in ähnlicher Weise zuvor beschrieben<sup>89</sup>.

HA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des zuvor beschriebenen *Hyaluronic Acid (HA) Test Kit* von der Firma Corgenix durchgeführt.

#### 2.6.5 Visualisierung der perizellulären Hyaluronsäurematrix

Die perizelluläre Hyaluronsäurematrix wurde durch den Ausschluss von fixierten Erythrozyten visualisiert. Erythrozyten wurden zuvor in 1 % Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen, und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiert. Fluoresceinisothiocyanat (20 mg) wird in ca. 30 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 9) gelöst. Anschließend werden die bei 3000 rpm abzentrifugierten Erythrozyten (ca. 15ml) mit der gepufferten Fluoresceinisothiocyanat-Lösung auf Eis *gelabelt*. Das überschüssige Fluoresceinisothiocyanat muss anschließend intensiv mit PBS (pH 7,4) ausgewaschen werden. Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer Anregungswellenlänge von 496 nm, grünes Licht (520 bis 530 nm) emittiert. Die VSMC wurden ebenfalls 30 Minuten bevor sie mit den Erythrozyten inkubiert wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein (1 mM) angefärbt. Es wurden 50 µl einer 5x10<sup>8</sup> Erythrozyten/ml Suspension auf die VSMC pipettiert, nach 15-minütiger Inkubationszeit wurden mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops Fluoreszenzbilder aufgenommen.

Der perizelluläre Hyaluronsäuremantel konnte durch den Ausschluss der sedimentierten Erythrozyten im konfokalen Mikroskop visualisiert werden. Zum Nachweis, dass die perizelluläre Matrix aus Hyaluronsäuremolekülen bestand, wurden die HA-Mäntel anschließend mit Hyaluronidase (200 µg/ml) abgebaut.

### **2.6.6 Morphometrische Analyse humaner, glatter Gefäßmuskelzellen**

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

### **2.6.7 Kokultivierung von VSMC mit U937-Zellen**

VSMC wurden in 6-Lochplatten kultiviert (10<sup>6</sup> Zellen/Loch) und für 48 h „gehungert“ (DMEM ohne FCS). Gleichzeitig wurden die U937 Zellen mit PMA (100 nmol/L) für 24 h zu Monozyten/Makrophagen differenziert und anschließend für 4 h mit LPS (1 µg/mL) stimuliert, um Zytokine im Nanogrammbereich zu synthetisieren<sup>100</sup>. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die U937-Zellen bzw. die zu Makrophagen differenzierten U937-Zellen in die Transwelleinsätze pipetiert und in die 6-Lochplatte mit den VSMC eingehängt. Durch die Membran (0,4 µm Porengröße) der Transwelleinsätze wurde eine Durchmischung der VSMC mit den U937-Zellen/Makrophagen verhindert, aber ein Austausch von Medium und in das Medium abgegeben Metabolite konnte gewährleistet werden. Diese Kokultivierung von U937-Zellen mit VSMC und Makrophagen mit VSMC wurde für 24 h unter Serumentzug aufrechterhalten. Anschließend wurde mittels semiquantitativer RT-PCR die Expression der HAS3 mRNA in den VSMC untersucht.

### **2.6.8 Morphometrische Analyse des Aktinzytoskletts und der Fokalen Adhäsionen**

Für immunzytochemische Färbungen wurden hVSMC in 8-Lochplatten auf beschichteten Objektträgern (*Lab-Teks*) in einer Dichte von 12000 Zellen/cm<sup>2</sup>

ausgesät. Bei Versuchsende (fünf Tage nach Transfektion) wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gespült, für 20 min fixiert (3,7%-ige Paraformaldehydlösung), 5 min permeabilisiert (0,1 % Triton X-100/PBS) und für 1 h in Blockierlösung (3 % BSA/PBS) inkubiert. Es folgten die Inkubationen mit einem Antikörper gegen Paxillin (1:200 in 1% BSA/PBS), Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (1:600 in 1% BSA/ PBS, lichtgeschützt) für jeweils 1 h. Die Ko-Färbung für F-Aktin mit *Fluorescein-Isothiocyant-* (FITC)-konjugiertem Phalloidin (0,2 µM in PBS, frisch verdünnt, lichtgeschützt) wurde für 20 min, die Markierung der Kerne durch DNA-Anfärbung mit Hoechst 33324 (1 µl/ml) für 3 min (lichtgeschützt) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zwischen den Antikörperinkubationen schlossen sich jeweils 3 x 5-minütige Waschschrte mit PBS an. Abschließend wurden die Zellen mit *Vectashield Mounting Medium* eingedeckt, um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu verringern. Die Aufbewahrung erfolgte abgedunkelt bei 4°C.

Die Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX 50 Mikroskop mit aufgesetzter Colorview II Kamera gemacht. Es wurden die der Färbung entsprechenden Filter verwendet, die Überlagerung der Bilder erfolgte mit Hilfe der *Soft Imaging System-Software*.

### **2.6.9 Färbung von CD44 und HA**

VSMC wurden in 100 %-igem eiskalten Methanol bei -20°C für 15 Minuten fixiert. Für die HA-Färbung wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit biotinyliertem HA-bindenden Protein (HAbP, 0,2 µg/ml, Seikagaku) inkubiert und anschließend mit Streptavidin-konjugierten FITC (1.25 µg/ml, DAKO) detektiert. CD44 wurde durch einen murine anti-CD44 Antikörper (1:500, R&D System) und durch einen anti-Cy3 konjugierten Zweitantikörper (1:600, Sigma Aldrich) sichtbar gemacht. Die DNA-Anfärbung mit Hoechst 33324 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend mit *Vectashield Mounting Medium* eingedeckt, um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu verringern. Die Aufnahmen für die CD44- und Hyaluronsäure-Färbung erfolgten am konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM510).

**Tabelle 2-8** In der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Chromophore

Chromophor	Absorptionmaximum	Emissionsmaximum	verw. Exzitation
Hoechst 33324	343 nm	483 nm	351 nm
FITC (Fluorescein- isothiocyanat)	495 nm	519 nm	488 nm
Cy3 (Carbocyanin 3)	550 nm, (512 nm)	570 nm, (615 nm)	543 nm

### 2.6.10 Größenausschlusschromatographie

Die Zellen wurden bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kammer in einer 6-Lochkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 48 h in DMEM ohne Serum kultiviert. Anschließend wurden die VSMC mit IL-1 $\beta$  und 60  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]-Glukosaminhydrochlorid (Hartmann Analytics, Braunschweig) für weitere 24 Stunden inkubiert. VSMC, die HAS3-Ektop überexprimierten oder mit dem Kontrollplasmid transfiziert waren, wurden nicht mehr zusätzlich stimuliert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand mit 500  $\mu$ g/ml Pronase bei 37°C über Nacht inkubiert, um proteinvermittelte Verknüpfungen zwischen einzelnen Hyaluronsäureketten zu lösen, die später bei der Größenauffrennung stören würden. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine Hitzeinaktivierung von Pronase (15 min, 100 °C).

Die Gesamt-Glykosaminoglykan-Fraktion wurde gewonnen, indem der verdaute Mediumüberstand mittels einer Sephadex G50-Gelfiltration aufgereinigt wurde. Zur Rehydratisierung und Einstellung der adäquaten Porengröße wurde das Sephadex G50 Säulenmaterial für vier Stunden im Gelquellungspuffer (0,1M Trisazetat, 0,02 % NaN $_3$ , pH 7,3) equilibriert. Bei der Elution aus dieser G50-Vorsäule wurden nur die Anteile der Probe mit einem Molekulargewicht über  $10^4$  Dalton eluiert. Der nicht eingebaute Anteil an radioaktivem Glukosamin

blieb ebenso in der Säule zurück wie sehr kleine Hyaluronsäurefragmente, die mit der nachfolgenden Größenausschlusschromatographie nicht untersucht werden können.

Nach Szintillationszählung in einem LS6000IC Szintillationszähler (BeckmanCoulter, Krefeld) wurde ein 20000 *cpm* enthaltendes Aliquot mit und ohne vorherigen Hyaluronidaseverdau einer Größenausschluss-Chromatographie auf Sephacryl S-1000 Füllmaterial in einer 30 x 1 cm Tricorn-Säule (GE Healthcare Europe, München) unterworfen. Die Elution erfolgte mittels S-1000 Elutionspuffer (0,5 M Natriumazetat, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,025 % CHAPS, pH 7). Hyaluronidase-empfindliche Signale (*cpm*) wurden von den Signalen (*cpm*) aus den entsprechenden unverdauten Proben abgezogen, um das Elutionsprofil der HA-Fractionen zu errechnen.

Tabelle 9 verwendete Puffer und Lösungen in der Hyaluronsäuregrößenbestimmung

Gelquellungspuffer für G50 Säule	0,1 M Trisacetat 0,02 % NaN <sub>3</sub> pH 7,3
Elutionspuffer G50	Gelquellungspuffer 0,025 % CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Elutionspuffer S-1000	0,5 M Natriumacetat 0,02 % NaN <sub>3</sub> 0,025 % CHAPS pH 7

## 2.7 Lentivirale Transfektion

### 2.7.1 Das Drei-Plasmid-System

Die Lentiviren gehören zu der Familie der Retroviren (Orthoretroviren). Charakteristisch für Retroviren ist die reverse Transkriptase, die es ermöglicht ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und anschließend in das Wirtsgenom stabil zu integrieren.

Die lentivirale Produktion basiert aus Sicherheitsgründen auf einem Drei-Plasmid-System der dritten Generation. Ein Plasmid kodiert für das Verpackungssignal (VSV-G), ein Plasmid dient als Transfervektor (CL1THPC) und das dritte Plasmid dient als Helferplasmid (CD/NL-BH).

Das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) wurde zur Pseudotypisierung des Lentivirus verwendet. Von Pseudotypisierung spricht man, wenn das virale Kapsid in eine Virushülle (*env*) verpackt wird, die nicht der natürlichen Virushülle (HI-Virushülle) entspricht. Durch diese Pseudotypisierung erweitert sich das Wirkspektrum der Retroviren<sup>102</sup>. Im Vergleich zur HIV-Hülle, die nur CD4 positive Zellen, wie Makrophagen, Lymphozyten und Gliazellen, infiziert, kann die Hülle des vesikulären Stomatitis Virus fast jeden Zelltyp infizieren.

In den Transfervektor CL1THPC wurde die humane HAS 3 als Transgen und EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), als Fluoreszenzmarker, zwischen die LTRs ligiert. Zusätzlich enthält der Transfervektor einige essentielle Viruselemente, wie zum Beispiel das Verpackungssignal  $\psi$  das notwendig ist, damit die Virus-mRNA in die neu gebildeten viralen Partikel inkorporiert wird. Ferner werden die LTRs für die Integration in das Genom der Zielzelle benötigt. Die transkribierte RNA von *gag*, *pol* und *env* werden nicht in die viralen Partikel inkorporiert, da ihnen das Verpackungssignal  $\psi$  fehlt. Aus diesem Grund können die genetischen Informationen für *gag*, *pol* und *env* auch nicht in das Genom der Zielzelle gelangen.

Die Plasmide, die nur strukturelle Komponenten für den Viruspartikel bereitstellen, werden Helferplasmide genannt. Das Helferplasmid des HIV-



Vektors (CL1THPC) CD/NL-BH trägt kodierende Sequenzen für *gag* und *pol*, sowie für die Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

### 2.7.2 Produktion der Lentiviren in HEK293T Zellen

Die HEK 293T Zellen dienen als virusproduzierende Zelllinie und wurden mit Hilfe von Polyethylenimine (PEI) mit jeweils 5 µg der drei Plasmide VSV-G, CL1THPC und CD/NL-BH transfiziert. PEI ist ein kationisches Polymer, das Nukleinsäure-bindende und –kondensierende Eigenschaften besitzt, so dass die DNA-Polykationen-Komplexe effizient von den HEK 293T Zellen aufgenommen werden können. Nach ca. 16 h wurde das Medium gewechselt und der CMV-Induktor Natriumbutyrat (10 mM) für weitere 6-8 h dazu gegeben. Anschließend wurde das normale Wachstumsmedium (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) gegen HEPES-gepuffertes Spezialmedium (IMDM, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) getauscht, um eine bessere Stabilität der Lentiviren zu erreichen. Am darauf folgenden Tag, frühestens aber 19 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, wurde der virushaltige Überstand geerntet. Um Überreste der Produzentenzellen zu entfernen, wurde der virushaltige Überstand durch eine 0,45 µm Filter (Sartorius AG, D-37075 Göttingen) filtriert. Das virushaltige Medium wurde sofort aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.7.3 Transduktion von humanen VSMC

VSMC wurden mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert. Zur Steigerung der Gentransfereffizienz wurde zusätzlich 10 µg/ml Protaminsulfat zu dem Gemisch aus VSMC und Lentiviren pipettiert. Protaminsulfat ist ein Polykation, das die initiale unspezifische Bindung zwischen Virus und Zielzelle erhöht, indem es die elektrostatische Abstoßung zwischen den Membranen aufhebt. Nach etwa 16 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem DMEM „gefüttert“.

Um zu überprüfen ob die Transduktion erfolgreich war, wurde die EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Zusätzlich wurde nach einer Wartezeit von drei Tagen in normalem Wachstumsmedium und zwei Tagen in

Serum freiem Medium die Überexpression der HAS3 in den Zellen durch Messungen der Hyaluronsäure im Zellkulturüberstand validiert, und bei einem positiven Befund weitere Untersuchungen vorgenommen.

#### **2.7.4 Klonierung der humanen Hyaluronsäuresynthase 3**

Das HAS3v1 enthaltende Plasmid wurde von Guang Dai (Düsseldorf) kloniert und zur Verfügung gestellt. Die gesamte Länge der humanen HAS3v1 c-DNA (NCBI Genbank: CCDS10871.1) wurde in den Transfervektor kloniert. Dabei diente die HAS3 RNA aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen als Vorlage für die RNA Amplifizierung mit Hilfe der RT-PCR. Zur Überprüfung der klonierten Sequenz, wurde die cDNA von der Firma Qiagen sequenziert. Die humane HAS3 cDNA Sequenz wurde in die Schnittstellen XhoI/EcoRI der CL1THPC-MCS (*multiple cloning site*) ligiert.

Die Vermehrung dieses Plasmides, des VSV-G und des CD/NL-BH erfolgte unter Ausnutzung des Ampicillin-Resistenz-Gens, welches eine selektive Amplifikation in T4 kompetenten *E.coli* Bakterien erlaubt. Die Aufreinigung der gesamt-DNA wurde mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem Nanodrop-1000-Photometer (Peglab).

#### **2.7.5 Lentiviraler *knock down* der humanen HAS3**

Komplementär zur Überexpression wurde mit Hilfe des *Mission-shRNA-Systems* der Firma Sigma HAS3v1 lentiviral ausgeschaltet. Die folgende Sequenz wurde für die genetische Depletion der HAS3v1-Splicevariante verwendet:

```
5`CCGGGCTCTACAACCTCTGTGGTTCTCGAGAACCACAGAGAGTTGTAG  
AGCTTTTTG-`3.
```

### **2.8 Transfektion von siRNA Oligonukleotiden**

Zur Ausschaltung der HAS3 wurde auch die Technik der RNA-Interferenz

angewendet. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, bei dem doppelsträngige RNA sequenzspezifisch ein „Gen-silencing“ induziert. Ausgehend von der Sequenz der cDNA wurden einzelsträngigen siRNAs von Qiagen-Xeragon synthetisiert. Für die Transfektion wurden folgenden siRNA-Sequenzen ausgewählt, die spezifisch das HAS3v1-Gen erkennen und binden:

sense HAS3-siRNA: 5'-CCC GCU GGA GCA AGU CUUAd(TT)-3'

antisense HAS3-siRNA: 5'-UAA GAC UUG CUC CAG CGG Gd(TT)-3'

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

sense Kontroll-siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUd(TT)-3'

antisense Kontroll-siRNA: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAd(TT)-3'

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

90°C, 1 Min

37°C, 60 Min

VSMC wurden 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von 50000/12-Lochplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung unter Normalbedingungen wurden die Zellen mit 1,6 µg HAS2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA pro 50000 Zellen mittels einer auf Liposomen basierenden Transfektionsmethode (Transmessenger Transfection Reagent; Qiagen) nach Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurde pro 12-Lochplatte folgender Transfektionsansatz gewählt:

5,68 µl siRNA (1,6 µg)

94,32 µl Buffer EC-R

13,2 µl RNAiFect Transfektionsreagenz

Der Puffer und die siRNA wurden zunächst gut mit einander vermischt, bevor die Zugabe des Transfektionsreagenz erfolgte und anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation des Liposomenkomplexes bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde mit 600 µl DMEM (mit 10 % FCS) vermischt und

anschließend auf die VSMC gegeben. Am nächsten Tag wurde noch einmal das Medium gewechselt. 48 Stunden nach der Transfektion war die HAS3 mRNA Expression am geringsten, so dass alle Versuche zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden.

## 2.9 Proteinanalyse mittels *Western Blotting*

Für die Untersuchungen mittels Western-Blot wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 x Lämmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde anschließend kurz mit Ultraschallwellen behandelt und 5 min bei 90 °C denaturiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die Auftrennung und Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5 %, die Konzentration des Trenngels betrug 10 %. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 60 Minuten bei 120-160 V. Nach der Proteinauftrennung im Gel wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgt in einer „Semi-Dry“-Blotapparatur bei 1000 mA. Die Laufdauer richtete sich nach der Proteingröße und wurde anhand des mitwandernden gefärbten Proteinmarkers abgeschätzt.

Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die proteinbindende Membran zu verhindern, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer für 1 h (RT) oder 12 h (4 °C) in TBST-Blocking Reagenz (1 %) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1-12 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 1 h bei RT.

Die Proteine wurden nach Antikörperinkubationen mittels „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Die entstehende Chemilumineszenz wird durch Exposition eines

Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert.

Die quantitative Auswertung erfolgte nach Scannen der Filme durch densitometrische Vermessung der Banden mit der Quantity One Software von Bio-Rad.

## **2.10 Proteinbestimmung für Proliferationsuntersuchungen und Hyaluronsäuremessungen**

Die Proteinbestimmung von in den Versuchskammern befindlichen Zellen erfolgte nach Bradford (Biorad). Die Probe wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit dem Bradford Reagenz (1:5 in Wasser) vermischt. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe herangezogen. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 595 nm.

## **2.11 Analyse humaner atherosklerotischer Läsionen**

Atherektomie Proben aus der *Arteria Carotis* wurden für diagnostische Zwecke von Patienten mit symptomatischer arterieller Verschlusskrankheit entnommen. Die Präparate stammten aus der Gewebesammlung des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums, Düsseldorf. Diese Studie wurde im Einklang mit der „Declaration of Helsinki“ durchgeführt. Desweiteren wurden die Einverständniserklärung der Patienten erhalten. Die Proben waren in Paraffin eingebettet und wurden für immunhistochemische Färbungen verwendet. Die Hyaluronsäure wurde mittels eines biotinylierten Bindeproteins (HABP; Seikagaku; 1:100 verdünnt) angefärbt. Immunhistologische Anfärbungen von glattmuskulärem Aktin, CD68 und NFκB (p50) wurden mit den in Tabelle 10 angegebenen Primär-Antikörpern und Verdünnungen durchgeführt.

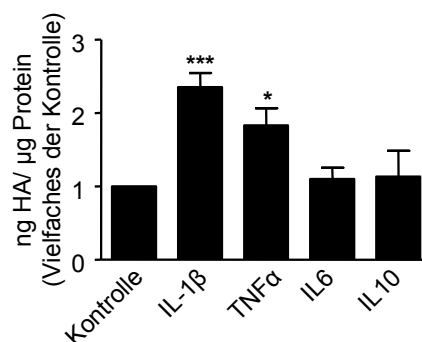
*Tabelle 10 In der Immunhistochemie verwendete Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ SM-Aktin (monoklonal)	1:200	DAKO
CD68 (monoklonal)	1:500	DAKO (Klon PG-M1)
HABP	1:100	Seikagaku
NF $\kappa$ B p50	1: 250	SantaCruz

## 3 Ergebnisse

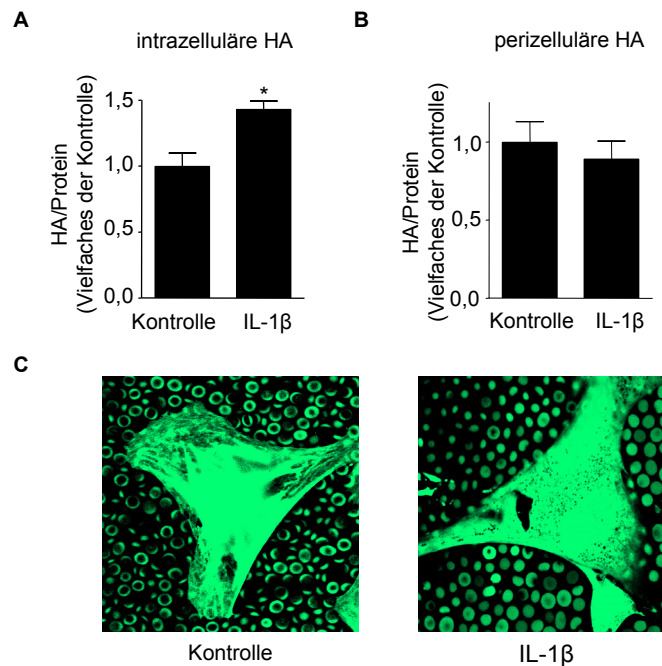
### 3.1 Zytokinabhängige Hyaluronsäureregulation

Humane koronararterielle Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden für 48 h in serumfreien DMEM („gehungert“) kultiviert und nachfolgend für 24 h mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder IL-6, die klassischen inflammatorischen und proatherogenen Zytokinen, oder mit IL-10, als antiinflammatorisches Zytokin, inkubiert. In das Zellkulturmedium sezernierte Hyaluronsäure wurde nachfolgend quantifiziert. IL-1 $\beta$  erhöhte die HA-Synthese um den Faktor  $2,35 \pm 0,47$  versus unstimulierten Kontrollzellen und TNF $\alpha$  um den Faktor  $1,83 \pm 0,4$ . Zugabe von IL-10 oder IL-6 veränderten die Hyaluronsäuresekretion unter diesen Versuchsbedingungen nicht (**Abbildung 3-1**).



**Abbildung 3-1 Zytokin abhängige HA-Sekretion** 24-stündige Behandlung mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (10 ng/ml) erhöhte die von VSMC ins Medium sezernierte Hyaluronsäuremenge, während IL-6 (10 ng/ml) oder IL-10 (1 ng/ml) zu keiner Veränderung der Hyaluronsäuresekretion führten; IL-1 $\beta$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, n=6; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; TNF $\alpha$ , n=3; \*,  $p < 0,05$ .

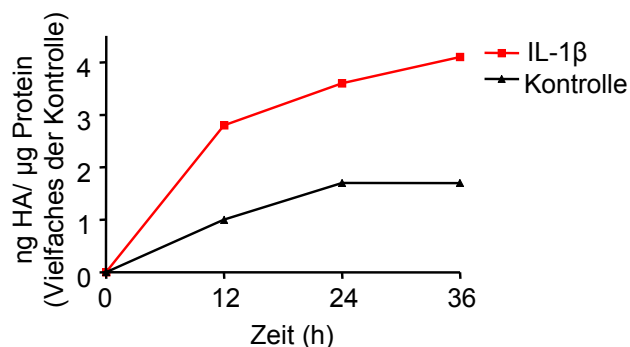
Des Weiteren wurde untersucht, ob IL-1 $\beta$  auch einen Zuwachs des perizellulären Hyaluronsäuremantels induziert. Die Stimulation von VSMC mit IL-1 $\beta$  führte zu keiner Vergrößerung des perizellulären HA-Mantels (**Abbildung 3-2**).



**Abbildung 3-2 Messung der intrazellulären und perizellulären HA nach Stimulation mit IL-1β an VSMC.** A und B, biochemische Messung der intra- und perizellulären HA: A, IL-1β induzierte eine HA-Zunahme im intrazellulären Kompartiment von VSMC, konnte aber keine vermehrte perizelluläre HA-Akkumulation induzieren (B). C, zur Visualisierung des perizellulären HA-Mantels wurden fixierte Erythrozyten im Überschuß auf lebende VSMC pipettiert. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskop wurde auf eine Ebene fokussiert, die den HA-Mantel von lebenden Zellen darstellt; n=3; Mittelwert±SEM; \*, p<0,05.

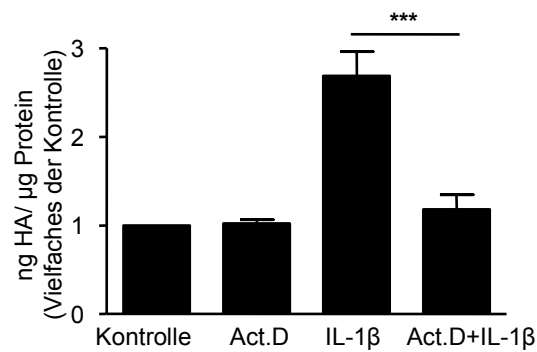
Da das proinflammatorische Zytokin IL-1β die HA-Produktion hoch signifikant erhöhte und es bekannt ist, dass Makrophagen während der proinflammatorischen Phase in der Atherosklerose überwiegend IL-1β ausschütten<sup>75,103</sup>, wurden weitere Experimente mit IL-1β durchgeführt. Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Hyaluronsäuresekretion in Antwort auf IL-1β zeigten in VSMC, dass schon nach 12 h ein deutlicher Anstieg an HA versus unstimulierten Kontrollzellen im Zellkulturmedium zu messen war (**Abbildung 3-3**). Über den beobachteten Zeitraum von 36 h, nahm die durch IL-1β stimulierte Hyaluronsäuresekretion weiter zu. VSMC wurden vor Versuchesbeginn 24 h lang in serumfreiem DMEM kultiviert.





**Abbildung 3-3 Zeitverlauf der durch IL-1 $\beta$  stimulierten HA-Sekretion:** Zeitabhängigkeit der durch IL-1 $\beta$  induzierten HA-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach 12 h, 24 h und 36 h. HA-Konzentrationen wurden auf das gesamte zelluläre Protein bezogen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

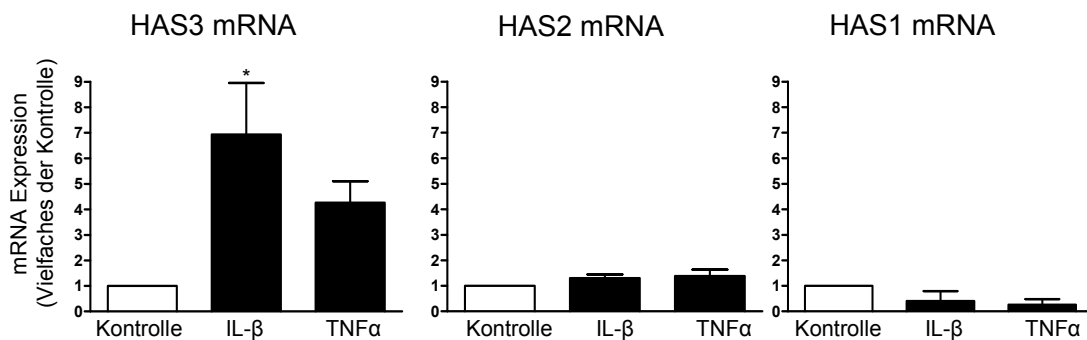
IL-1 $\beta$  induzierte bereits nach 12 h eine 2,8-fache Stimulation der HA-Sekretion in den Zellkulturüberstand. Um zu untersuchen, ob die IL-1 $\beta$  induzierte HA-Sekretion auf der Induktion der HAS-Transkription oder einer lediglich gesteigerten Enzymaktivität beruht, wurde die Transkription mit Actinomycin D gehemmt. Actinomycin D wirkt durch Interkalation in die DNA. Die DNA kann dadurch nicht mehr entspiralisiert werden, und hemmt somit die DNA-abhängige RNA-Synthese und schließlich auch die Proteinneusynthese. VSMC wurde für 24 h Serum entzogen, anschließend mit Actinomycin D (1  $\mu$ g/ml; Act.D) 30 Minuten vorinkubiert und dann mit IL-1 $\beta$  für 24 h stimuliert (**Abbildung 3-4**). Dieser Versuch zeigte, dass nach Hemmung der Transkription IL-1 $\beta$  keine vermehrte HA-Sekretion induzieren konnte.



**Abbildung 3-4 Effekt von Aktinomycin D auf die Stimulation der HA-Synthese.** Der Transkriptioninhibitor Actinomycin D hemmt die IL-1 $\beta$  abhängige HA-Sekretion von den  $2,7 \pm 0,27$ -fachen der Kontrolle auf das  $1,2 \pm 0,16$ -fache; Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

### 3.2 Identifizierung der durch Zytokine induzierten HA-Synthese

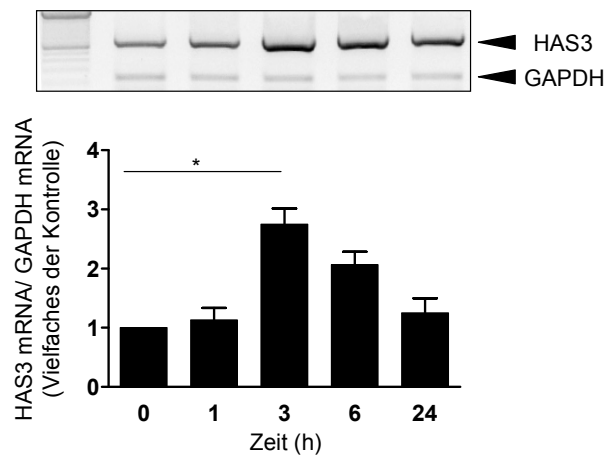
Im folgenden Versuch wurde untersucht, welchen Einfluß IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auf die transkriptionelle Regulation der HAS-1, -2, -3 hat. Humane VSMC wurden 24 h unter Serumentzug kultiviert, dann für 3 h mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. Das Expressionsmuster der drei Hyaluronsäuresynthasen wurde mit Echtzeit-RT-PCR analysiert.



**Abbildung 3-5 Real time RT-PCR von HAS1, 2, 3:** gehungerte VSMC wurden für 3 h entweder mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert und anschließend RNA für real time RT-PCR Untersuchungen isoliert. Dargestellt sind die Auswertungen von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$ .

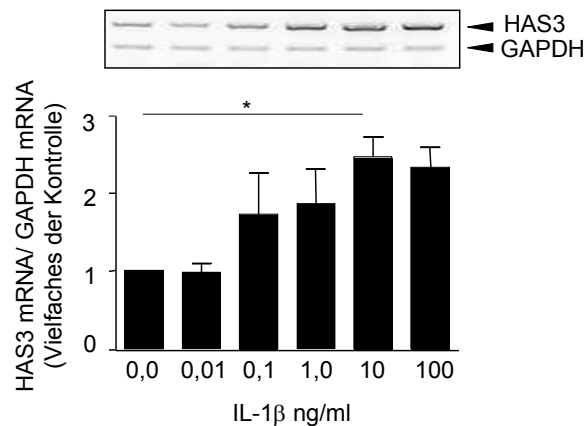
Wie **Abbildung 3-5** zeigt, kam es nach 3-stündiger Behandlung der hVSMC mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  zu einem signifikanten Anstieg der HAS3 mRNA Expression. Die HAS2 mRNA und die HAS1 mRNA Expressionsmuster wurden in diesem Zelltyp nach 3-stündiger IL-1 $\beta$  Inkubation nicht signifikant verändert.

Da die IL-1 $\beta$  vermittelte Induktion der HAS3 mRNA am stärksten war, wurde die HAS3 Regulation durch IL-1 $\beta$  nachfolgend genauer untersucht. VSMC wurden 24 h unter Serumentzug kultiviert und dann für 1, 3, 6, 12 h mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert (**Abbildung 3-6**). Um Transkription von HAS3 zu bestimmen, wurde die HAS3 mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Die Stimulation der Expression von HAS3 verlief transient, mit einer maximalen Induktion nach 3-stündiger IL-1 $\beta$  Inkubation ( $2,8 \pm 0,26$  versus Kontrolle). Nach 24 h IL-1 $\beta$  Stimulation war der HAS3 mRNA-Basalwert wieder erreicht. Als Referenzgen wurde das Expressionsniveau der GAPDH mRNA gemessen.



**Abbildung 3-6 Zeitabhängigkeit der Induktion der HAS3 mRNA durch IL-1 $\beta$**  dargestellt ist ein repräsentatives DNA-Gel der PCR-Produkte einer semiquantitativen RT-PCR, sowie die densitometrische Auswertung von  $n = 3-4$  unabhängigen Versuchen. Der Quotient der HAS3 und GAPDH Signale wurden auf die Werte der Kontrolle normalisiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$ .

Um zu analysieren bei welchen IL-1 $\beta$  Konzentrationen ein signifikanter HAS3 mRNA Anstieg an VSMC zu verzeichnen ist, wurden VSMC mit unterschiedlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen inkubiert. Gesamt-RNA wurde 3 h nach IL-1 $\beta$  Zugabe isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR die HAS3 mRNA Expression bestimmt (**Abbildung 3-7**).

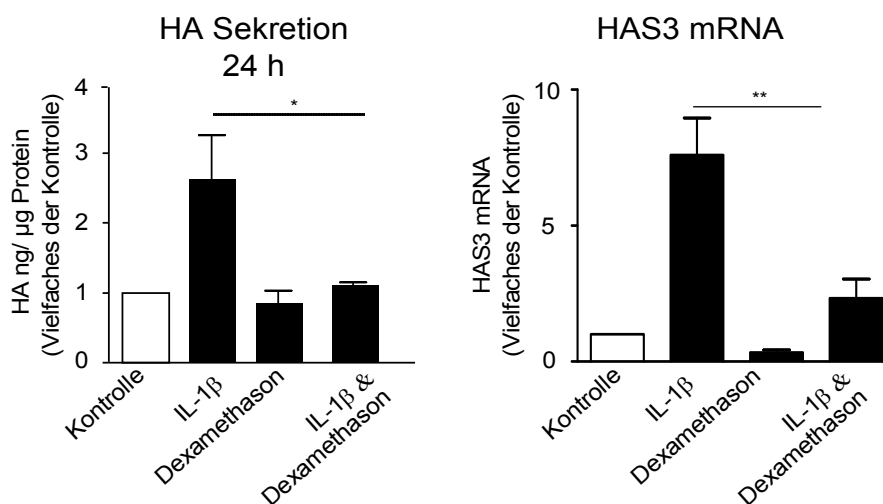


**Abbildung 3-7 Konzentrationabhängigkeit der HAS3 mRNA Induktion durch IL-1 $\beta$ :** VSMC wurden nach 48 h Serumentzug für 3 h mit unterschiedlichen IL-1 $\beta$  Konzentrationen stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives DNA-Gel der semiquantitativen RT-PCR Produkte für HAS3 und GAPDH, sowie die densitometrische Auswertung von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

### 3.3 Aktivierung von NF $\kappa$ B führt zu einer verstärkten HAS3 Transkription

Die zellulären Antworten in Antwort auf IL-1 $\beta$  werden über den transmembranären IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) vermittelt. Adapterproteine und die IL-1RI-assoziierte Kinase (IRAK) werden nach Ligandenbindung an den Rezeptor rekrutiert. Nach ihrer Phosphorylierung dissoziiert IRAK vom IL-1RI-Komplex und aktiviert weitere Kinasen, was letztendlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Induktion der Transkription von Genen führt. Der IL-1-Rezeptor Typ II besitzt zwar eine höhere Affinität für IL-1 $\beta$  als IL-1RI, führt aber nicht zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Im Rahmen einer Promotoranalyse von *Monslow et al. 2003*, konnten im proximalen Promotor von HAS3 zwei NF $\kappa$ B Bindungsstellen identifiziert werden. Somit war die Vermutung nahe liegend, dass IL-1 $\beta$  über eine NF $\kappa$ B- Aktivierung HAS3-Transkription induziert. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden VSMC mit dem Glukokortikoid Dexamethason (100 nM) 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle wurden VSMC mit Dexamethason alleine inkubiert. Nach 24 h wurde

die Hyaluronsäurekonzentration im Zellüberstand gemessen. In einem parallelen Versuchsansatz wurde die HAS3 mRNA Expression nach 3 h in An- und Abwesenheit von Dexamethason analysiert.

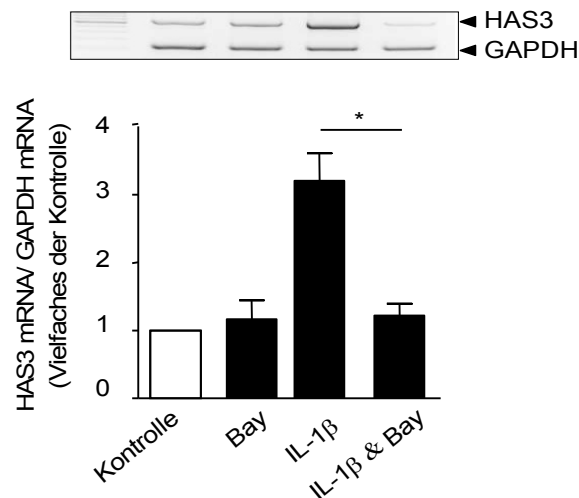


**Abbildung 3-8** VSMC wurden 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, dann mit IL-1β (10 ng/ml), Dexamethason (100 nM) oder erst 30 Minuten mit Dexamethason vorinkubiert und anschließend mit IL-1β stimuliert; für Bestimmungen der HA Konzentration wurden nach 24 h die Zellüberstände analysiert und die HAS3 mRNA Expression wurde mittel Echtzeit RT-PCR nach 3 h Stimulation untersucht; HA: Mittelwert ± SEM; n = 3; \*, p < 0,05 IL-1β versus IL-1β & Dexamethason; HAS3 mRNA: Mittelwert ± SEM; n = 3; \*\*, p < 0,001 IL-1β versus IL-1β & Dexamethason.

**Abbildung 3-8** zeigt, dass Dexamethason die durch IL-1β induzierte HA-Synthese aufheben konnte. Stimulationen mit Dexamethason allein führten in „gehungerten“ VSMC zu einer schwachen Absenkung des HA-Niveaus im Zellkulturüberstand. Behandlung mit Dexamethason senkte die HAS3 mRNA Expression signifikant gegenüber unstimulierten Kontrollzellen.

Durch Verwendung des spezifischen NFκB Inhibitor Bay 11-7082 konnte das vorangegangene Versuchsergebnis bestätigt werden. Bay 11-7082 (Bay) hemmt die IL-1β-induzierte IκB-α Phosphorylierung und somit die Translokation von NFκB in den Zellkern und somit auch die Gentranskription.

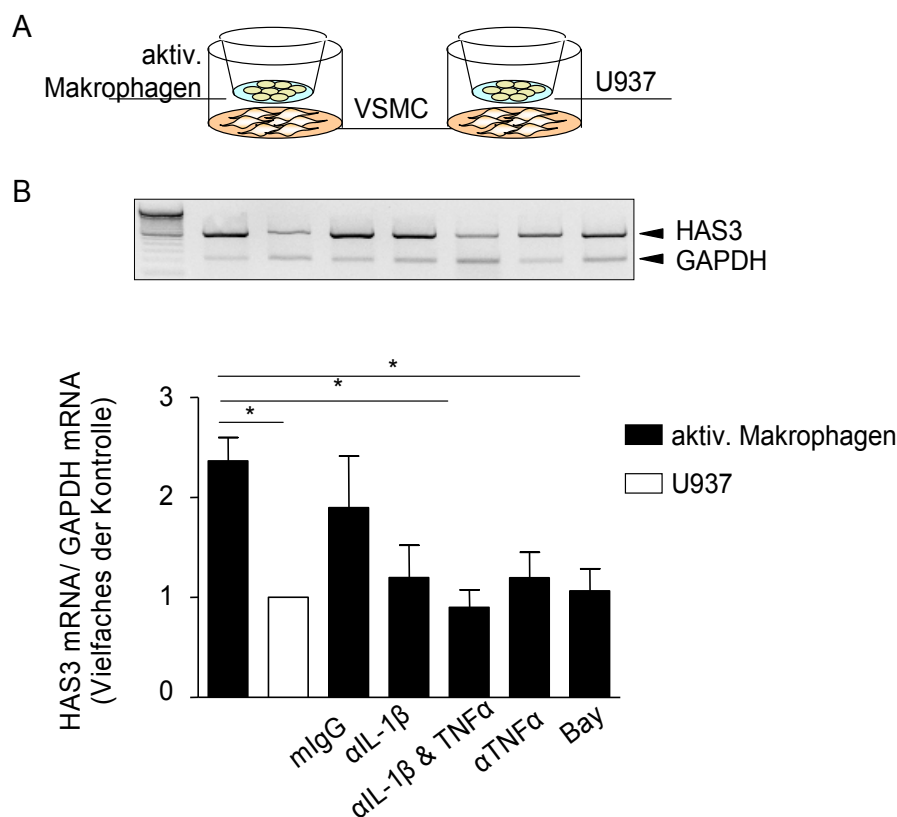
VSMC wurden für 3 h entweder mit Bay (10 µM), IL-1β oder mit IL-1β & Bay inkubiert und sogleich die HAS3 mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR gemessen (**Abbildung 3-9**).



**Abbildung 3-9 NF $\kappa$ B-Aktivierung führt zur transkriptionellen Induktion der HAS3:** Der NF $\kappa$ B Inhibitor Bay11-7082 hemmte die IL-1 $\beta$  induzierte HAS3 mRNA Expression in VSMC; Mittelwert  $\pm$  SEM; n =3; p, \* < 0,05 IL-1 $\beta$  versus IL-1 $\beta$  & Bay.

In einem Transwellsystem wurde untersucht, ob eine Ko-Kultur von Makrophagen und VSMC auch zu einer Induktion der HAS3 mRNA in VSMC führt. Dieser Versuchsaufbau sollte eine Situation *in vivo* imitieren. Monozyten wandern ins Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen, die u.a. Zytokine produzieren. Diese Zytokine binden sich an spezifische Zytokinrezeptoren auf VSMC und Entzündungszellen und lösen dort Effekte aus. Durch 24-stündige Inkubation mit PMA (100 nM) wurde die Reifung der monozytären U937 Zellen zu Makrophagen induziert<sup>100</sup>. Anschließend wurden die differenzierten Makrophagen mit LPS (1  $\mu$ g/ml) für 4 h stimuliert. Es ist bekannt, dass Zellen unter diesen Bedingungen im Nanogrammbereich Zytokine produzieren. Durch dreimaliges Waschen der aktivierten Makrophagen mit PBS, sollte eine Kontamination der Ko-Kultur mit PMA und LPS verhindert werden. VSMC wurden für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, bevor der Transwelleinsatz mit den aktivierten Makrophagen (bzw. U937-Zellen) in die Zellkulturschale mit den VSMC eingehängt wurde. Mit diesem Versuchsaufbau konnte durch Diffusion ein Austausch autokriner und parakriner Faktoren stattfinden, aber es kam zu keiner Durchmischung oder direktem Kontakt der beiden Zellkulturen.

Nach weiteren 24 h wurden die Expression der HAS3 mRNA in den kokultivierten VSMC mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht (**Abbildung 3-10**). Die aktivierten Makrophagen produzierten Mediatoren/ Zytokine, die bei den VSMC zu einer transkriptionellen Aufregulation der HAS3 führten. Um genauer verifizieren zu können, welche Zytokine für diese HAS3-Induktion verantwortlich waren, wurden neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\beta$  ( $\alpha$  IL-1 $\beta$ ) und TNF $\alpha$  ( $\alpha$  TNF $\alpha$ ) eingesetzt.



**Abbildung 3-10 Ko-Kultivierung von aktivierten Makrophagen und VSMC:** A, schematische Darstellung des Transwell-Ko-Kulturaufbaus, B repräsentatives DNA-Gel nach semiquantitativer RT-PCR und densitometrische Auswertung von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen; aktivierte Makrophagen induzierten an VSMC nach 24 h HAS3 mRNA Expression. Diese Induktion konnte durch die Zugabe von  $\alpha$ IL-1 $\beta$  mit  $\alpha$ TNF $\alpha$ , aber auch durch Bay11-7082 aufgehoben werden; Mittelwert $\pm$ SEM;  $n = 3$ , \*,  $p < 0,05$ .

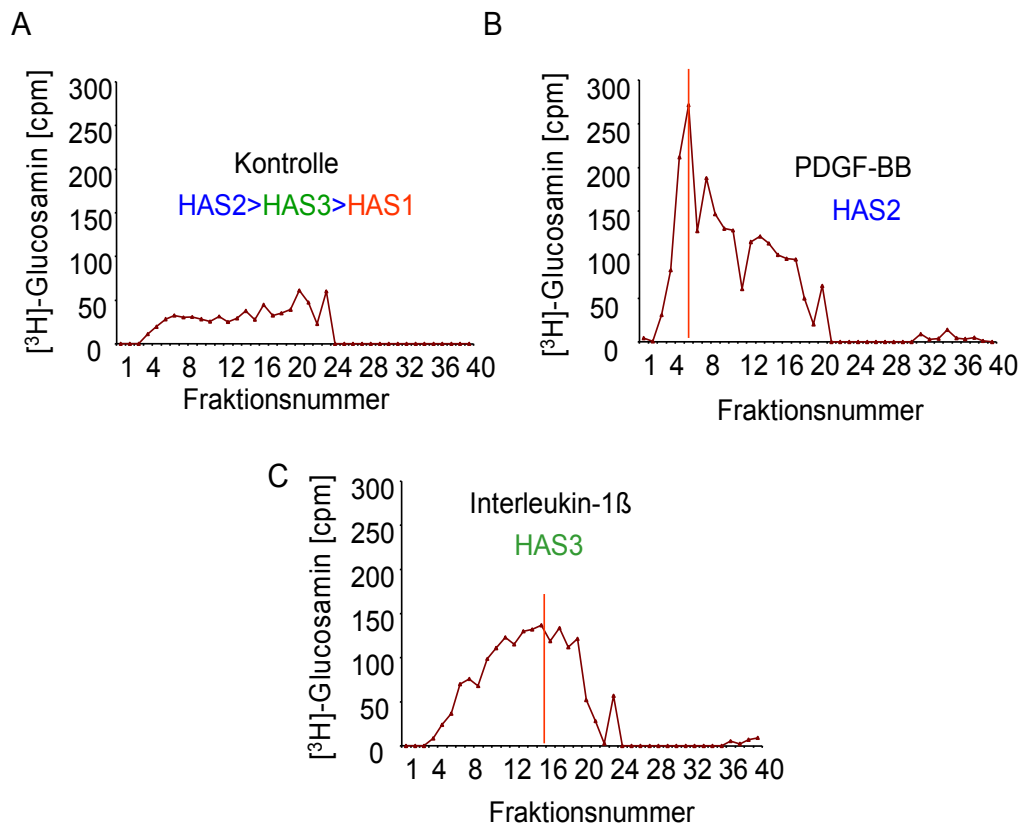
Im Vergleich zur Isotypkontrolle (mlgG), verhinderten  $\alpha$ IL-1 $\beta$  und  $\alpha$ TNF $\alpha$  den Anstieg von HAS3 mRNA in VSMC. Die Kombination von  $\alpha$ IL-1 $\beta$  mit  $\alpha$ TNF $\alpha$



und der NF $\kappa$ B-Inhibitor Bay11-7082 hob den HAS3 mRNA Anstieg nach Kokultur mit aktivierten Makrophagen auf.

Itano et al. klonierte 1999 rekombinante HAS1, 2, 3 Proteine<sup>8</sup>. In seinen Untersuchungen zur Größe der durch die HAS-Isoformen synthetisierten Polymere fand er heraus, dass die HAS-Isoformen unterschiedlich lange HA-Ketten synthetisieren. HAS3 produziert mit  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Da kürzere HA-Stränge als HAS1 und HAS2 ( $2 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  Da). Hinzu kommt, dass die HA-Kettenlängen die biologische Aktivität der HA stark beeinflussen<sup>14</sup>. Um zu untersuchen, in welchem Größenbereich die IL-1 $\beta$  induzierte HA liegt, wurde mittels Größenausschlusschromatographie die hydrodynamische Größe der in das Medium abgegebenen HA bestimmt.

„Gehungerte“ VSMC sezernierten HA, die in der Größenausschlusschromatographie gleichmäßig in allen Fraktionen nachgewiesen wurden. Nach Behandlung mit PDGF-BB (10 ng/ml), ein Induktor der HAS2 mRNA<sup>18</sup>, war die von VSMC sezernierte HA vornehmlich in Fraktionen zu finden, die hochmolekulare HA enthielten. Hingegen führten Stimulationen mit IL-1 $\beta$  zur Sezernierung von niedermolekularer HA. Fraktion 6 stellte das Maximum nach PDGF-BB Stimulation dar, während IL-1 $\beta$  induzierte HA erst in Fraktion 16 ein Maximum erreichte (**Abbildung 3-11**).



**Abbildung 3-11 Hyaluronsäuregrößenverteilung nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und PDGF-BB.** HA-Größenauftrennung erfolgte über eine 30 cm lange und 1 cm breite Sephacryl-S-1000-Größenaustausch-chromatographiesäule in 0,5 M Natriumacetat, 0,025 % CHAPS, pH =7. Auf der Abszisse ist die Zahl der volumenkonstanten Fraktionen aufgetragen; repräsentative Elutionsprofile von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. A, zeigt die HA-Größenverteilung von gehungerten VSMC; B, Größenverteilung nach Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml); C, die Größenverteilung der HA nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  zeigt eine Verschiebung zu späteren Fraktionen charakteristisch für intermediäre niedermolekulare HA-Polymere.

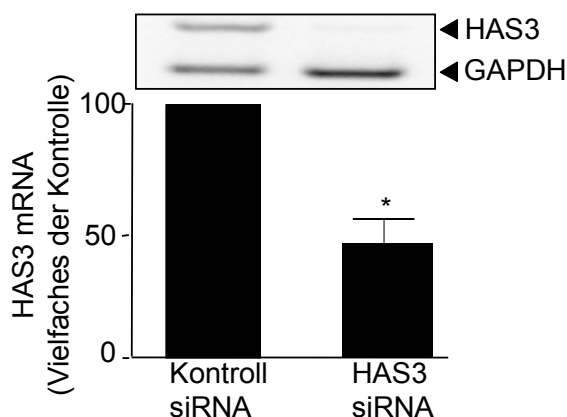
### 3.4 Modifizierung der HAS3 Expression

#### 3.4.1 HAS3 knock down mittels RNA-Interferenz

Eine sequenzspezifische Reduktion der HAS3 Expression wurde durch kleine doppelsträngige RNA (siRNA), die eine Degradation der HAS3-mRNA bewirken, realisiert.

48 h nach Transfektion mit HAS3 siRNA konnte im Mittel eine Hemmung der HAS3 mRNA Expression von 50 % erzielt werden (**Abbildung 3-12**). Die

Etablierung der RNA-Interferenz ermöglichte die Analyse über die Funktionen von HAS3 und die Bedeutung der HAS3 für den Phänotyp von VSMC.



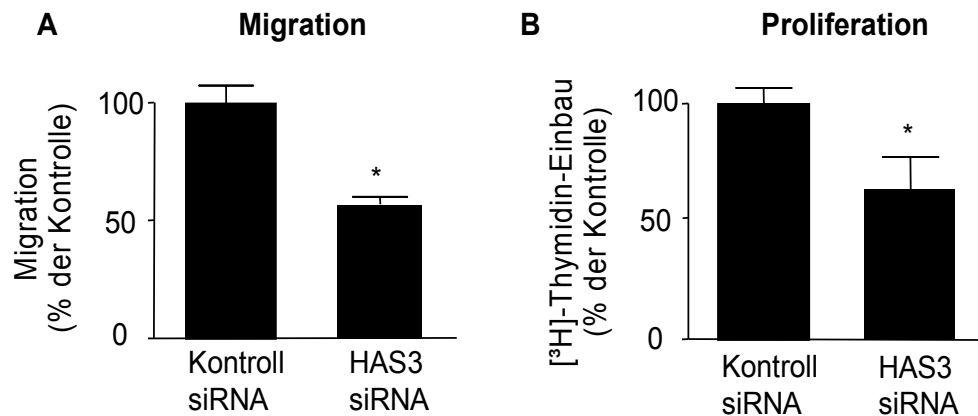
**Abbildung 3-12 Hemmung der HAS3-Expression.** Transfektion VSMC mit unspezifischer Kontroll-siRNA und HAS3-spezifischer siRNA. Überprüfung der HAS3-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR nach 48 h; n = 5; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$ .

### 3.4.1.1 Migration und Proliferation von VSMC

In atherosklerotisch veränderten Gefäßen ist ein Anstieg der Hyaluronsäure mit einer phänotypischen Veränderung der VSMC assoziiert. Kontraktile VSMC transformieren zu synthetischen VSMC, die durch eine gesteigerte Migrations- und Proliferationsrate charakterisiert sind. Die Bedeutung der einzelnen Hyaluronsäuresynthase-Isoformen bei der Atherosklerose ist noch nicht hinreichend geklärt. Daher wurde zur Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von HAS3 der Einfluss auf die PDGF-BB stimulierte Migration von VSMC über einen Zeitraum von 6 h analysiert.

Eine Hemmung der HAS3 Expression mittels RNA-Interferenz führte zur Abnahme der Migrationsrate von VSMC (**Abbildung 3-13 A**). Für die Untersuchung der Proliferationseigenschaften HAS3-defizienter VSMC wurde die DNA-Synthese in VSMC mittels [ $^3$ H]-Thymidin-Einbau in Gegenwart von PDGF-BB über einen Zeitraum von 24 h bestimmt.

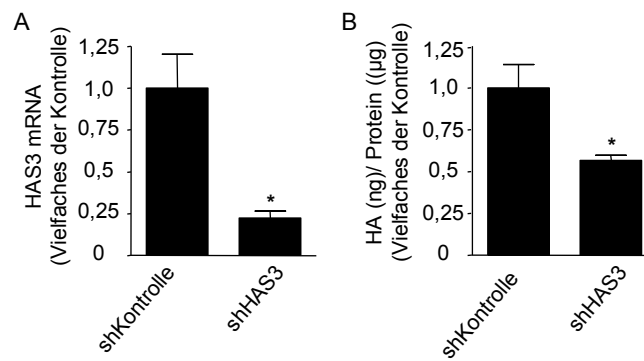
Ein *knock down* der HAS3 verringerte die PDGF-BB stimulierte DNA-Synthese signifikant (**Abbildung 3-13 B**).



**Abbildung 3-13 Reduktion der Migration und Proliferation durch HAS3 siRNA.** VSMC wurden mit Kontroll- oder mit HAS3-siRNA transfiziert. A, nach 48 h wurde die migratorische Aktivität in einer „Boyden-Kammer“ mit PDGF-BB als chemotaktischem Stimulus gemessen. Der Versuch wurde nach 6 stündiger Inkubationszeit beendet. (B) DNA-Synthese wurde durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau gemessen nach Stimulation mit PDGF-BB; n = 3; Mittelwert ±SEM; \*, p < 0,05.

Im Verlauf der Arbeiten zeigte sich, dass die HAS3 siRNA nur die Transfektion kleiner Zellmengen zuließ und zu zeit- und kostenaufwendig war. Als effizientere Methode wurde die virale Transfektion von shRNA etabliert, die gleichmäßige Transfektion größerer Zellmengen erlaubte. In diesem HAS3 knock down System wurde die HAS3 mRNA Synthese auf 20 % und die HA-Synthese auf 50 % reduziert (**Abbildung 3-14**).

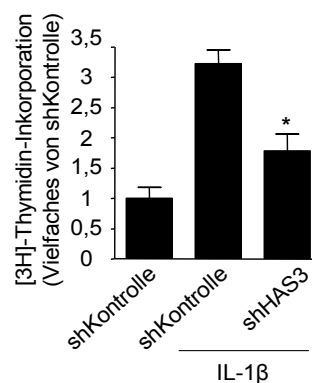
Diese shRNA transfizierten Zellen bestätigten die zuvor gesehenen Ergebnisse in Bezug auf Proliferation und Migration.



**Abbildung 3-14 Etablierung eines lentiviralen HAS3 Knock down mittels shRNA:** A. HAS3 shRNA hemmte die Synthese der HAS3 mRNA und B, die Hyaluronsäureproduktion;  $n = 3-4$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM, \*,  $p < 0,05$ .

Stimulation mit IL-1 $\beta$  erhöht die Proliferationsrate in VSMC, dieses konnte sowohl von uns als auch von anderen gezeigt werden<sup>104,105</sup>. Ob HAS3 synthetisierte HA die mitogenen Eigenschaften von IL-1 $\beta$  in VSMC unterstützt, wurde im folgenden Versuch analysiert.

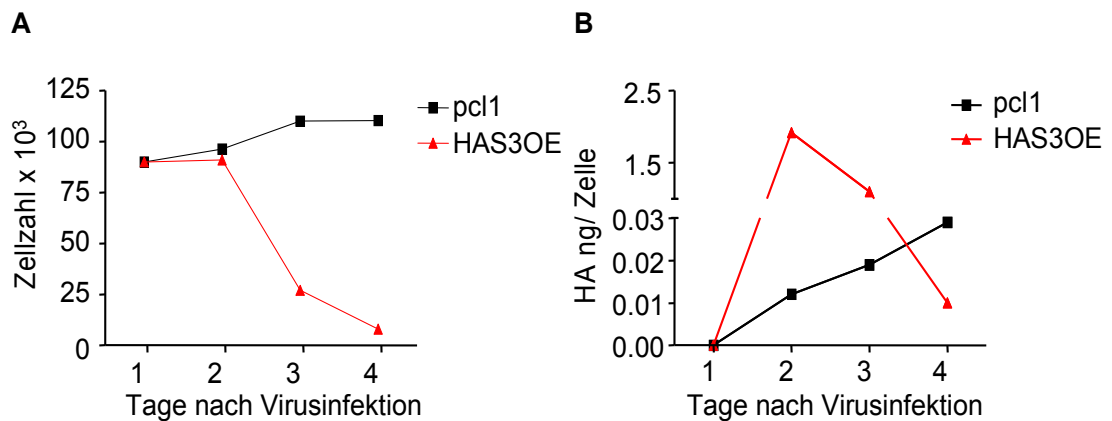
Die spezifische Herabregulation von HAS3 konnte die IL-1 $\beta$  abhängige Proliferation fast vollständig aufheben (**Abbildung 3-15**).



**Abbildung 3-15 Inhibierung der IL-1 $\beta$  induzierten [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation durch shHAS3:** VSMC wurden mit Kontroll-sh-Lentivirus oder mit HAS3-sh-Lentivirus infiziert, nach 3 Tagen wurden die Zellen durch Serumentzug und anschließend mit IL-1 $\beta$  für 24 h stimuliert. Die DNA-Syntheserate wurde anhand des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus ermittelt;  $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM, \*,  $p < 0,05$ .

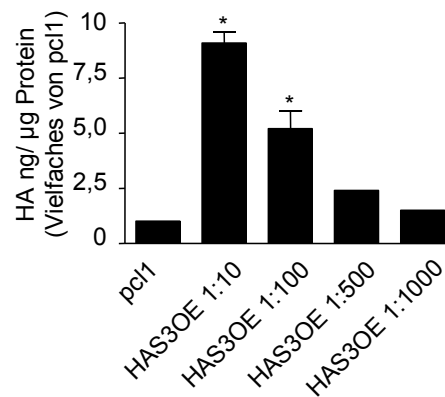
### 3.4.2 HAS3 Überexpression

Zur weiteren Charakterisierung von HAS3, wurde in VSMC HAS3v1 lentiviral überexprimiert. Da es zum jetzigen Zeitpunkt keine kommerziell erhältlichen HAS3 Antikörper gibt, musste die in das Medium sezernierte Hyaluronsäure als Maß für die Transfektionseffizienz dienen. Bei einer zu hohen Konzentration an HAS3OE (Lentivirus mit HAS3-cDNA Plasmid), lösten sich VSMC von der Zellkulturschale ab (**Abbildung 3-16A**). Je größer die Hyaluronsäurekonzentration im Zellkulturüberstand war, desto weniger Zellen konnten gezählt werden (**Abbildung 3-16B**). Möglicherweise konnte hier das Phänomen der Anoikis zugrunde liegen, bei dem durch Kontaktverlust mit dem umliegenden Gewebe bzw. der EZM Apoptose ausgelöst wird.



**Abbildung 3-16 Hyaluronsäure induzierter Zelltod.** VSMC wurden mit HAS3OE-Virus und mit Kontrollvirus infiziert. (A) Zellzahl in einem 24 Stunden Rhythmus und (B) die Hyaluronsäurekonzentration im Medium.

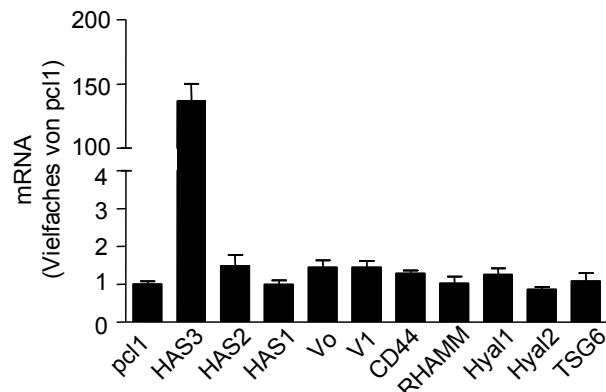
Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde eine Viruskonzentration ermittelt, bei der ein Anstieg der Hyaluronsäuresekretion in den Zellkulturüberstand verzeichnet werden konnte, aber die Zellviabilität nicht abnahm. Dies konnte mit einer Virusverdünnung von 1:100 erreicht werden (**Abbildung 3-17**).



**Abbildung 3-17 HA-Sekretion bei verschiedenen Verdünnungen des HAS3OE-Virus.** 24 Stunden nach Virusinfektion, wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt und nach weiteren 24 h wurde HA im Überstand gemessen und auf Gesamtzellprotein bezogen. Als Kontrolle diente der leere Lentivektor pcl1; n = 1 - 4; Mittelwert  $\pm$  SEM, \*,  $p < 0,05$ .

Die folgenden Versuche zur HAS3-Überexpression wurden mit Lentiviren aus dieser Charge und mit einer Virusverdünnung von 1:100 durchgeführt. Mit dieser Viruskonzentration war es möglich, HAS3 vermittelte phänotypische Veränderungen in VSMC zu analysieren.

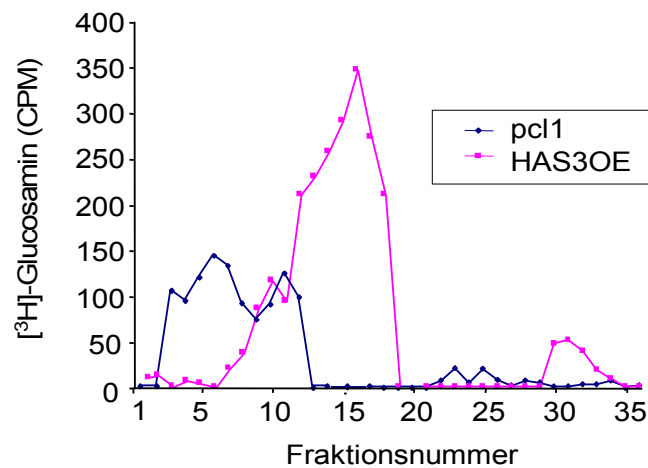
Die Ergebnisse aus *real time* RT-PCR Untersuchungen bewiesen, dass die Überexpression der HAS3 keine Regulation der anderen HAS-Isoenzyme (HAS1, 2) und Vertretern der Hyaladhärine, (Versikan, TSG6, CD44, RHAMM), verursachte (**Abbildung 3-18**). Des Weiteren konnte auch keine mRNA-Regulation der HA abbauenden Enzyme, Hyaluronidase 1 und 2, beobachtet werden. Eine Veränderung auf Proteinebene oder Aktivitätsveränderungen kann nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3-18 Real time RT-PCR nach HAS3-Überexpression.** Die Überexpression von HAS3 in VSMC zeigt keine Ko-Regulation 48 h nach Virusinfektion von HAS1, HAS2, Versikan V0, Versikan V1, CD44, RHAMM, Hyal1, Hyal2 und TSG6,  $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM.

Zur Sicherstellung, dass die unter HAS3OE synthetisierte Kettenlänge der HA im niedermolekularen Bereich liegt, wurde mittels Größenausschlusschromatographie die hydrodynamische Größe der ins Medium sezernierten HA bestimmt. Die von HAS3OE transfizierten VSMC produzierte Hyaluronsäure, wurde später von der Sephacryl-S1000 Säule eluiert, als von mit pcl1 transfizierten Zellen synthetisierten HA (**Abbildung 3-19**).





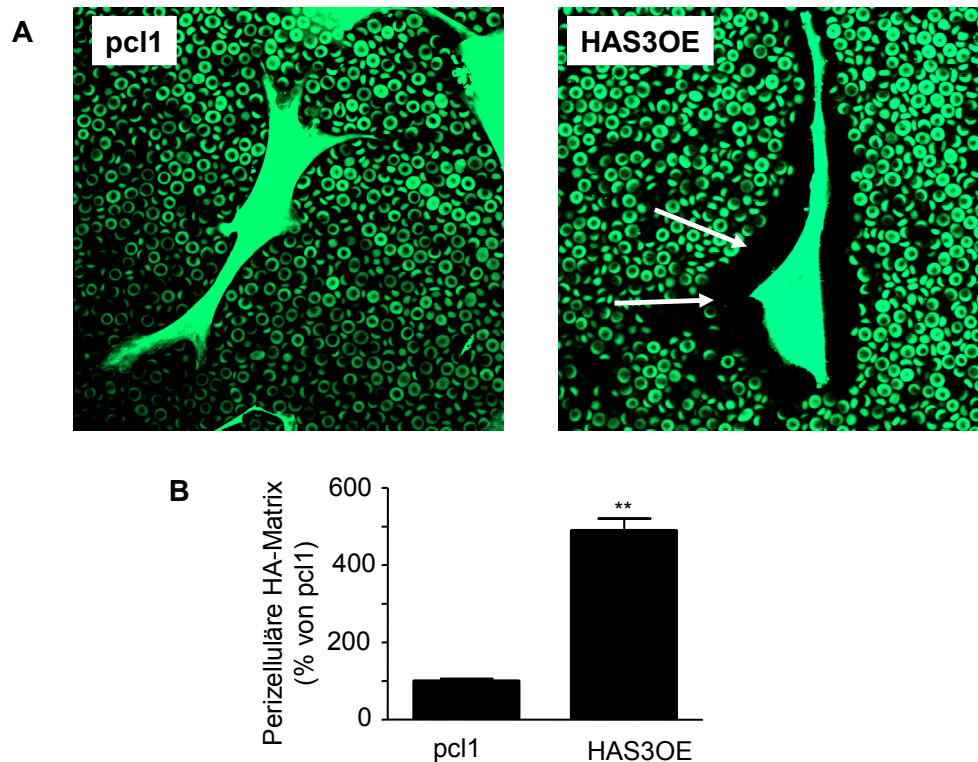
**Abbildung 3-19 Analyse der Größenverteilung der HA nach lentiviraler Überexpression von HAS3.** Die in Folge der HAS3OE synthetisierte Hyaluronsäure, kann als niedermolekular betrachtet werden, da sie im Vergleich zu pcl1 in höheren Fraktionen eluiert wird. Dargestellt ist ein repräsentatives Elutionsprofil von  $n = 3$  Experimenten, auf der Y-Achse wurden die CPM und auf der X-Achse die Fraktionsnummern, bei der HA von der Säule eluiert wurde, dargestellt.

Die Bildung einer perizellulären Matrix spielt eine wichtige und komplexe Rolle bei Vorgängen, die Zelladhäsion und Zellablösung, sowie Zellformveränderung während Proliferation und Migration beinhalten. In Zeitrafferuntersuchungen wurde gezeigt, dass die Bildung einer perizellulären Matrix Ablösungsprozesse und Abrunden während der Mitose erleichtert<sup>86</sup>.

Da die Überexpression von HAS3 keine weiteren Hyaladhärine induzierte, war es fraglich, ob Hyaluronsäure alleine auch in der Lage ist einen perizellulären Mantel aufzubauen.

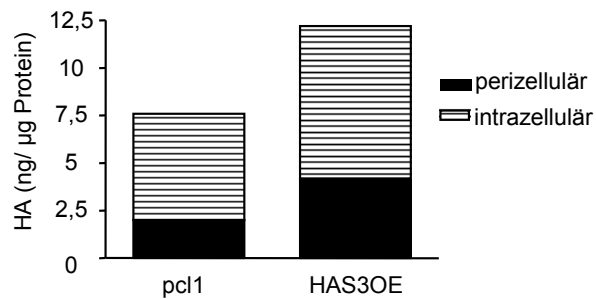
Im Erythrozyten-Assay, das darauf beruht, dass fixierte Erythrozyten durch perizelluläre HA-Matrix ausgeschlossen werden, konnte gezeigt werden, dass die zellassozierte HA in HAS3 transfizierten VSMC stark zunahm. Der Ausschluss fluoreszenz markierter Erythrozyten durch den aus HA aufgebauten Hof ist in **Abbildung 3-20** durch weiße Pfeile gekennzeichnet. In den mit pcl1 transfizierten VSMC konnte dagegen kein perizellulärer Hyaluronsäuremantel sichtbar gemacht werden. Zellfläche und Zellfläche plus perizellulärer

Hyaluronsäurematrix wurden ausgemessen und anschließend durch Subtraktion die Zunahme der Hyaluronsäurematrix berechnet. Die Überexpression von HAS3 in VSMC induzierte eine 5-fache Zunahme des perizellulären HA-Mantels (**Abbildung 3-20 B**).



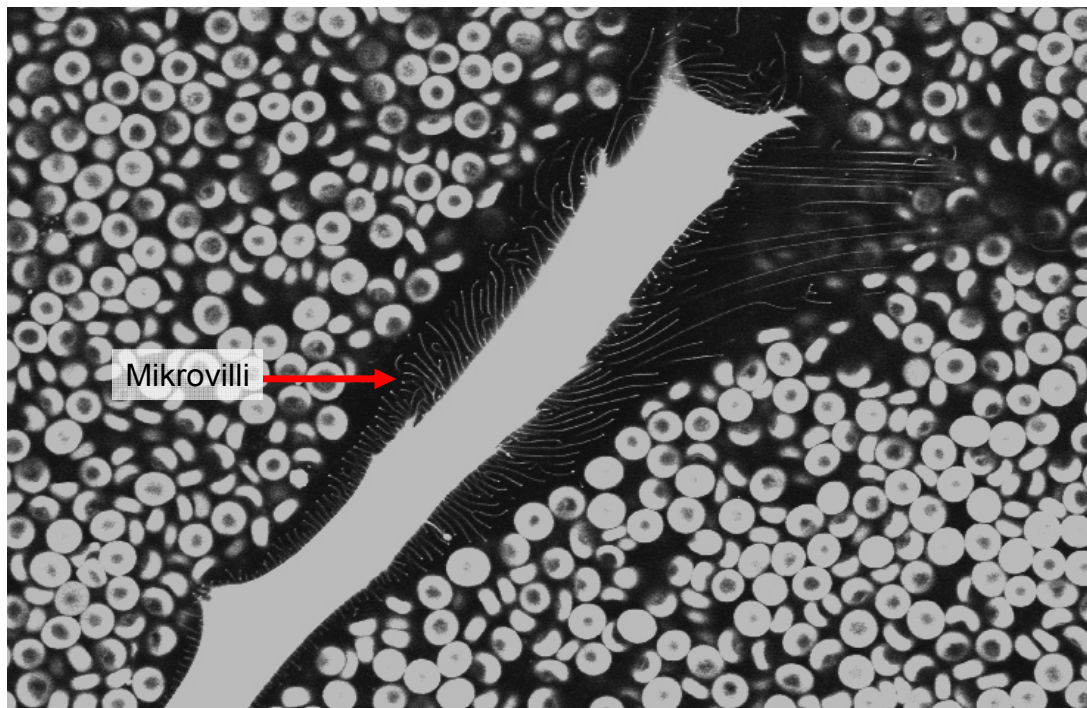
**Abbildung 3-20 Induktion einer HAS3 induzierten perizellulären hyaluronsäurereichen Matrix.** A, zur Visualisierung des HA-Mantels wurden fixierte rote Blutkörperchen im Überschuss auf lebende VSMC pipettiert. Die VSMC wurden 30 min vor Versuchsbeginn mit Calcein Fluoreszenz-markiert. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wurde auf eine Ebene fokussiert, die den HA-Mantel von lebenden Zellen darstellt. C, Quantifizierung der HA-Matrix;  $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM, \*,  $p < 0,01$ .

Zusätzlich wurde die relative HA-Verteilung zwischen dem perizellulären und intrazellulären Kompartiment biochemisch quantifiziert. HAS3OE verdoppelte verglichen mit pcl1 die HA-Akkumulation sowohl im perizellulären als auch im intrazellulären Kompartiment (**Abbildung 3-21**).



**Abbildung 3-21 Verteilung der HA zwischen perizellulären und intrazellulärem Kompartiment:** Die HA-Konzentrationen nach lentiviraler Transfektion der VSMC wurden im perizellulären Kompartiment (HA-Mantel) und im intrazellulären Kompartiment gemessen;  $n = 3$ , Mittelwert.

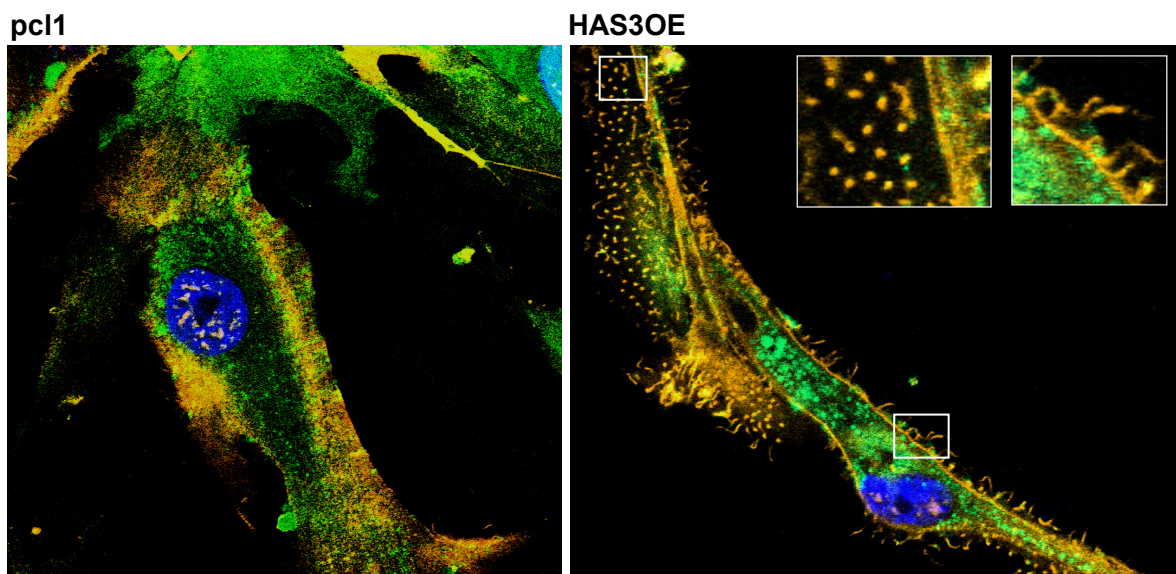
Durch die Fluoreszenz-Färbung der lebenden VSMC mit Calcein konnten in HAS3 überexprimierenden VSMC Zellprotrusionen sichtbar gemacht werden, die fast den gesamten perizellulären HA-Mantel durchzogen (**Abbildung 3-22**). Nach Zugabe von Hyaluronidase zeigte sich, dass durch den Verdau der HA, auch die Zellprotrusionen aufgelöst wurden und die Erythrozyten dem zufolge an den Zellkörper gelangen konnten. Möglicherweise stützen die Mikrovilli ähnlichen Strukturen (Zellprotrusionen) den HA-Mantel mechanisch und formen somit ein „extrazelluläres Skelett“ für die HA-Glykokalyx.



**Abbildung 3-22** *Ausbildung von Mikrovilli-ähnlichen Strukturen in HAS3 überexprimierenden Zellen. Die hyaluronidasesensible perizelluläre Matrix wird von Zellprotrusionen durchzogen gestützt. Die Abbildung ist in schwarz-weiß dargestellt, da so die Zellausläufer deutlicher zu erkennen sind.*

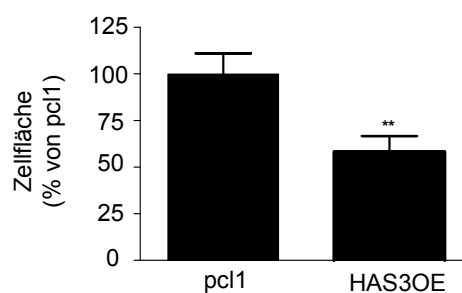
HA beeinflusst durch Interaktionen mit Hyaladhärrinen und HA-Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden, die für die Zellmorphologie bedeutsam sind. In den folgenden Versuchen wurden die Verteilung von CD44 und Hyaluronsäure sowie die Zellgestalt untersucht. Nach Transfektion der VSMC mit HAS3OE-Virus oder pcl1-Virus, wurden immunhistochemische Färbungen der Hyaluronsäure (grün) und des CD44-Rezeptors (orange) durchgeführt. **Abbildung 3-23** zeigt repräsentative konfokale Aufnahmen dieser Färbungen an VSMC. In den HAS3 überexprimierenden Zellen ist möglicherweise eine Umverteilung des CD44-Rezeptors zu erkennen, die mit der veränderten Zellform im Zusammenhang stehen könnte. Im Vergleich zu den HAS3OE VSMC zeigen die Kontrollzellen eine flache und starre Morphologie. Die Zellausbreitung ist bei den Kontrollzellen deutlich verstärkt und das Zytoplasma erscheint im direkten Kontakt mit dem Untergrund. Interessanterweise sind in den fixierten HAS3OE VSMC auch die Mikrovilli-ähnlichen Zellstrukturen durch

ihre positive Anfärbung für den CD44 Rezeptor, zu erkennen.



**Abbildung 3-23 Konfokale Mikroskopie von immuncytochemisch gefärbten VSMC:** CD44 (orange), HA (grün), Zellkern (blau); in den HAS3 überexprimierenden Zellen ist eine auffällige Umverteilung des CD44-Rezeptors zu erkennen, die möglicherweise auf die veränderte Zellform zurückzuführen ist.

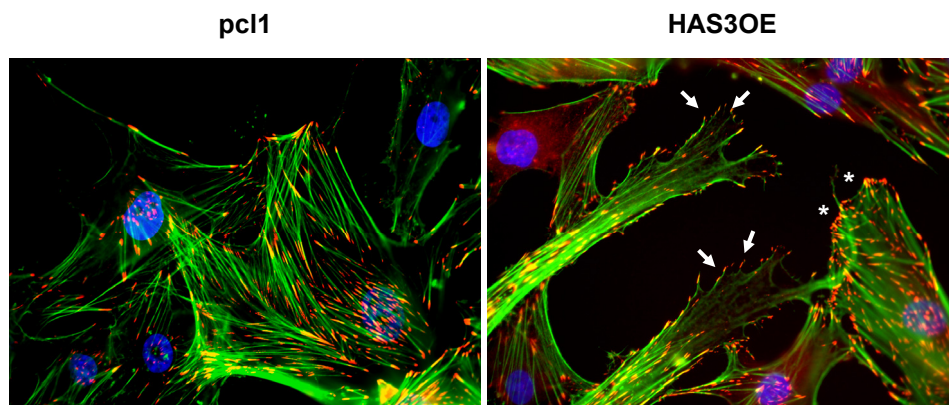
Die Veränderung der Zellgröße ließ sich nach Ausmessung der VSMC statistisch hoch signifikant darstellen (**Abbildung 3-24**). HAS3 überexprimierende VSMC weisen einen kleineren und dynamischeren Zellkörper auf.



**Abbildung 3-24 Zellmorphometrie- kleinere Zellflächen bei HAS3OE:** hVSMC wurden mit Kontroll-(pcl1) oder HAS3OE-Viren transfiziert und anschließend für 48 h in Hungermedium kultiviert. Dargestellt ist die Bestimmung der Zellfläche von n = 3 Experimenten, in jedem Versuch wurden mindestens 20 Zellen ausgemessen; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*.  $p < 0,01$ .

Eine veränderte Zellform weist auch immer auf eine Veränderung des Zytosketts, speziell der Aktinfasern und der fokalen Adhäsionen, hin. Daher wurde in weiteren Analysen die Korrelation zwischen der veränderten Zellmorphologie und Veränderungen im Zytoskelett untersucht. Aktin-Filamente, Bestandteile des Zytosketts, wurden mittels FITC-gekoppeltem Phalloidin visualisiert. Weiterhin wurde Paxillin immunhistochemisch untersucht. Paxillin ist ein Protein des fokalen Adhäsionskomplexes (FA), welches nach Phosphorylierung durch FAK eine Interaktion zwischen der EZM und dem Zytoskelett vermittelt und für nachgeschaltete Signalkaskaden der FA von Bedeutung ist. Wie **Abbildung 3-25** zeigt, kam es zu einer deutlichen Veränderung in der Anordnung des Aktinzytosketts.

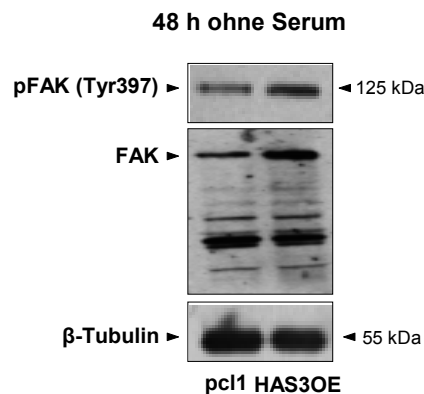
In HAS3 überexprimierenden VSMC scheinen die Aktinfasern (grün) diffuser im Zytoplasma verteilt zu sein, während die Kontrollzellen eine stärkere Ausprägung definiert angeordneter Aktin-Filamente besitzen. Dieser Unterschied könnte ein Hinweis dafür sein, dass die durch HAS3 synthetisierte Hyaluronsäure (HAS3OE) einen erhöhten „turn over“ der Aktinstressfasern induziert. Die Paxillin-Färbung (rot), zeigt zwar keine deutliche Zunahme an fokalen Komplexen, jedoch ist auch hier in HAS3OE Zellen eine veränderte Anordnung der fokalen Adhäsionskomplexe zu sehen. In HAS3OE VSMC können deutlich mehr Zellformationen beobachtet werden, die für die Fortbewegung einer Zelle typisch sind. So wurden nach HAS3-Überexpression verstärkt filopodiale (Pfeil) und lamellipodiale (Kreuz) Strukturmerkmale gefunden, die an ihren Enden für Paxillin positiv gefärbt sind (**Abbildung 3-25**). Auch dieser Befund ist charakteristisch für einen gesteigerten Auf- und Abbau des fokalen Adhäsionskomplexes und möglicherweise eine verstärkte migratorische Aktivität<sup>106,107</sup>.



**Abbildung 3-25 Morphologische Veränderung des Aktinzytoskletts in HAS3OE VSMC.** HAS3OE Zellen weisen eine gesteigerte Organisation des Zytoskletts auf mit induzierten Aktin-Stress-Fasern und ausgebildeten Filopodien (Pfeil) und Lamellipodien (Kreuz). FITC-Phalloidin markierten Aktin-Filamente und Cy3 markiertes Paxillin bei VSMC nach Transfektion mit *pcl1* und HAS3OE 48 h nach Serumentzug.

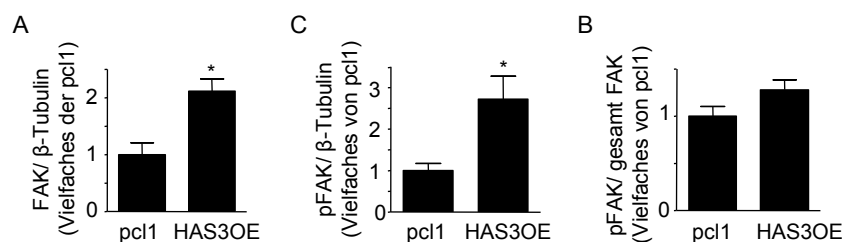
### 3.4.3 Untersuchung der HAS3 vermittelten Signalkaskaden

HA bindet sich überwiegend an die Rezeptoren CD44 und RHAMM. Diese Interaktionen führen häufig zu Aktivierung von Protein-Phosphorylierungskaskaden. Es ist bekannt, dass HA:RHAMM/CD44 Interaktionen die FAK-Aktivität, eine Phosphotyrosinkinase der fokalen Adhäsionen, in Krebszellen regulieren kann<sup>55,61</sup>. Fokale Adhäsionen stellen die Verbindungen zwischen Zytosklett und extrazelluläre Matrix dar. Ruhende Zellen besitzen stabile fokale Adhäsionen und sind fest mit der extrazellulären Matrix verankert. Wandernde Zellen zeigen eine deutlich erhöhte Umsetzung der fokalen Adhäsionen, wodurch eine amöbenartige Bewegung entlang der EZM erlaubt wird. Ob nun die für Bewegungsabläufe der Zelle typischen Filopodien und Lamellipodien in HAS3 überexprimierenden VSMC auf eine vermehrte Phosphorylierung der FAK zurückzuführen sind, wurde durch „Western-Blot“ Analysen untersucht. Da die Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle von FAK am Tyrosin 397 (Y397) der initiale Prozess für die FAK-Aktivierung ist<sup>108</sup>, wurde diese FAK-Phosphorylierung in HAS3OE und in Kontrollzellen mittels Immunoblot dargestellt (**Abbildung 3-26**).



**Abbildung 3-26 HAS3OE induziert Phosphorylierung und hemmt die proteolytische Spaltung der FAK.** VSMC wurden mit *pcl1*- und HAS3OE-Lentiviren transfiziert, und anschließend für 48 h im Medium ohne FCS kultiviert. Die Detektion von phosphoryliertem FAK (pY397; 125 kDa), FAK (125 kDa) und FAK Spaltprodukten, sowie  $\beta$ -Tubulin, als Ladungskontrolle, erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen.

In **Abbildung 3-26** sieht man eine deutlich stärkere FAK-Phosphorylierung in HAS3 überexprimierenden VSMC im Vergleich zu Kontrollzellen (*pcl1*). Da die VSMC für 48 h in serumfreiem Medium kultiviert waren, kann man davon ausgehen, dass HAS3 zu einer verstärkten basalen FAK-Autophosphorylierung beiträgt. Möglicherweise ist ein erhöhtes FAK-Expressionslevel, bzw. ein verringerter Abbau der fokalen Adhäsionskinase dafür verantwortlich, da FAK auch insgesamt in gleichem Maß wie pFAK (**Abbildung 3-27**) zunahm.

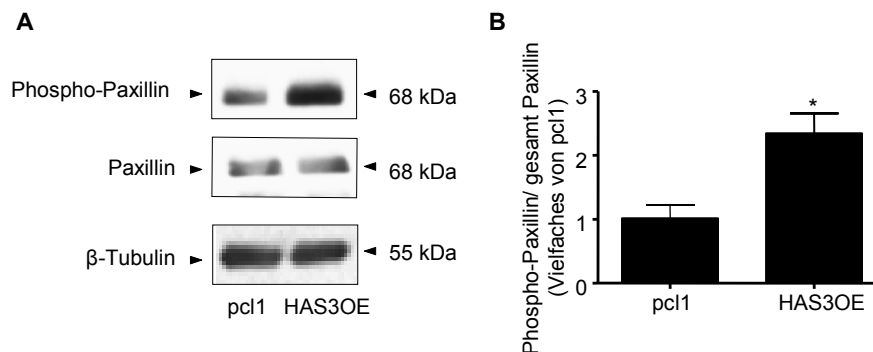


**Abbildung 3-27 densitometrische Auswertung der in Abbildung 3-26 gezeigten Western Blots;** Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , \*,  $p < 0,05$ .

Auch der Western Blot für Phospho-Paxillin zeigt eine deutliche Zunahme der



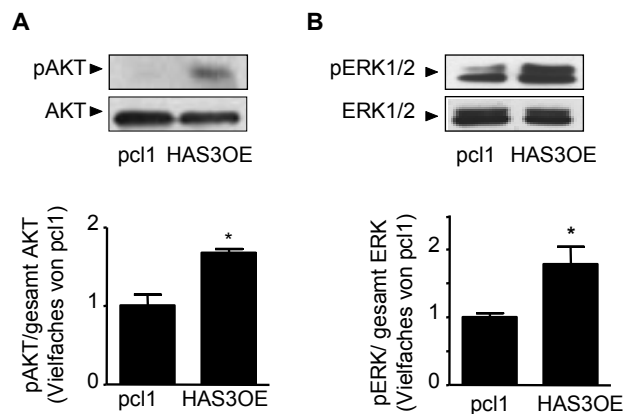
Phosphorylierung bei HAS3OE VSMC verglichen mit *pcl1* transfizierten VSMC (**Abbildung 3-28**). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass von HAS3 synthetisierte Hyaluronsäure Phosphorylierungsreaktionen in FA stimuliert und so nachgeschaltet die Zellmorphologie beeinflussen könnte.



**Abbildung 3-28 Phosphorylierung von Paxillin in HAS3 überexprimierenden VSMC.** 48 h nach Serumentzug wurden die Zellen für Western Blot Versuche lysiert. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Bestimmung der Proteinmenge und des Referenzproteins  $\beta$ -Tubulin gesichert. A, zeigt einen repräsentativen Western Blot und B, die densitometrische Quantifizierung von  $n=3$  Experimenten; Mittelwert  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$ .

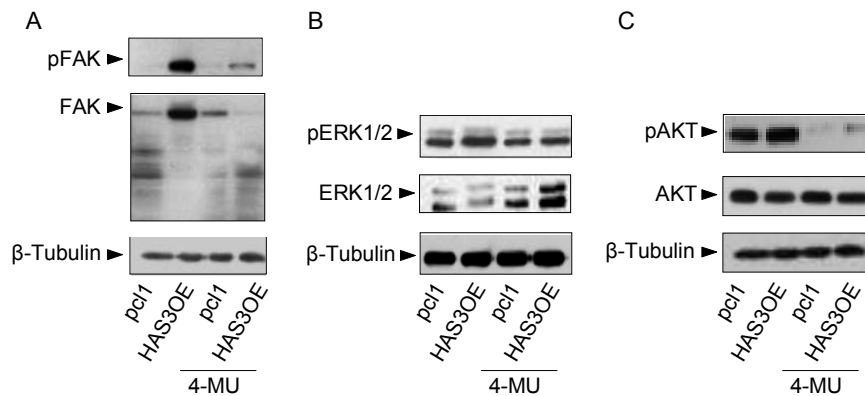
#### 3.4.4 Untersuchung der FAK nachgeschalteten Signalkaskaden

Phosphorylierungen der Serin/ Threonin Kinasen AKT und ERK1/2 sind wichtige Signalmediatoren für die Migration und Proliferation von Zellen. Sie könnten der fokalen Adhäsionskinase nachgeschaltet aktiviert werden. Daher wurden die Phosphorylierungen der AKT und ERK1/2 nach HAS3-Überexpression mittels Western Blot untersucht (**Abbildung 3-29**).



**Abbildung 3-29 HAS3OE induziert AKT- und ERK-Phosphorylierung.** VSMC wurden nach Virusinfektion für 48 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für Western-Blot Versuche lysiert. A und B repräsentative Western Blots und densitometrische Quantifizierung von n=3 unabhängigen Versuchen; A, Phospho-Akt (Ser472) und gesamt Akt; B, Phospho-ERK1/2 und gesamt ERK1/2; Mittelwert  $\pm$  SEM, \*,  $p < 0,05$ .

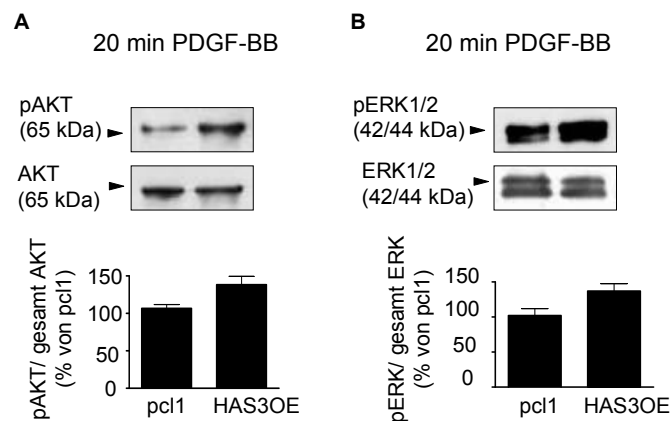
Sowohl AKT- als auch ERK- Phosphorylierungen waren in HAS3 überexprimierenden VSMC erhöht. Um zu beweisen, dass die Aktivierung der FAK-, AKT-, ERK-Phosphorylierung kausal auf eine vermehrte Hyaluronsäuresynthese in HAS3OE VSMC zurückzuführen waren, wurde der Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) eingesetzt. 4-MU wird an Stelle von UDP mit Glukuronsäure verknüpft, so dass eine Inhibition der Hyaluronsäuresynthese resultiert. Erhöhte FAK-Menge und Phosphorylierung von FAK, AKT und ERK wurden durch den Einsatz von 4-MU aufgehoben (**Abbildung 3-30**).



**Abbildung 3-30 4-MU hemmt die HAS3OE vermittelte Signaltransduktion.** VSMC wurden mit *pcl1*- und *HAS3OE*-Virus transfiziert und anschließend mit 4-MU (300 mM) für 24 h behandelt, um die HA-Synthese zu hemmen; dargestellt sind repräsentative Western Blots.

### 3.4.5 HAS3 verstärkt PDGF-BB induzierte Signaltransduktion

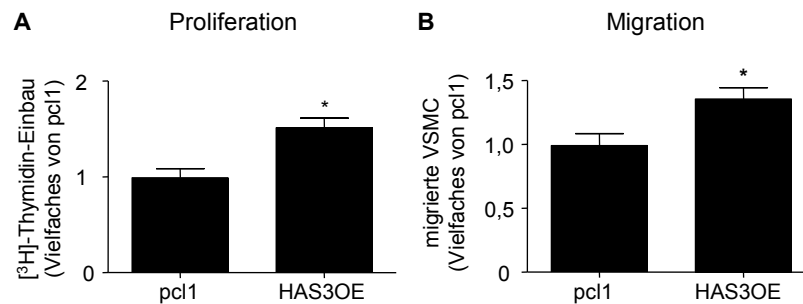
Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die HAS3 Überexpression PDGF-BB abhängige Signaltransduktionen beeinflusst. Da die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors PDGFR auch zu einer Aktivierung der FAK führt und nachgeschaltete Phosphorylierungen an AKT und ERK1/2 induziert, wurden diese Phosphorylierungen nach 20 minütiger PDGF-BB (10 ng/ml) Stimulation in HAS3 überexprimierenden VSMC und in Kontroll-VSMC (*pcl1*) überprüft. HAS3 bewirkte einen zusätzlichen Anstieg der AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung nach PDGF-BB Stimulation (**Abbildung 3-31**).



**Abbildung 3-31** Western Blot Analyse nach 20 minütiger Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml). HAS3OE induzierte eine verstärkte Phosphorylierung nach PDGF-BB Stimulation der AKT (A) und ERK1/2 (B) Kinasen; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 3$ .

### 3.4.6 Regulation von Proliferation und Migration

Da die zuvor beobachteten Effekte bezüglich des Phänotyps von HAS3 überexprimierenden VSMC auch mögliche funktionelle Veränderungen andeuteten, wurde zur weiteren Charakterisierung der Einfluss auf die PDGF-BB-stimulierte Proliferation und Migration (**Abbildung 3-32**) untersucht. Die DNA-Neusynthese wurde mittels  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation nachgewiesen. HAS3OE VSMC zeigten eine signifikant höhere Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen (pcl1) nach 24 h Stimulation mit PDGF-BB. Die migratorische Antwort auf PDGF-BB war in HAS3OE VSMC ebenfalls stärker als in den Kontrollzellen.



**Abbildung 3-32 Überexpression von HAS3 stimuliert die PDGF-BB induzierte Proliferation (24 h) und Migration (6 h) von VSMC.** (A), anhand der Messung des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Thymidin bei der DNA-Neusynthese wurde die Proliferationsgeschwindigkeit beurteilt. Dargestellt ist der auf pcl1 bezogene [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau an mit PDGF-BB stimulierten HAS3 überexprimierenden VSMC. (B), die Bestimmung der migratorischen Aktivität der Zellen erfolgte in einem modifizierten Boyden-Kammer-Versuchsaufbau. Dabei wird die Wanderung der Zellen durch eine mit monomeren Kollagen beschichtete Polycarbonat-Membran gemessen. Als chemotaktischer Stimulus wurde PDGF-BB eingesetzt; n = 3-5, Mittelwert ± SEM; \*, p < 0,05.

### 3.5 Humane atherosklerotische Läsionen

Die Untersuchungen zur Regulation von HAS3 haben gezeigt, dass HAS3 in humanen VSMC durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  via NF $\kappa$ B-Aktivierung die Hyaluronsäuresynthese *in vitro* induziert wird (**Abbildung 3-9**). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen aktivierten Makrophagen und Hyaluronsäureproduktion von VSMC in einem Kokulturanatz hergestellt (**Abbildung 3-10**). In den folgenden immunhistochemischen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* relevant seien könnten.

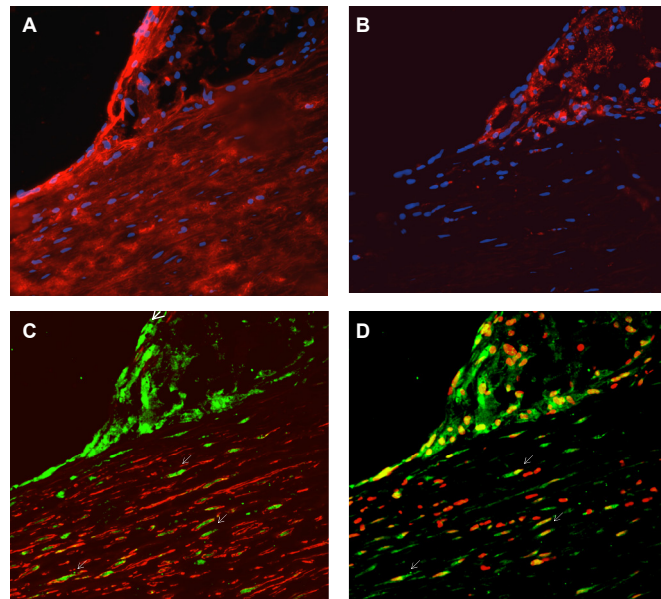
Atherome aus humanen Carotis Arterien, die eine symptomatische atherosklerotische Erkrankung repräsentieren, wurden hinsichtlich der HA-Verteilung, Makrophagen-Akkumulation, VSMC und NF $\kappa$ B (p50) untersucht.

In **Abbildung 3-33** ist die untersuchte Plaqueregion lichtmikroskopisch abgebildet.



**Abbildung 3-33** Lichtmikroskopische Fotografie des untersuchten atherosklerotischen Plaques. Mit dem Kasten ist das Areal markiert, welches nachfolgend immunhistochemisch charakterisiert wurde. Dabei handelt es sich um die inflammatorische Schulterregion des atherosklerotischen Plaques.

**Abbildung 3-34** zeigt Makrophagenakkumulation, die an eine VSMC reiche Neointima angrenzt. HA ist sowohl an der luminalen makrophagenreichen Oberfläche, als auch in der angrenzenden VSMC-reichen Schicht prominent vertreten. Aktivierung von NF $\kappa$ B, was durch die nukleäre Translokation der NF $\kappa$ B-Untereinheit p50 dargestellt wird, kann in der makrophagenreichen Zone und auch in mehreren Zellkernen der neointimalen VSMC beobachtet werden. Interessanterweise, sind die NF $\kappa$ B-positiven VSMC in eine HA-reiche Matrix eingebettet.



**Abbildung 3-34 Humane atherosklerotische Läsion.** Histologischer Schnitt aus einer atherosklerotisch veränderten humanen Arterie. Konsekutive Schnitte einer HA-reichen Region wurden in Hinblick auf NFκB-Aktivierung, VSMC und aktivierte Makrophagen untersucht. A, HA-Färbung (rot); B, Makrophagen (CD68, rot); C, Doppelfärbung von VSMC ( $\alpha$ SM-Aktin, rot) und NFκB (p50, grün); D, der gleich Schnitt wie in B, Kernfärbung (Hoechst 33324) wurde in rot visualisiert, um in einer Doppelfärbung mit dem Zellkern assoziiertes NFκB (p50, grün) in gelb erkennbar zu machen; die Pfeile zeigen nukleares p50 in VSMC; Original Vergrößerung 40fach.

Die räumliche Nähe zwischen NFκB-Aktivierung bei Makrophagen und VSMC ist mit der Vorstellung vereinbar, dass Zytokine, die von Makrophagen freigesetzt werden, die VSMC parakrin stimulieren. Die Tatsache, dass VSMC und Makrophagen in einer HA-reichen Matrix liegen, ist vereinbar mit der Zytokin stimulierten HA-Synthese durch VSMC. Allerdings sind diese Befunde assoziativ und belegen keine Kausalität.

## 4 Diskussion

Vergangene Arbeiten haben gezeigt, dass Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Gefäßerkrankungen einnehmen. So liegt der atherosklerotischen Plaqueeentwicklung eine chronische Entzündung der Gefäßwand zugrunde. Hierbei kommt es nach Aktivierung der Endothelzellen zu einer verstärkten Adhäsion von Entzündungszellen, wie Monozyten und T-Zellen, an der Gefäßwand. In den subendothelialen Raum eingewanderte Monozyten differenzieren unter dem Einfluss von Lipoproteinen und Zytokinen zu Makrophagen. Damit gekoppelt ist eine Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen von einem kontraktilen, stationären zu einem sekretorischen Phänotyp. Dieser ist durch vermehrte Matrixproduktion, eine gesteigerte Proliferation und Migration charakterisiert. Für das verletzte Gefäß bedeutet dies, dass VSMC von der Media in die Neointima wandern bzw. proliferieren. Diese phenotypische Veränderung von VSMC ist assoziiert mit einem Hyaluronsäureanstieg. Die Bedeutung der HA und der Hyaluronsäuresynthesen ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Somit könnte eine Aufklärung der molekularen Mechanismen zur Regulation und Funktion der extrazellulären Matrix ein Fortschritt für die Arzneimittelentwicklung bedeuten oder die Diagnose von klinisch bedrohlichen Formen und Phasen der Atherosklerose (z.B. vulnerable Plaques) verbessern. Im Fokus dieser Arbeit standen die Wirkungen von proinflammatorischen Zytokinen auf die Hyaluronsäuresynthesen/ Hyaluronsäure und Korrelation von Makrophageninvasion mit Hyaluronsäureproduktion, sowie die funktionelle Charakterisierung der HAS3 an humanen VSMC.

### 4.1 Zytokin vermittelte HA-Induktion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen und



proatherogenen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  die Hyaluronsäureproduktion in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) induzieren. IL-6, das in atherosklerotischen Läsionen von Makrophagen, Endothelzellen und SMC synthetisiert wird<sup>109</sup>, regulierte unter diesen Versuchsbedingungen die HA-Synthese nicht. Auch IL-10, ein Zytokin, das die NF $\kappa$ B Aktivität hemmt, konnte die Hyaluronäuresezernierung nicht beeinflussen. Da IL-1 $\beta$  die HA-Synthese am stärksten induzierte, wurde die IL-1 $\beta$  abhängige Hyaluronsäureinduktion in weiteren Versuchen detaillierter untersucht.

## 4.2 Einfluss der Zytokine auf die HAS-Isoform Expression

In einem Zeitverlauf, zeigte sich eine Stimulation der HA-Synthese über 36 h durch IL-1 $\beta$ . Bereits nach 12 h war der überwiegende Anteil der HA-Sekretion durch IL-1 $\beta$  zu verzeichnen. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, IL-1 $\beta$  könnte möglicherweise die Aktivität der Hyaluronsäuresynthasen (HAS1, 2, 3) direkt aktivieren oder die Stabilität der HAS-Isoformen erhöhen. Jedoch konnte durch Hemmung der Transkription mit Aktinomycin D die Stimulation der Hyaluronsäuresekretion in den Zellkulturüberstand vollständig aufgehoben werden. Folglich wurden mittels *real-time* RT-PCR die Expressionen der HAS1, -2 und -3 in VSMC nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Induktion der HAS3 mRNA mit einem Anstieg der HA-Produktion korrelierte, während HAS1 und -2 nicht durch IL-1 $\beta$  reguliert wurden. Die Zeitabhängigkeit der HAS3-mRNA Induktion nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Maximale HAS3 mRNA-Level konnten 3 und 6 Stunden nach IL-1 $\beta$ -Zugabe erzielt werden. Unter physiologischen Bedingungen ist IL-1 $\beta$  nur im pikomolaren Konzentrationen im Blut nachweisbar und dort nicht direkt gemessen werden kann. Es genügen jedoch schon nanomolare Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , um Reaktionen wie Fieber, einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der Thrombozyten, der Akute-Phase-Proteine und des zirkulierenden Interleukin-6 zu bewirken. Auch die HAS3 mRNA wurde durch geringe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen induziert. Da aber ein robuster signifikanter HAS3-Anstieg erst bei 10 ng/ml reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Versuche nach drei stündiger

Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) durchgeführt.

Erhöhte HA-Plasmaspiegel wurden schon mit anderen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, Periodontitis, Skleroderma, Psoriasis und entzündlichen Darmerkrankungen<sup>110</sup>, assoziiert. INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) stimulierten HA-Synthese in orbitalen Fibroblasten<sup>111</sup>. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  erhöhten HA-Sekretion in synovialen Fibroblasten<sup>112</sup>, dermalen Fibroblasten<sup>113,114</sup>, Lungen-Fibroblasten<sup>115,8,116</sup>. Besonders bemerkenswert ist, dass die durch Zytokine induzierte Hyaluronsäure, nicht immer auf eine transkriptionelle Induktion der HAS3 mRNA zurückzuführen war. In der Arbeit von Wilkinson *et al.* 2004, wurde die synergistische Interaktion zwischen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , die zu einer Aktivierung der HAS2 Transkription in Lungenfibroblasten führte, betont<sup>117</sup>. In mesenchymalen Zellen induziert IL-1 $\beta$  massiv HAS2 mRNA und nur leicht die HAS3 mRNA Expression<sup>110</sup>.

Diese Ergebnisse sprechen für eine große Anzahl an Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren in der Signaltransduktion, welche die Expression der HAS-Isoenzyme steuern. Des Weiteren scheint die transkriptionelle Regulation der HA-Synthasen gewebe- bzw. zellspezifisch zu sein. Dass IL-1 $\beta$  in humanen glatten Gefäßmuskelzellen ausschließlich HAS3 induziert, konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden.

### 4.3 Mechanismus der Zytokin abhängigen HAS3-Regulation

IL-1 $\beta$  bindet an den membranständigen IL-1-Rezeptor Typ I und aktiviert nachfolgend den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B oder über die p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) eine Reihe weiterer Phosphorylierungsreaktionen, die zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 führen<sup>118</sup>. In diesem Zusammenhang sollte nun ermittelt werden, ob HAS3 über eine Aktivierung von NF $\kappa$ B induziert wird.

VSMC wurden mit Dexamethason, einem unspezifischen NF $\kappa$ B-Inhibitor und BAY, einem spezifischen NF $\kappa$ B-Inhibitor, vorinkubiert und anschließend mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Beide Substanzen konnten sowohl die IL-1 $\beta$  abhängige HA-

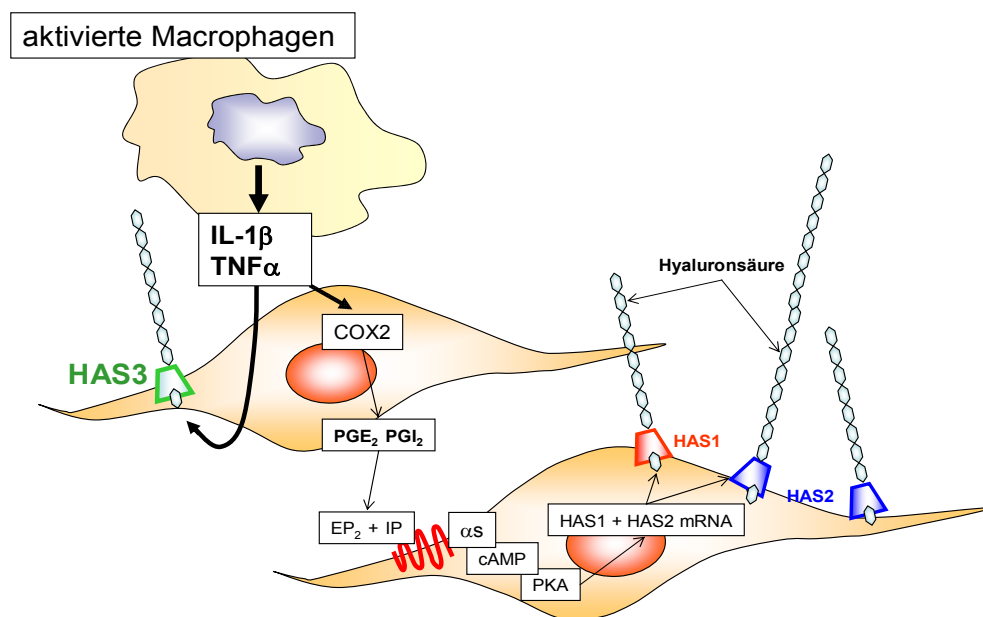
Sekretion als auch die HAS3 mRNA Induktion aufheben. Zusätzlich gestützt werden diese Ergebnisse durch die Analyse der proximalen Promotorregion von HAS3, die potentielle Bindungstellen für den NFκB Transkriptionsfaktor nachweisen<sup>3</sup>.

Daher ist die NFκB abhängige Aktivierung der HAS3 Transkription sehr wahrscheinlich. Interessanterweise sind diese NFκB Bindungstellen auch im Promotor von HAS1 und HAS2 zu finden. Dieses könnte möglicherweise erklären, warum in anderen Zellarten, Zytokine auch HAS1 und 2 mRNA regulieren können.

Die Vermutung, dass *in vivo* die in die Intima eingewanderten Makrophagen eine Hauptquelle für die Zytokinproduktion sind, und diese Zytokine die HA-Produktion in VSMC induzieren, lag nahe. Ob sich dieser Zusammenhang auch *in vitro* darstellen ließ, wurde mit Hilfe eines Kokultursystems überprüft. In diesem Versuchsansatz wurden humane Makrophagen und humane VSMC kokultiviert. Da Makrophagen und VSMC durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt vorlagen, kam es durch Diffusion zu einem Austausch parakriner Faktoren zwischen beiden Zelltypen. Die Makrophagen wurden zuvor aktiviert, sodass sie im Nanogrammbereich IL-1β und TNFα synthetisierten<sup>119</sup>. Nach 24-stündiger Kokultivierung konnte ein signifikanter Anstieg der HAS3 mRNA in den VSMC nachgewiesen werden. Zur Untersuchung, ob tatsächlich IL-1β und TNFα für die HAS3 Induktion verantwortlich waren, wurden unter gleichen Versuchsbedingungen neutralisierende Antikörper gegen IL-1β und TNFα eingesetzt. Zusätzlich wurde die IL-1β und TNFα nachgeschaltete NFκB-Aktivierung durch Bay (der spezifische NFκB-Inhibitor) gehemmt. Nur eine Kombination aus den neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1β und TNFα oder die Blockierung von NFκB konnten die HAS3 mRNA-Induktion durch aktivierte Makrophagen vollständig aufheben. Dieser Versuch verdeutlicht, dass eine parakrine Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen die Produktion von HA in VSMC stimulieren können und so möglicherweise auch den Phänotyp von VSMC beeinflussen können.

Untersuchungen zur Charakterisierung der Neointima von humanen,

atherosklerotischen Plaque der *Arteria Carotis* nach Atherektomie, zeigten erst kürzlich eine Kolo-kalisation zwischen Hyaluronsäure, Makrophagen, Cyclooxygenase 2 (COX 2) und VSMC. Zusätzlich wurde in Zellkulturversuchen eine Induktion von HAS1 und HAS2 durch die Prostaglandine PGE<sub>2</sub> und Prostazyklin in humanen VSMC nachgewiesen (HAS3 wurde durch Prostaglandine nicht reguliert)<sup>22</sup>. Die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen könnte zu einer schnellen HAS3-abhängigen Hyaluronsäureinduktion und gleichzeitig zu einer COX-2 Induktion führen. Nachgeschaltet induziert das COX-2-abhängig gebildete PGE<sub>2</sub> eine Hyaluronsäuresekretion über HAS1 und HAS2. Dieser Mechanismus, der auch in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt ist, könnte die massive und anhaltende Hyaluronsäureproduktion in atherosklerotischen Läsionen erklären.



**Abbildung 4-1 Modell der Hyaluronsäureinduktion in inflammatorischen Plaque.** Aktivierte Makrophagen sezernieren Zytokine, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , die zu einer akuten Induktion der HAS3 in VSMC führen und die COX-2-Expression erhöhen. Die erhöhte COX-2-Expression induziert nachgeschaltet und längerfristig über ProstaglandinE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) die Expression von HAS1 und HAS2. Diese zweistufige und anhaltende Stimulation der HAS-Expression durch Zytokine und Prostaglandine könnte für die vermehrte HA-Sezernierung in atherosklerotischen Läsionen verantwortlich sein.

## 4.4 Charakterisierung der durch IL-1 $\beta$ induzierten HA

### 4.4.1 IL-1 $\beta$ induziert nicht die Zunahme der perizellulären HA-Matrix

IL-1 $\beta$  stimulierte nicht den Aufbau von großen hyaluronsäurereichen perizellulären Mänteln. Dies konnte sowohl im Versuch mit fixierten Erythrozyten, als auch durch Messung der HA in der perizellulären Fraktion nachgewiesen werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass neben der HA auch die Ansammlung von Proteoglykanen für die Bildung des perizellulären HA-Mantels notwendig sind<sup>120</sup>. Die gegenseitige Abstoßung des negativ geladenen Chondroitinsulfates in diesen Proteoglykanen zwingt die ebenfalls negativ geladene perizelluläre HA zu einer gestreckten, ausgedehnten Form und verhindert damit eine Verknäulung der HA auf der Oberfläche der Zellmembran. Durch diese Interaktionen zwischen HA und Proteoglykanen können große perizelluläre HA-reiche Strukturen gebildet werden. In Fibroblasten und SMC ist Versikan das vorherrschende HA-bindende Proteoglykan<sup>121,122</sup>. Da IL-1 $\beta$  die mRNA Stabilität von Versikan hemmt<sup>123</sup>, könnte dies eine Erklärung sein für den fehlenden HA-Mantel nach IL-1 $\beta$  Stimulation. PDGF-BB, ein prominenter Wachstumsfaktor in der Pathogenese der Atherosklerose, induziert Versikan<sup>90,124,125</sup> und könnte *in vivo* die IL-1 $\beta$  abhängige Versikan-Hemmung egalisieren und folglich mit der Hyaluronsäure perizelluläre HA-Mäntel aufbauen.

Die intrazelluläre Hyaluronsäurekonzentration in VSMC wurden durch IL-1 $\beta$ -Stimulation signifikant erhöht. In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ ) die Expression des CD44 Rezeptors induzieren<sup>126</sup>. Eine erhöhte CD44 Expression führte wiederum zu einer vermehrten Hyaluronsäureinternalisierung<sup>10</sup>. Diese Befunde erklären möglicherweise den intrazellulären Hyaluronsäureanstieg nach IL-1 $\beta$ -Stimulation. Man könnte sogar spekulieren, dass dieser intrazelluläre Hyaluronsäureanstieg -durch Aktivierung des intrazellulären RHAMM- die proliferativen Eigenschaften von IL-1 $\beta$  in VSMC unterstützt oder sogar induziert.

#### 4.4.2 IL-1 $\beta$ induziert niedermolekulare HA-Polymere

Unter physiologischen Bedingungen besteht die Hyaluronsäure aus 2000-25000 Disaccharideinheiten mit einem Molekulargewicht von  $1-10 \times 10^6$  Da<sup>2</sup>. Es ist auch bekannt, dass die biologischen Effekte der HA nicht nur von HA-Konzentrationen, sondern auch von ihrer molekularen Masse abhängig sind<sup>127</sup>. *In vitro* Experimente zeigten, dass kleine HA-Oligosaccharide Proliferation und Migration von Zellen fördern<sup>128,129</sup>. Für Krebszellen bedeutet dies eine erhöhte Invasivität und Bösartigkeit. Lange HA-Ketten sollten hingegen eine anti-inflammatorische, -proliferatorische und -migratorische Wirkung gemein sein<sup>91</sup>. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass typischerweise HA-Polymere von circa  $2 \times 10^6$  Da in verletzten Gefäßen akkumulieren.

Mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie sollte nun bestimmt werden, in welcher Größenordnung die durch IL-1 $\beta$  induzierte HA vorliegt. Als zusätzliche Kontrolle diente die Aufarbeitung des Zellkulturüberstandes von VSMC, die zuvor mit PDGF-BB für 24 h inkubiert wurden. PDGF-BB induzierte nämlich in VSMC ausschließlich HAS2 mRNA Expression<sup>22</sup>, die bekanntlich im Vergleich zur HAS3 höher molekulare HA synthetisiert<sup>8</sup>. Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  wurden im direkten Vergleich mit unbehandelten Zellen, aber auch im Vergleich zu mit PDGF-BB inkubierten Zellen, HA mit geringerem Molekulargewicht identifiziert. Die HA-Kettenlänge könnte bei Adhäsionsprozessen von z.B. Monozyten von Bedeutung sein. Höher molekulare HA, wie sie von HAS1 und -2 produziert werden, binden signifikant mehr Monozyten, als die von HAS3 sezernierten kürzeren HA-Ketten<sup>89</sup>.

#### 4.5 Funktionsanalyse der HAS3 an humanen glatten Gefäßmuskelzellen

In den zuvor durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass ausschließlich HAS3 durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in humanen VSMC induziert wurde. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  werden in der inflammatorischen Phase der progredienten Atherosklerose vermehrt durch infiltrierenden Makrophagen abgegeben. Somit

könnte die HAS3 Induktion, als Folge einer Makrophageninvasion angesehen werden. Die funktionelle Bedeutung von HAS3 in human glatten Gefäßmuskelzellen sollte daher detaillierter untersucht werden. Eine Möglichkeit die Funktion einzelner Gene zu untersuchen, bietet neben der Erzeugung eines transgenen oder Gen-defizienten Tieres *in vivo*, die RNA-Interferenz-Technologie. Mit dieser Methode kann auch in Zellkulturexperimenten eine transiente Hemmung eines spezifischen Gens erzielt werden. Dabei können kurze siRNA Komplexe aus „sense“ und „antisense“ Oligonukleotiden verwendet werden. Alternativ können auch die „sense“ und „antisense“ Nukleotide mit einer Oligonukleotidbrücke verbunden werden und in einem viralen Expressionsvektor kloniert werden. Diese Technik wird shRNA genannt, weil die Oligonukleotidbrücke eine Haarnadelschleife bildet (sh = *small hairpin*) und somit den „sense“ und „antisense“ Sequenzen erlaubt, sich komplementär zusammenzulagern. Diese Methode wurde ebenfalls benutzt in Form lentiviraler Transfektion. Komplementär zur gezielten Reduktion der HAS3 mRNA mittels siRNA und shRNA wurde in dieser Arbeit auch die Überexpression von HAS3v1 mittels eines lentiviralen Vektors gewählt.

Die siRNA- und shRNA-Sequenzen wurden so gewählt, dass die HAS3v1 und nicht die Splicevariante HAS3v2 herabreguliert wurde. Zur Überexpression wurde ebenfalls die cDNA von HAS3v1 ausgewählt, weil HAS3v1 die Splicevariante ist, die plasmamembranständig die HA-Synthese vermittelt. Die Funktion der HAS3v2 ist unbekannt. In den nachfolgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zu den drei molekularbiologischen Strategien zur gezielten Modulation der HAS3v1 Expression an VSMC dargestellt. Dabei wurden sowohl phänotypische und funktionelle Aspekte als auch die HAS3-abhängige Signaltransduktion untersucht.

#### **4.5.1 HAS3 unterstützt die Migration von humanen VSMC**

Da die HAS3-vermittelte Wirkung auf den glattmuskulären Phänotyp weitgehend unbekannt war, wurden mit Hilfe der siRNA-Technik in funktionellen

Analysen HAS3-spezifische Effekte auf VSMC untersucht. Mittels HAS3 siRNA wurde eine durchschnittlich 50 %-ige Hemmung der HAS3 mRNA erzielt.

Die Wanderung von VSMC aus der Media in die Intima/ Neointima stellt einen wichtigen Schlüsselprozess während der Pathogenese der Artherosklerose dar. Schematisch lässt sich die Zellmigration in drei Schritte einteilen. Für die vorwärts Bewegung der Zelle bilden sich lamellenartige Strukturen (Lamellipodien und Filopodien) in der Plasmamembran aus, und geben so die Richtung der Bewegung vor. Lamellipodien sind Ausstülpungen der Zellmembran, sie sind flach und breit angelegt. Sie befinden sich am Leitsaum der Membran und bestehen aus netzwerkartig polymerisiertem Aktin. Im Gegensatz zu den breit angelegten Lamellipodien ragen Filopodien fingerförmig aus der Zelle heraus. Filopodien werden auch durch das Aktinzytoskelett, welches jedoch bei den Filopodien parallel angeordnet ist, gebildet. Nachdem das Lamellipodium bzw. Filopodium Kontakt mit der EZM aufgenommen hat, bilden sich spezifische Strukturen aus, die Adhäsionskomplexe genannt werden. Solche fokalen Adhäsionskomplexe werden durch Interaktionen von Integrinen und EZM-Molekülen geformt und gefestigt. Eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, die zum Teil durch G-Proteine und Tyrosinkinase gesteuert werden, enden in einer Polymerisation und Quervernetzung der Aktinfilamente mit anschließender Myosinkontraktion. Die Aktivierung kleiner G-Proteine, GTPasen (Ras/Rho), Cdc42, fokale Adhäsionskinase (FAK), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC) und *mitogen-activated protein kinase* MAPK (ERK1/2) werden mit einer Migrationsinduktion assoziiert.

Die Stimulation der Zellmigration durch Hyaluronsäure wurde mehrfach beschrieben. Bereits 1987 wurde eine Verbindung zwischen Hyaluronsäure, CD44-Rezeptor, RHAMM und Zellbewegung beschrieben<sup>52,129,130</sup>. Itano konnte zeigen, dass die Überexpression der HAS1, -2 und -3 in Ratten 3Y1-Zellen zu einer Zunahme der Migration führten, die in HAS2 überexprimierenden Zellen am deutlichsten ausgeprägt war<sup>8</sup>. Die Funktion der HA und der HAS3 in Bezug auf Zellbeweglichkeit, wird besonders ausführlich an Krebszellen untersucht, da zum einen die HAS3 in diesen Zellen sehr stark exprimiert wird, und zum



anderen die Tumorinvasivität mit HA und besonders HAS3 assoziiert ist<sup>131,132</sup>. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in verschiedenen Zelltypen durch eine Reduktion der Hyaluronsäuresynthesen auch immer eine Abnahme der Migration beobachtet werden konnte<sup>131,8</sup>. In VSMC wurde hingegen von Wilkinson<sup>89</sup> gezeigt, dass auch eine Überexpression von HAS3 zu einer Abnahme der migratorischen Aktivität führen kann. Wie sich eine Abnahme der HAS3 auf den migratorischen Phänotyp von humanen VSMC auswirkt, wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Im Folgenden wurde deshalb die Bedeutung der HAS3 für die Zellbewegung evaluiert.

PDGF-BB ist der potenteste chemotaktische Stimulus für die Migration von VSMC in der Zellkultur. Man geht davon aus, dass PDGF-BB auch in Tiermodellen und der humanen Atherosklerose eine wichtige Rolle für die Wanderung von VSMC aus der Media in die Intima spielt<sup>69</sup>.

Daher wurde für Migrationsversuche PDGF-BB als chemotaktischer Stimulus verwendet. Die PDGF-BB induzierte Migration wurde in VSMC durch eine ca. 50 %-ige Abnahme der HAS3 mRNA signifikant reduziert. Dieser Befund legt nahe, dass die HAS3 eine wichtige regulatorische Funktion bei der Migration von VSMC einnimmt. Möglicherweise ist dieser hemmende Effekt auf eine Abnahme der perizellulären HA-Matrix und folglich einer verminderten Interaktion zwischen Hyaluronsäure und CD44 bzw. RHAMM zurückzuführen.

#### **4.5.2 HAS3 fördert die Proliferation humaner VSMC**

Während der embryonalen Entwicklung weisen VSMC einen ausgeprägten vielseitigen Phänotyp auf, der unter anderem durch ein schnelles Wachstum charakterisiert ist. Im erwachsenen Alter wird ein ruhender, differenzierter VSMC Status aufrechterhalten. Erst durch pathophysiologische Veränderungen der Gefäße treten VSMC wieder in einen proliferativen Status ein und fördern somit die Progression einer Neointimahyperplasie. Gefäßverletzungen, Wachstumsfaktoren und Zytokine fördern die Hyaluronsäuresynthese in VSMC<sup>17</sup>. Interessanterweise sind diese VSMC positiv für den

Proliferationsmarker PCNA. Es konnte nachgewiesen werden, dass der HA in unterschiedlichen Stadien der Zellteilung eine wichtige Rolle zukommt<sup>16</sup>. Eine Reduktion der Hyaluronsäureakkumulation oder Hyaluronsäuresynthasen führte unabhängig vom Zelltyp immer zu einer Abnahme in der Proliferationsrate.

Gegenwärtig werden Interaktionen zwischen HA und den Rezeptoren CD44 und RHAMM diskutiert, die die Induktion der Proliferation vermitteln könnten. Diese zuvor beschriebenen Beobachtungen beruhen auf der endogenen Hyaluronsäuresynthese. Werden SMC jedoch mit exogen hergestellten Hyaluronsäuremolekülen behandelt, so differieren die biologischen Effekte stark mit der Hyaluronsäurekettenlänge. HMW-HA wirkt antiproliferativ, intermediäre HA-Ketten induzieren Zellteilung, und HA-Oligomere sind wiederum proliferationshemmend, möglicherweise durch Konkurrenz mit endogener HA an den HA-Rezeptoren.

Die Klärung der Bedeutung der HAS3 für die Proliferation von humanen VSMC steht noch aus.

Somit war es Ziel, die Auswirkungen eines HAS3 *knock-down* in Bezug auf die VSMC Zellteilung zu untersuchen. Eine Reduktion der HAS3 hemmte die PDGF-BB induzierte Zellteilung signifikant. Es ist erstaunlich, dass die verbleibenden HAS-Isoformen (HAS1, 2) den nur 50 %-igen Verlust der HAS3 nicht ausgleichen. Möglicherweise spielen die HA-Größenverteilung, die HA-Menge, die HA-Verteilung zwischen den perizellulären und extrazellulären Kompartimenten für die biologischen Effekte eine so wichtige Rolle, dass schon „kleinste“ Veränderungen das HA-System aus dem Gleichgewicht bringen, und funktionell *andere* Signalkaskaden induzieren.

#### **4.5.3 Überexpression von HAS3v1**

Die Konsequenzen einer vermehrten HA-Produktion wurden bereits durch Manipulation der HAS-Enzyme in verschiedenen Zelltypen untersucht. Die meisten Untersuchungen wurden in Krebszelllinien durchgeführt, da eine erhöhte HA-Synthese schon seit langer Zeit mit bösartigen Tumoren assoziiert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeiten scheinen jedoch zum Teil widersprüchlich

zu sein. In Fibrosarkoma-Zelllinien und Melanomzellen wurden durch die Überexpression von HAS1 und HAS2 die Tumorgenität und Metastasierung erhöht<sup>133</sup>. Liu *et al.* überexprimierten HAS3 in TSU-Prostata-Krebszellen und erzielten erhöhtes Zellwachstum<sup>134</sup>. Hingegen zeigten Itano<sup>9</sup>, Enegd<sup>135</sup> und Simpson<sup>131</sup>, dass eine vermehrte Hyaluronsäuresynthese zu einer Abnahme der Metastasierung, Angiogenese oder Tumorproliferation führte. Die Überexpression der Hyaluronsäuresynthasen in VSMC aus der Ratte hemmte ebenfalls das Zellwachstum und die Migration<sup>89</sup>.

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Phänotypen könnte auf einer unterschiedlichen Hyaluronsäure-Quantität und Zelldichte sowie Unterschiede in der Rezeptorexpression beruhen. Moderate HAS Überexpressionen wirkten Tumorwachstum-fördernd, während übermäßige HA-Produktionen antiproliferativ und antiangiogenetisch wirkten<sup>136</sup>. So wird möglicherweise in dichten Zellpopulationen und bei massiver HA-Akkumulation, die Viskosität der perizellulären Matrix so stark erhöht, dass Zellbewegungen und Zellformveränderungen kaum möglich sind. Hingegen ist bei geringeren Zelldichten die HA-Sekretion essentiell für Proliferations- und Migrations-Mechanismen<sup>90</sup>.

Umso mehr stellte sich die Frage, wie sich die selektive Überexpression von HAS3v1 auf den Phänotyp von humanen VSMC auswirkt.

Im erwachsenen Organismus ist die VSMC eine hoch spezialisierte Zelle, deren prinzipielle Funktionen Kontraktion und dadurch Regulation des Blutdruckes sind. VSMC in einem Blutgefäß proliferieren nur sehr langsam, weisen eine geringe synthetische Aktivität auf und exprimieren ein einzigartiges Repertoire an kontraktilen Proteinen, Ionenkanälen und Signalmolekülen, die für die Zellkontraktion erforderlich sind. Im Gegensatz zu Skelett- und Herzmuskelzellen, die eine terminale Differenzierung erreichen, besitzen VSMC eine Plastizität und können durch Veränderungen der lokalen Umgebung wieder dedifferenzieren. An den Differenzierungsprozessen und phänotypischen Modulationen von VSMC sind viele komplexe molekulare Faktoren beteiligt, wie humorale Faktoren (PDGF-BB, Angiotensin II, TGF $\beta$ ), atherogene Stimuli (Lipide, inflammatorische Mediatoren), Einfluss des

Endothels (NO, Permeabilität, EC/SMC-Kontakt), mechanischer Stress, neuronale Effekte und EZM.

Eine massive Hyaluronsäureakkumulation in atherosklerotischen Läsionen ist bekannt, ob und wenn ja, zu welchen phänotypischen Veränderungen die alleinige Überexpression von HAS3 führt, ist unbekannt.

#### **4.5.3.1 Etablierung und Validierung der HAS3v1 Überexpression**

Zunächst wurden die VSMC mit einem sehr hohen Virustiter infiziert, der eine massive Hyaluronsäuresekretion zur Folge hatte. Diese Hyaluronsäureinduktion korrelierte mit einer dramatischen Abnahme der Zellzahl.

Eine mögliche Erklärung für dieses schnelle Zellsterben in HAS3OE VSMC könnte sein, dass die exzessive HA-Synthese zu einer Veränderung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion führte, nämlich ein Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale und so apoptotische Prozesse einleitete. Möglicherweise handelt es sich hierbei um das Phänomen der Anoikis.

Folglich wurde der Virustiter sequentiell verdünnt. Bei einer Lentivirusverdünnung von 1:100, konnte eine reproduzierbare 4-5 -fache Induktion in der HA-Synthese gemessen werden, ohne dass sich die Viabilität der VSMC veränderte. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen zur HAS3-Überexpression mit der gleichen Charge und einer 1:100 Virusverdünnung durchgeführt.

Mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie konnte bestätigt werden, dass die HAS3 überexprimierenden VSMC im Vergleich zu den Kontrollzellen überwiegend HA kleineren Molekulargewichts synthetisierten. Ein möglicher zusätzlicher HA-Abbau zu Oligomeren konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht untersucht werden.

Da es nicht auszuschließen war, dass die HAS3 Überexpression zu einer zusätzlichen Ko-Regulation von Matrixmolekülen führte, wurden die mRNA-Expressionen von HAS1 und -2, Hyal1 und -2, sowie TSG6, Versikan V1 und -V0 untersucht. Keine der untersuchten Hyaladhäerinen zeigten Veränderungen auf RNA-Ebene. Ebenso wenig wurden die Rezeptoren CD44 und RHAMM

reguliert.

Somit konnte sichergestellt werden, dass mögliche phänotypische Veränderungen in den HAS3 überexprimierenden Zellen ausschließlich auf die Zunahme der Hyaluronsäure mit der für HAS3 charakteristischen Kettenlänge zurück zu führen sind.

#### **4.5.3.2 HAS3 abhängige Veränderungen der Morphologie von VSMC**

Die Induktion der HAS3 durch IL-1 $\beta$  führte zu keinem vermehrten Aufbau einer perizellulären Matrix. Im folgenden Versuch sollte daher geklärt werden, ob die durch HAS3 synthetisierte HA überhaupt befähigt ist, zellassozierte Hyaluronsäuremäntel zu bilden.

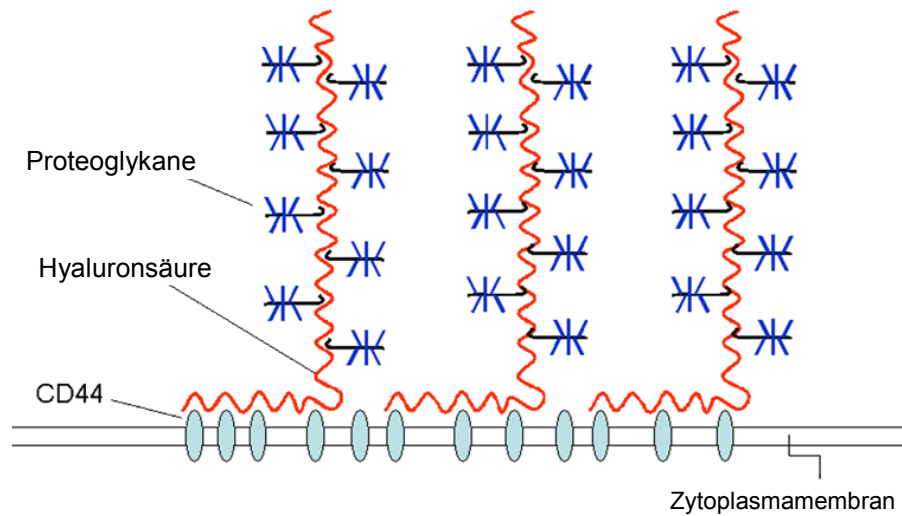
Mit HAS3 transfizierte VSMC zeigten durch den Ausschluss von fixierten Erythrozyten, einen großen Hof um die Zellen herum. Dieser Hof konnte durch Zusatz von *Streptomyces* Hyaluronidase abgebaut werden, was dafür spricht, dass die vergrößerte perizelluläre Matrix aus HA bestand bzw. HA essentiell für die Aufrechterhaltung war. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops konnten an den mit Calcein angefärbten HAS3OE VSMC Zellprotrusionen sichtbar gemacht werden, die fast den gesamten extrazellulären Raum durchzogen. Der Abbau dieser dünnen Mikrovilli ähnlichen Strukturen nach Zugabe von Hyaluronidase deutet auf eine Abhängigkeit zwischen perizellulärer Hyaluronsäureakkumulation und Zellprotrusionen hin. Es ist denkbar, dass die Mikrovillistrukturen den Hyaluronsäuremantel mechanisch durch die Vergrößerung der Zelloberfläche stützen, und so ein extrazelluläres Zellgerüst für die HA-Glykokalyx bilden. Ob an dem Aufbau der perizellulären Matrix noch Proteoglykane beteiligt sind, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Denkbar wäre, dass Hyaluronsäure mit Versikan assoziiert vorliegt.

Untersuchungen von einer finnischen Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls, dass die Überexpression von HAS3 zu enormen Ausstülpungen der Zellmembran (Mikrovilli) führte<sup>137</sup>. In dieser Arbeit wurden jedoch Brusttumorzellen (MCF-7) mit HAS3 transfiziert, um die Rolle der HAS3 für die Malignität der Tumorzelle, wie zum Beispiel Invasivität, Apoptoseresistenz und Resistenzen gegen

Zytostatika, zu untersuchen. Twarock (Doktorarbeit 2008) zeigte ebenfalls in bösartigen Ösophaguskarzinomzellen, die HAS3 als Hauptisoform produzieren, filopodiale Zellausstülpungen. In dieser Arbeit werden die Filopodien als Zeichen der Invasivität diskutiert. Möglicherweise nimmt auch die Kontaktinhibition, die charakteristisch für nicht transformierte Zellen ist, durch die Hyaluronsäure-assoziierten Filopodien ab.

Für die Pathophysiologie der Atherosklerose könnte dieser Befund bedeuten, dass durch die Induktion der HAS3 gebildeten Zellprotrusionen die Migration/Invasion der VSMC aus der Media in die Intima gefördert wird und zusätzlich durch Abnahme der Kontaktinhibition Proliferationsprozesse eingeleitet werden.

Immunzytochemische Färbungen des CD44 Rezeptor und der Hyaluronsäure an HAS3 überexprimierenden VSMC und an Kontrollzellen deuten auf eine „Clusterung“ in der Membran des CD44 Rezeptors der HAS3 überexprimierenden Zellen hin. Eine solche „Clusterung“ wurde bereits an Krebszellen und Endothelzellen beschrieben<sup>54-56,138</sup>. Es ist aber auch denkbar, dass es sich lediglich um eine scheinbare Umverteilung des CD44 handelt, die auf die veränderte Zellform in den HAS3 überexprimierenden VSMC zurückzuführen ist. Auffällig war, dass die Mikrovilli in HAS3OE VSMC, aufgrund der Zellfixierung in einem geringeren Ausmaß, für den CD44-Rezeptor positiv gefärbt waren. CD44 könnte als Hyaladhärin für eine zusätzliche Stabilität des Hyaluronsäuremantels sorgen, aber auch gleichzeitig intrazelluläre Signaltransduktionen einleiten. Die **Abbildung 4-2** zeigt einen möglichen Aufbau der perizellulären HA-Matrix. HA wird durch Wechselwirkungen mit den CD44 Rezeptor an die Zytoplasmamembran gebunden. Durch Assoziationen mit Proteoglykanen entstehen stabile, strukturierte, perizelluläre Netzwerke.



**Abbildung 4-2** Modell der perizellulären Matrix mit über CD44 verankerter Hyaluronsäure und assoziierten Proteoglykanen (Versikan).

Hyaluronsäure ist nicht nur in der extrazellulären Matrix lokalisiert, sondern auch intrazellulär im Zellkern, im rauen endoplasmatischen Retikulum und in Calveoli.

Die Überexpression von HAS3 in hVSMC, erhöhte die intrazelluläre Hyaluronsäurekonzentration. Die Funktion dieser intrazellulären HA wurde in der Vergangenheit zunehmend untersucht. Eine schnelle HA-Aufnahme und Translokation in den perinukleären Raum und Zellkern assoziierte mit gesteigerter Motilität in Fibroblasten, die teilweise über RHAMM vermittelt wurde<sup>59,139</sup>. Auch wurden mehrere intrazelluläre Hyaladhärine beschrieben, sodass die Vermutung nahe liegend ist, dass die intrazelluläre Hyaluronsäure an der Regulation von Zellzyklus, Mitose, Zellbewegung und RNA-Splicing beteiligt ist<sup>59,140-145</sup>. Ob diese Funktionen auch für VSMC zu treffen, sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Morphologisch auffallend war die wesentlich kleinere Zellform von HAS3

überexprimierenden VSMC im Vergleich zu Kontrollzellen. Diese Veränderung der Zellform könnte auf anti-adhäsive Eigenschaften der HA-Hülle zurückzuführen sein. Andererseits können auch durch Interaktionen von HA und den Rezeptoren CD44 und RHAMM Signaltransduktionen aktiviert werden, die für die veränderte Morphologie verantwortlich sind. Andere Arbeiten bestätigen einen komplementären Phänotyp. So beschreiben Evanko *et al.*<sup>16</sup> morphologische Veränderungen als Reaktion auf HA-Oligosaccharide. HA-Oligosaccharide verdrängten native Hyaluronsäure von ihren Rezeptoren CD44 und RHAMM und verursachten auf diese Weise die Abnahme einer perizellulären HA-Matrix mit anschließender Zellausbreitung. Sussmann *et al.* stellten nach Inhibition der HAS2 ebenfalls eine Zellausbreitung fest<sup>18</sup>. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HA vermittelte Prozesse die Morphologie des Aktinzytoskeletts und somit auch die Fokalen Adhäsionen regulieren.

#### **4.5.3.3 Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskomplexe nach Überexpression von HAS3v1**

Eine vermehrte HA-Produktion in HAS3 überexprimierenden Zellen induzierte die Organisation des Aktinzytoskeletts zu Aktinstressfasern und die Bildung von filopodialen und lamellipodialen Zellprotrusionen, wie sie typischerweise in wandernden Zellen vorkommen<sup>146</sup>. Paxillin, eine Phosphotyrosinkinase des fokalen Adhäsionskomplexes, konnte ebenfalls an den führenden Enden der Filopodien und Lamellipodien detektiert werden.

Die Bedeutung des Aktinzytoskeletts und der Fokalen Adhäsionen für zelluläre Funktionen und Regulationen wurde in früheren Studien schon ausführlich untersucht<sup>146</sup>.

Die Verankerung von Zellen im Gewebe wird durch ein Zusammenspiel von Aktin-Zytoskelett und spezifischen Adhäsionsstrukturen, den so genannten fokalen Adhäsionskomplexen (FA) ermöglicht. Diese Komplexe haben die Aufgabe mittels transmembranärer Rezeptoren, der Integrine, einen Komplex zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Matrix aufzubauen<sup>147</sup>. Innerhalb der Zelle wird indirekt über Adaptermoleküle eine Verbindung zwischen den Integrinmolekülen und dem Aktin-Zytoskelett hergestellt. Der



Proteinkomplex der FA besteht aus mehr als 50 verschiedenen Struktur-, Signal- und Adapterproteinen<sup>148</sup>.

Die Verbindung von Aktin-Zytoskelett mit der EZM ermöglicht der Zelle, sowohl Informationen über äußere Reize in das Zellinnere zu leiten und darauf zu reagieren, als auch selber Zugkräfte auf die EZM zu übertragen. Da Zellen dynamische Strukturen darstellen, die auf äußere Reize reagieren müssen und häufig Form- sowie Lageveränderungen (Zelladhäsion, -Ausbreitung, -Migration<sup>134</sup>) unterworfen sind, stellen die fokalen Komplexe und das angekoppelte Aktin-Zytoskelett eine sehr dynamische Struktur mit ständigen Auf- und Abbauprozessen dar. Besonders die Zellmigration ist auf einen dynamischen Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen angewiesen.

Eine zentrale Stellung innerhalb der fokalen Adhäsionen nimmt die Tyrosinkinase FAK (Fokale-Adhäsions-Kinase) ein. FAK ist ein ubiquitär exprimiertes 125 kDa großes Protein. Der Mechanismus der FAK-Aktivierung lässt sich stark vereinfacht wie folgt beschreiben: Interaktionen zwischen Matrixmolekülen und Integrinen führen zu einer Integrinclusterung, die nachgeschaltet eine Rekrutierung der FAK an den zytoplasmatischen Teil des Integrins bewirkt. Die daraufhin durch Autophosphorylierungsprozesse aktivierte FAK induziert nun die Rekrutierung und Phosphorylierung von weiteren Proteinen. Eine ähnliche Aktivierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase induzieren einige Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) oder der Platelet Derived Growth Factor Rezeptor (PDGFR). FAK vermittelt auch die Regulation von Rho-GTPasen innerhalb der Zelle, die den Auf- und Abbau von Aktin-Zytoskelett steuern (Stressfasern, Lamellipodien, Filopodien)<sup>149-151</sup>.

Eine Vielzahl wichtiger Zellvorgänge, wie Migration, Proliferation und Überleben werden durch diese Phosphorylierung von FAK eingeleitet, einschließlich der in VSMC<sup>152</sup>.

Schlussfolgernd, auf die in dieser Arbeit gezeigten morphologischen Veränderungen an HAS3 überexprimierenden VSMC, könnte die Hyaluronsäure über mehrere Signaltransduktionen den Phänotyp von VSMC beeinflussen. Einerseits könnte die Zusammensetzung der EZM durch massive

HA-Sekretion der Art verändert werden, dass neue bzw. andere Bindungen an den Integrinen einen erhöhten Umsatz an den fokalen Adhäsionen induzieren. Andererseits ist es auch denkbar, dass die Aktivierung der CD44 und RHAMM Rezeptoren durch HA zu einer verstärkten FAK-Phosphorylierung führt, die dann nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die wiederum die Zellmorphologie beeinflussen. Unterstützt wird dieser Befund von Goueffic *et al.*<sup>87</sup>. In dieser Arbeit stimulierte hochmolekulare HA in VSMC ebenfalls die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien.

#### **4.5.3.4 Untersuchung der FAK nachgeschalteten Signaltransduktionen**

Die Organisation des Aktinzytoskeletts unterliegt wie zuvor beschrieben insbesondere einer Regulation durch die Fokale-Adhäsions-Kinase. Ob die veränderte Zellform an HAS3 überexprimierenden VSMC tatsächlich auf FAK-Signaling zurückzuführen ist, sollte im Folgenden untersucht werden. Eine Verbindung zwischen Hyaluronsäure, HA-Rezeptoren und FAK ist in einigen Arbeiten belegt<sup>59,54-56</sup>.

Western Blot Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase aber auch die FAK selbst an HAS3 überexprimierenden VSMC deutlich angestiegen war. Möglicherweise wird der FAK Abbau, durch die HAS vermittelte Hyaluronsäuresynthese gehemmt.

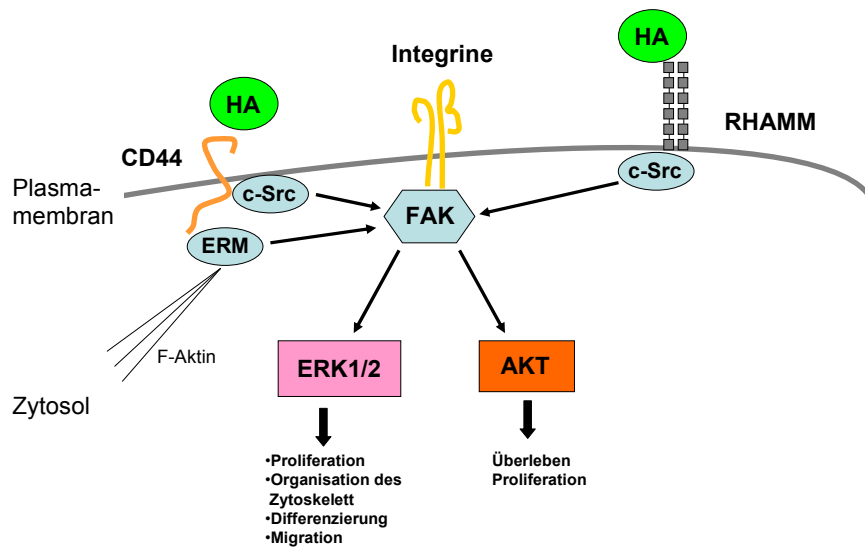
Eine ähnliche, wenn auch komplementäre Beobachtung wurde in Ösophaguskarzinomzellen gemacht. In dieser Arbeit induzierte eine Reduktion der Hyaluronsäurekonzentration den Abbau der Fokalen-Adhäsions-Kinase (Twarock, persönliche Mitteilung).

Des Weiteren waren Phosphorylierungen von Paxillin, AKT und ERK1/2 in HAS3OE VSMC deutlich induziert. 4-MU, ein unselektiver Hyaluronsäuresynthaseinhibitor, hemmte die zuvor beschriebenen Phosphorylierungen, was die Kausalität zwischen HAS3 vermittelter HA-Synthese und den beobachteten Phosphorylierungsreaktionen bewies. Eine verstärkte AKT und ERK1/2 Phosphorylierung wurde auch an mit PDGF-BB stimulierten HAS3 überexprimierenden Zellen detektiert.

Heraufregulationen von FAK und Phospho-FAK korrelieren eng mit einer Induktion der Migration<sup>153,154</sup>, während ein *knock out* von FAK die Wanderung von Zellen hemmt<sup>155,156</sup>. Ebenso führt die der FAK-Phosphorylierung nachgeschaltete Aktivierung von ERK1/2 und AKT zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die migratorische und mitotische Prozesse einleiten<sup>157,158</sup>.

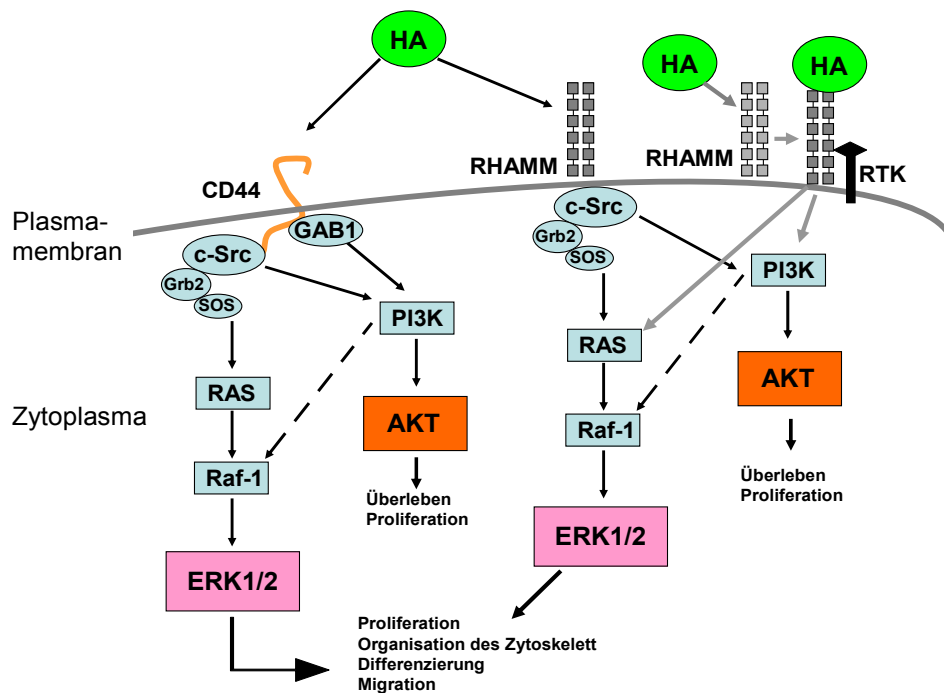
Sehr wahrscheinlich ist die Aktivierung dieser Signaltransduktionen für die erhöhte migratorische und mitotische Aktivität in HAS3 überexprimierenden Zellen verantwortlich.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind in Einklang mit der Aktivierung des CD44-Rezeptor, der sowohl FAK<sup>55</sup> als auch PI3K/AKT<sup>159</sup> abhängige Signaltransduktionen induzieren kann, wie zuvor an Krebszellen nachgewiesen wurde. Daher ist der CD44-Rezeptor ein möglicher Effektor der HAS3 vermittelten Effekte. Andererseits führt die Aktivierung von RHAMM in ras-transformierten Krebszellen ebenfalls zur Phosphorylierung von FAK und nachgeschaltet zu einem erhöhten Umsatz der fokalen Adhäsionen<sup>59</sup> (**Abbildung 4-3**).



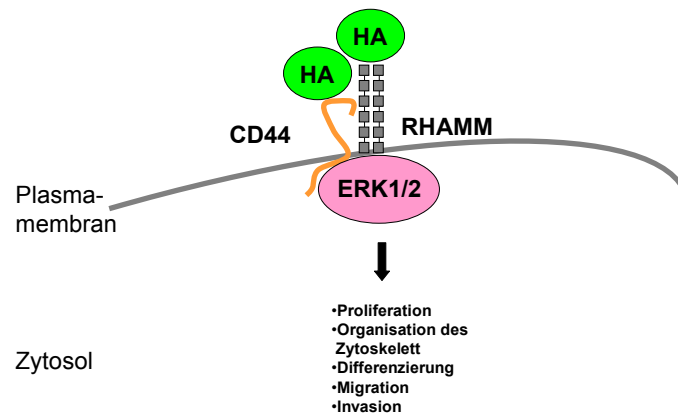
**Abbildung 4-3 Modell der Hyaluronsäure (HA) abhängigen Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase.** Die Bindung von HA an CD44 und RHAMM kann zur Assoziation mit der Tyrosinkinase c-Src führen. C-Src ist in der Lage die fokale Adhäsionskinase (FAK) zu phosphorylieren, die dadurch in einen aktivierten Zustand übergeht. Diese Aktivierung moduliert zum einen die Aktivierung der PI<sub>3</sub>K und AKT, das zum Überleben und Proliferieren der Zelle führt, und zum anderen wird die RAS/ MAP-Kinase-Kaskade induziert, die Proliferation, Organisation des Zytoskeletts, Differenzierung und Migration der Zelle aktiviert. Des Weiteren kann durch die Bindung der HA an CD44, der zytoplasmatische Teil von CD44 mit ERM (Ezerin, Radixin, Moesin) interagieren und so einen direkten Kontakt mit dem Aktinzytoskelett aufbauen. CD44 und Ezerin Assoziation führt auch zu einer Aktivierung der FAK.

Des Weiteren ist es bekannt, dass sowohl CD44 als auch RHAMM den MAPK<sup>160</sup>- und den PI<sub>3</sub>K<sup>87</sup>-Weg in Antwort auf HA direkt aktivieren, und so Migration und Proliferation von VSMC<sup>161-163</sup> fördern (**Abbildung 4-4**). Die HA abhängige Assoziation von RHAMM mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) führte zu einer verstärkten Aktivierung von ERK1/2 und AKT (**Abbildung 4-4**).



**Abbildung 4-4 Schematische Darstellung einer direkten Hyaluronsäure-abhängige Aktivierung von ERK1/2 und AKT.** HA aktiviert über CD44 und RHAMM Kinasen der c-Src-Familie, die mit den Adapterproteinen Grb2 (Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2) und SOS (Son-of-Sevenless) assoziiert, die RAS/RAF-1 (Mitglied der Rho-GTPasen) induziert und schließlich die ERK1/2 (Extracellular-Signal-Regulated-Kinase) aktiviert. Die Tyrosinkinase c-Src und das Adapterprotein GAB1 aktivieren PI<sub>3</sub>K (Phosphoinositid-3-Kinase), die sowohl AKT (Proteinkinase B) als auch RAF-1, die folglich ERK1/2 induziert, moduliert. Des Weiteren kann durch die Bindung von HA an RHAMM eine Assoziation mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) stattfinden, die über den dargestellten Signalweg sowohl ERK1/2 als auch AKT aktiviert. Phosphoryliertes ERK1/2 führt im Zellkern zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Zellform, -proliferation und -migration regulieren. Phosphoryliertes AKT phosphoryliert überwiegend Transkriptionsfaktoren die Zellüberleben und Zellproliferation beteiligt sind.

Eine dritte Möglichkeit wäre eine kooperative Wirkung von CD44 und RHAMM. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass eine CD44 vermittelte ERK1/2 Aktivierung in Fibroblasten von RHAMM abhängig ist<sup>88,164</sup> (**Abbildung 4-5**).



**Abbildung 4-5 Mögliche Kooperation von CD44 und RHAMM und ERK1/2.** CD44 und RHAMM können in einer HA abhängigen Weise miteinander interagieren und so eine anhaltende ERK1/2 Signaltransduktion koordinieren. Dies bewirkt eine hohe basale Beweglichkeit der Zelle, vermehrte Proliferation und Dedifferenzierung von Zellen.

Interessanterweise hat man in bösartigen Tumorzellen (Kolon, Brust) eine Hyaluronsäure abhängige Regulation von Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (IGF1R, PDGFR) beschrieben. Eine konstitutive und Ligand-abhängige Aktivierung des PDGF-Rezeptors war nur in Anwesenheit von endogener Hyaluronsäure möglich<sup>165</sup>. Dies könnte auch erklären, warum die Stimulation mit PDGF-BB an HAS3OE VSMC zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT und ERK1/2.

Zusammenfassend werden durch die Überexpression der HAS3 an VSMC Mechanismen eingeleitet, die zu einer Aktivitätssteigerung an FA führen und nachgeschaltet die Migration und Proliferation von VSMC aktivieren. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die von HAS3 synthetisierte HA an entscheidenden Prozessen, die zur Dedifferenzierung des glattmuskulären Phänotyps führen, beteiligt ist.

#### **4.6 Relevanz der Ergebnisse an kultivierten VSMC für die humane Atherosklerose**

In den immunhistologisch untersuchten humanen atherosklerotischen Plaques, konnte man eine deutliche Makrophagenakkumulation an der luminalen Seite detektieren. Interessanterweise waren diese Stellen auch positiv für HA. Möglicherweise finden Interaktionen zwischen HA und dem auch auf Entzündungszellen exprimierten CD44-Rezeptor statt, die eine Retention von Monozyten und Lymphozyten zur Folge haben. Eingewanderte Monozyten differenzieren zu Makrophagen und sezernieren IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  aktivieren in Makrophagen aber auch in der angrenzenden VSMC-Schicht NF $\kappa$ B abhängige Genexpression. Da die NF $\kappa$ B-positiven VSMC und Makrophagen in eine HA-reiche EZM eingebettet waren, ist es zumindest vorstellbar, dass auch in humanen atherosklerotischen Läsionen von Makrophagen sezernierte Zytokine eine Induktion von HAS3 und HA via NF $\kappa$ B bei VSMC induzieren. Denkbar wäre, dass nun dieser autokrine Mechanismus eine fortlaufende HA-Synthese unterhält und HA über den CD44-Rezeptor oder RHAMM Signalkaskaden aktiviert, die zu einer Verstärkung des synthetischen Phänotyps führen. Diese synthetischen VSMC produzierten verstärkt Hyaluronsäure und Versikan, welche wiederum die umliegenden Zellen zu noch mehr Migration und Proliferation stimulieren. Nachfolgend könnten die Zytokine COX-2 in VSMC induzieren und via ProstaglandinE-Synthase und PGE<sub>2</sub> langfristig auch HAS1 und HAS2 stimulieren<sup>166</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Hyaluronsäure (HA) stellt einen quantitativ bedeutsamen Bestandteil in atherosklerotischen Läsionen dar und wird von drei HA-Synthasen (HAS1, -2, -3) synthetisiert. HA akkumuliert in atherosklerotischen Läsionen und ist an Schlüsselaspekten der Atherogenese, wie Volumenexpansion, Entzündung, phänotypischer Kontrolle von glatten Gefäßmuskelzellen und Matrixumbau beteiligt. Jedoch sind weder die spezifischen Funktionen der HAS-Isoformen, noch die relevanten regulatorischen Signalwege während der Progression der Atherosklerose bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war, mögliche regulatorische Signalwege und Funktionen von HAS3 in humanen, koronaren, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) unter dem Aspekt eines entzündlichen Plaueumbaus zu untersuchen. Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) induzierten spezifisch HAS3 durch eine Aktivierung von NF $\kappa$ B. HAS3 wurde auch in einem Kokultursystem mit aktivierten Makrophagen über parakrine Freisetzung TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert. Im Gegensatz dazu wurden HAS1 und HAS2 nicht beeinflusst. Die Überexpression von HAS3 induzierte eine verstärkte Signaltransduktion der fokalen Adhäsionen (FA), welches sowohl durch Anstieg der FA-Kinase (FAK) und der FAK-Phosphorylierung, sowie verstärkter Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielstrukturen der FAK, wie Paxillin, AKT und ERK1/2, gezeigt wurde. Die Aktivierung dieser Signalwege korrespondierte mit einer Zunahme der migratorischen und proliferativen Aktivität und konnte durch spezifische HAS3 shRNA gehemmt werden. Schließlich konnte eine räumliche Assoziation von HA, Makrophagen und VSMC mit aktiviertem NF $\kappa$ B in humanen Atherektomien aus der *Arteria Carotis* dargestellt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HAS3-abhängige HA-Synthese von VSMC durch proinflammatorische Zytokine aus aktivierten Makrophagen induziert wird, die wiederum den migratorischen und proliferativen Phänotyp von VSMC über die FAK-Signaltransduktion aktiviert.



## 6 Summary

Hyaluronan (HA) is a prominent carbohydrate constituent in atherosclerotic lesions synthesized by three HA-synthases (HAS1, -2, -3). HA accumulates in the lesions and is thought to be involved in key aspects of atherogenesis such as volume expansion, inflammation, phenotypic control of vascular cells and matrix remodelling. However, neither the function of the three individual HAS isoforms nor the relevant regulatory pathways during the progression of atherosclerosis are known. The aim of the present study was to identify possible regulatory pathways and functions of HAS3 in human coronary smooth muscle cells (VSMC) in the context of inflammatory plaque remodelling. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induced specifically HAS3 via the NF $\kappa$ B-pathway. HAS3 was also upregulated in a co-culture system by activated macrophages via paracrine release of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In contrast HAS1 and HAS2 were not affected. Overexpression of HAS3 resulted in increased focal adhesion (FA) signalling as evidenced by increased levels of FA-kinase (FAK) and FAK-phosphorylation as well as increased phosphorylation of downstream targets of FAK such as paxillin, Akt and Erk1/2. This activation of signalling corresponded to increased migratory and proliferative activity and was inhibited by shRNA targeting HAS3. Finally, spatial association of HA, macrophages and VSMC with activated NF $\kappa$ B was detected in human atherectomy specimens derived from carotid arteries. Taken together, the present results suggest that HAS3-dependent HA-synthesis is induced in VSMC by inflammatory cytokines released from activated macrophages and that HA in turn induces phenotypic activation of VSMC via FA-signalling.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Kodierende DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cpm	Radioaktive Ereignisse pro Minute
Cy3	Carboncyanin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ELISA	Enzymkonjugierter immunvermittelter Assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase

---

INN	<i>International nonproprietary name</i> , Internationaler markenfreier Name
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , Lange endständige Wiederholung
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MOI	Multiplicity of Infektion, Verhältnis zwischen Viren und Zielzellen
mRNA	Boten-RNS
MSF	Migration stimulierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor, <i>Platelet derived growth factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA, RNS	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> , kleine Haarnadel RNS
siRNA	<i>Small interference RNA</i> , kleine Interferenz RNS

---

TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein

## 8 Literaturverzeichnis

1. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:581-6.
2. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:528-39.
3. Monslow J, Williams JD, Norton N, Guy CA, Price IK, Coleman SL, Williams NM, Buckland PR, Spicer AP, Topley N, Davies M, Bowen T. The human hyaluronan synthase genes: genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:1272-83.
4. Spicer AP, Kaback LA, Smith TJ, Seldin MF. Molecular cloning and characterization of the human and mouse UDP-glucose dehydrogenase genes. *J Biol Chem.* 1998;273:25117-24.
5. Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem.* 1998;273:1923-32.
6. Schulz T, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem.* 2007;282:20999-1004.
7. Prehm P, Schumacher U. Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1401-10.
8. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999;274:25085-92.
9. Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 1999;59:2499-504.
10. Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol.* 1992;116:1055-62.
11. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279:26991-7007.
12. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 2001;20:509-14.
13. Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI,

- Miller AD. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4443-8.
14. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol*. 2004;83:317-25.
  15. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1004-13.
  16. Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:1331-42.
  17. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1996;93:1141-7.
  18. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM, Schror K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res*. 2004;94:592-600.
  19. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, Yeh C, Secreto A, Assoian RK, Rader DJ, Pure E. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest*. 2001;108:1031-40.
  20. Nasreen N, Mohammed KA, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders K, Kathuria H, Loghmani F, Antony VB. Low molecular weight hyaluronan induces malignant mesothelioma cell (MMC) proliferation and haptotaxis: role of CD44 receptor in MMC proliferation and haptotaxis. *Oncol Res*. 2002;13:71-8.
  21. Kothapalli D, Zhao L, Hawthorne EA, Cheng Y, Lee E, Pure E, Assoian RK. Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells. *J Cell Biol*. 2007;176:535-44.
  22. van den Boom M, Sarbia M, von Wnuck Lipinski K, Mann P, Meyer-Kirchrath J, Rauch BH, Grabitz K, Levkau B, Schror K, Fischer JW. Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis. *Circ Res*. 2006;98:36-44.
  23. Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H, Fontijn RD, Vink H. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H458-2.
  24. Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol*. 2005;6:393-402.
  25. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242:27-33.

26. Engstrom-Laurent A. Hyaluronan in joint disease. *J Intern Med.* 1997;242:57-60.
27. Levesque H, Girard N, Maingonnat C, Delpech A, Chauzy C, Tayot J, Courtois H, Delpech B. Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis.* 1994;105:51-62.
28. De Reeder EG, Girard N, Poelmann RE, Van Munsteren JC, Patterson DF, Gittenberger-De Groot AC. Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall. The normal and genetically defective ductus arteriosus. *Am J Pathol.* 1988;132:574-85.
29. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000;106:349-60.
30. Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53:372-82.
31. Knudson W, Biswas C, Li XQ, Nemec RE, Toole BP. The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 1989;143:150-9; discussion 159-69, 281-5.
32. Toole BP, Munaim SI, Welles S, Knudson CB. Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development. *Ciba Found Symp.* 1989;143:138-45; discussion 145-9 281-5.
33. Knudson W, Toole BP. Membrane association of the hyaluronate stimulatory factor from LX-1 human lung carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 1988;38:165-77.
34. Li XQ, Thonar EJ, Knudson W. Accumulation of hyaluronate in human lung carcinoma as measured by a new hyaluronate ELISA. *Connect Tissue Res.* 1989;19:243-53.
35. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol.* 2002;161:745-7.
36. Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 1994;54:3988-92.
37. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol.* 1997;182:318-24.
38. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C, Maunoury R, Olivier A, Tayot J, Creissard P. Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur J Cancer.* 1993;29A:1012-7.
39. Kimata K, Honma Y, Okayama M, Oguri K, Hozumi M, Suzuki S. Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res.* 1983;43:1347-54.

40. Calabro A, Oken MM, Hascall VC, Masellis AM. Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood*. 2002;100:2578-85.
41. Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res*. 1995;55:428-33.
42. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol*. 2007;171:1451-61.
43. Brown MP, Trumble TN, Sandy JD, Merritt KA. A simplified method of determining synovial fluid chondroitin sulfate chain length. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:1443-5.
44. Canapp SO, Cross AR, Brown MP, Lewis DD, Hernandez J, Merritt KA, Tran-Son-Tay R. Examination of synovial fluid and serum following intravenous injections of hyaluronan for the treatment of osteoarthritis in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2005;18:169-74.
45. Brown MP, Trumble TN, Plaas AH, Sandy JD, Romano M, Hernandez J, Merritt KA. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:1318-25.
46. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 2002;277:4589-92.
47. Kohda D, Morton CJ, Parkar AA, Hatanaka H, Inagaki FM, Campbell ID, Day AJ. Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell*. 1996;86:767-75.
48. Watanabe H, Cheung SC, Itano N, Kimata K, Yamada Y. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. *J Biol Chem*. 1997;272:28057-65.
49. Kahmann JD, O'Brien R, Werner JM, Heinegard D, Ladbury JE, Campbell ID, Day AJ. Localization and characterization of the hyaluronan-binding site on the link module from human TSG-6. *Structure*. 2000;8:763-74.
50. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res*. 2004;94:1158-67.
51. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*. 1993;54:271-335.
52. Lesley J, Schulte R, Hyman R. Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp Cell Res*. 1990;187:224-33.
53. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr*



- Opin Cell Biol.* 1994;6:726-33.
54. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem.* 2001;276:7327-36.
  55. Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett.* 2002;528:101-8.
  56. Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, Yanagida T, Miyasaka M. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem.* 2004;279:4541-50.
  57. Sohara Y, Ishiguro N, Machida K, Kurata H, Thant AA, Senga T, Matsuda S, Kimata K, Iwata H, Hamaguchi M. Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. *Mol Biol Cell.* 2001;12:1859-68.
  58. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994;372:786-91.
  59. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol.* 1994;126:575-88.
  60. Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:27641-9.
  61. Hall CL, Turley EA. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol.* 1995;26:221-9.
  62. Turley EA, Austen L, Vandeligt K, Clary C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol.* 1991;112:1041-7.
  63. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:33-45.
  64. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 2004;117:373-80.
  65. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2002;195:99-111.
  66. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005;11:1173-9.

67. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 2004;279:17079-84.
68. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1501-4.
69. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
70. Wolfort RM, Stokes KY, Granger DN. CD4+ T-lymphocytes mediate hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction via a NAD(P)H oxidase-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008.
71. Libby P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol*. 2001;88:3J-6J.
72. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
73. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am*. 2002;286:46-55.
74. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-20.
75. Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, James RW, Mach F, Gabay C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005;66:583-93.
76. Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl*. 1996;14:S55-64.
77. Hackett D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Heart J*. 1988;9:1317-23.
78. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. 1989;9:1-20.
79. Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT, Wight TN. Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 1997;272:318-25.
80. Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: Role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res*. 2008.
81. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1159-65.
82. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation*. 2004;110:940-7.
83. Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN, Virmani R. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:575-82.

84. de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol.* 2003;163:121-33.
85. Vigetti D, Viola M, Karousou E, Rizzi M, Moretto P, Genasetti A, Clerici M, Hascall VC, De Luca G, Passi A. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *J Biol Chem.* 2008;283:4448-58.
86. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1351-65.
87. Goueffic Y, Guilluy C, Guerin P, Patra P, Pacaud P, Loirand G. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. *Cardiovasc Res.* 2006;72:339-48.
88. Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, Tolg C, Veisoh M, Wang C, McCarthy JB, Bissell MJ, Koropatnick J, Turley EA. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282:16667-80.
89. Wilkinson TS, Bressler SL, Evanko SP, Braun KR, Wight TN. Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion. *J Cell Physiol.* 2006;206:378-85.
90. Evanko SP, Johnson PY, Braun KR, Underhill CB, Dudhia J, Wight TN. Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2001;394:29-38.
91. Chajara A, Levesque H, Courel MN, Chauzy C, Maingonnat C, Bertrand P, Delpech B. Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1996;125:193-207.
92. Goldberg RL, Toole BP. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum.* 1987;30:769-78.
93. Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3609-14.
94. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* 1998;152:533-46.
95. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med.* 1996;183:1119-30.

96. Siegelman MH, DeGrendele HC, Estess P. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J Leukoc Biol.* 1999;66:315-21.
97. Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 2000;275:14939-48.
98. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4478>. In; 2008.
99. Hass R, Lonnemann G, Mannel D, Topley N, Hartmann A, Kohler L, Resch K, Goppelt-Strube M. Regulation of TNF-alpha, IL-1 and IL-6 synthesis in differentiating human monoblastoid leukemic U937 cells. *Leuk Res.* 1991;15:327-39.
100. Hass R. Retrodifferentiation--an alternative biological pathway in human leukemia cells. *Eur J Cell Biol.* 1992;58:1-11.
101. Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem.* 2004;279:27440-9.
102. Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 1994;43 Pt A:99-112.
103. Merhi-Soussi F, Berti M, Wehrle-Haller B, Gabay C. Intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 antagonizes the stimulatory effect of interleukin-1 alpha precursor on cell motility. *Cytokine.* 2005;32:163-70.
104. Bonin PD, Fici GJ, Singh JP. Interleukin-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells in coordination with PDGF or a monocyte derived growth factor. *Exp Cell Res.* 1989;181:475-82.
105. Cattaruzza M, Schafer K, Hecker M. Cytokine-induced down-regulation of zfm1/splicing factor-1 promotes smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2002;277:6582-9.
106. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008.
107. Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 2008;88:489-513.
108. Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand.* 1998;164:623-35.
109. Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, Yamamoto K, Hidaka Y, Kasahara T, Kawai T, Shimada K. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24:579-84.
110. Ducale AE, Ward SI, Dechert T, Yager DR. Regulation of hyaluronan synthase-2 expression in human intestinal mesenchymal cells: mechanisms of interleukin-1beta-mediated induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G462-70.
111. Wong YK, Tang KT, Wu JC, Hwang JJ, Wang HS. Stimulation of hyaluronan synthesis by interleukin-1beta involves activation of protein kinase C betall in fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy.

- J Cell Biochem.* 2001;82:58-67.
112. Butler DM, Vitti GF, Leizer T, Hamilton JA. Stimulation of the hyaluronic acid levels of human synovial fibroblasts by recombinant human tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta (lymphotoxin), interleukin-1 alpha, and interleukin-1 beta. *Arthritis Rheum.* 1988;31:1281-9.
  113. Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, Yager DR. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg.* 2000;35:874-9.
  114. Postlethwaite AE, Lachman LB, Mainardi CL, Kang AH. Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J Exp Med.* 1983;157:801-6.
  115. Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem.* 2000;77:298-309.
  116. Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP, Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J.* 2000;348 Pt 1:29-35.
  117. Wilkinson TS, Potter-Perigo S, Tsoi C, Altman LC, Wight TN. Pro- and anti-inflammatory factors cooperate to control hyaluronan synthesis in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:92-9.
  118. von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2003;55:133-66.
  119. Hass R, Meinhardt G, Hadam M, Bartels H. Characterization of human TUR leukemia cells: continued cell cycle progression in the presence of phorbol ester is associated with resistance to apoptosis. *Eur J Cell Biol.* 1994;65:408-16.
  120. Knudson CB. Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J Cell Biol.* 1993;120:825-34.
  121. LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem.* 1992;267:10003-10.
  122. Wight TN, Potter-Perigo S, Aulinskas T. Proteoglycans and vascular cell proliferation. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1132-5.
  123. Lemire JM, Chan CK, Bressler S, Miller J, LeBaron RG, Wight TN. Interleukin-1beta selectively decreases the synthesis of versican by arterial smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2007;101:753-66.
  124. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1991;266:17640-7.
  125. Schonherr E, Kinsella MG, Wight TN. Genistein selectively inhibits platelet-derived growth factor-stimulated versican biosynthesis in monkey arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 1997;339:353-61.
  126. Foster LC, Arkonac BM, Sibinga NE, Shi C, Perrella MA, Haber E.

- Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:20341-6.
127. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest.* 1996;98:2403-13.
  128. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer.* 1995;60:632-6.
  129. Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest.* 1995;73:259-66.
  130. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med.* 1990;172:69-75.
  131. Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol.* 2002;161:849-57.
  132. Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, Nilsson SK, Thompson EW, Brown TJ. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:6139-50.
  133. Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y. Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.* 1999;59:1141-5.
  134. Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61:5207-14.
  135. Enegd B, King JA, Stylli S, Paradiso L, Kaye AH, Novak U. Overexpression of hyaluronan synthase-2 reduces the tumorigenic potential of glioma cells lacking hyaluronidase activity. *Neurosurgery.* 2002;50:1311-8.
  136. Itano N, Sawai T, Atsumi F, Miyaishi O, Taniguchi S, Kannagi R, Hamaguchi M, Kimata K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem.* 2004;279:18679-87.
  137. Kultti A, Rilla K, Tiihonen R, Spicer AP, Tammi RH, Tammi MI. Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions. *J Biol Chem.* 2006;281:15821-8.
  138. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol.* 1996;135:1139-50.
  139. Collis L, Hall C, Lange L, Ziebell M, Prestwich R, Turley EA. Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action. *FEBS Lett.* 1998;440:444-9.

140. Grammatikakis N, Grammatikakis A, Yoneda M, Yu Q, Banerjee SD, Toole BP. A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J Biol Chem*. 1995;270:16198-205.
141. Hofmann M, Fieber C, Assmann V, Gottlicher M, Sleeman J, Plug R, Howells N, von Stein O, Ponta H, Herrlich P. Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J Cell Sci*. 1998;111 ( Pt 12):1673-84.
142. Assmann V, Marshall JF, Fieber C, Hofmann M, Hart IR. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci*. 1998;111 ( Pt 12):1685-94.
143. Huang L, Grammatikakis N, Yoneda M, Banerjee SD, Toole BP. Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem*. 2000;275:29829-39.
144. Maxwell CA, McCarthy J, Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci*. 2008;121:925-32.
145. Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G, Pilarski LM. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell*. 2003;14:2262-76.
146. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1692:103-19.
147. Schlaepfer DD, Hunter T. Signal transduction from the extracellular matrix--a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct Funct*. 1996;21:445-50.
148. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 2001;114:3583-90.
149. Flavahan NA, Bailey SR, Flavahan WA, Mitra S, Flavahan S. Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H660-9.
150. Hsia DA, Lim ST, Bernard-Trifilo JA, Mitra SK, Tanaka S, den Hertog J, Streblov DN, Ilic D, Ginsberg MH, Schlaepfer DD. Integrin alpha4beta1 promotes focal adhesion kinase-independent cell motility via alpha4 cytoplasmic domain-specific activation of c-Src. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9700-12.
151. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:56-68.
152. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*. 1995;30:544-56.
153. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 1995;75:487-517.
154. Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by

- overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci.* 1996;109 ( Pt 7):1787-94.
155. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 1995;377:539-44.
156. Ilic D, Furuta Y, Suda T, Atsumi T, Fujimoto J, Ikawa Y, Yamamoto T, Aizawa S. Focal adhesion kinase is not essential for in vitro and in vivo differentiation of ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:300-9.
157. Akagi T, Murata K, Shishido T, Hanafusa H. v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7015-23.
158. Govindarajan G, Eble DM, Lucchesi PA, Samarel AM. Focal adhesion kinase is involved in angiotensin II-mediated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000;87:710-6.
159. Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem.* 2003;278:29420-34.
160. Zhang S, Chang MC, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem.* 1998;273:11342-8.
161. Savani RC, Wang C, Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM, Turley EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest.* 1995;95:1158-68.
162. Savani RC, Turley EA. The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty: development of a potential therapy. *Int J Tissue React.* 1995;17:141-51.
163. Savani RC, Khalil N, Turley EA. Hyaluronan receptor antagonists alter skin inflammation and fibrosis following injury. *Proc West Pharmacol Soc.* 1995;38:131-6.
164. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, Bissell MJ, Turley EA. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol.* 2006;175:1017-28.
165. Misra S, Toole BP, Ghatak S. Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2006;281:34936-41.
166. Fischer JW, Schror K. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2007;98:287-95.





## 9 Veröffentlichungen

### 9.1 Tagungen und Kongresse

Rabausch B; van den Boom M; Fischer J.W. (2005).

Suppression of hyaluronan synthase 3 expression by siRNA inhibits migration and spreading of arterial smooth muscle cells.

Dtsch. Med. Wochenschr. 2005; 130 Suppl.4.

Rabausch B, van den Boom M, Fischer JW. (2006).

Migration und spreading of arterial smooth muscle cells is supported by hyaluronan synthase 3.

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 2006; 372 Suppl 1.

Rabausch B., Fischer J.W. (2006)

Induction of Hyaluronic Acid Synthase 3 in human Vascular Smooth Muscle Cells by Interleukin 1 $\beta$ .

Dtsch. Med. Wochenschr. 2006; 132 Suppl.1: E33

Rabausch B; van den Boom M; Fischer J.W. (2006).

Suppression of hyaluronan synthase 3 by siRNA inhibites proliferation and migration of arterial smooth muscle cells.

Vascular Pharmakology 2006; 45 (3): 177-95.

Twarock S., Rabausch B., Schrör K.2, Fischer J.W. (2007)

Hyaluronic acid synthase-2 promotes the proliferative and migratory phenotype

of vascular smooth muscle cells.

Haemostaseologie 2007; 1-84: FV 50

Rabausch B., Fischer J.W. (2007).

Hyaluronic acid synthase 3 in human vascular smooth muscle cells is induced by interleukin 1 $\beta$ .

Haemostaseologie 2007; 1-84: FV 57.

Rabausch B., de Groot J., Fischer J.W. (2007).

Regulation of hyaluronic acid (HA) in vascular smooth muscle cells (VSMC) by cytokines.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2007; 375 Suppl 1: 64/300.

Berit Rabausch, Sören Twarock, and Jens W Fischer. (2007).

Regulation and Function of Hyaluronic Acid Synthase-3 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. Circulation, 2007; 116: II\_138.

Rabausch B., Twarock S., Dai G., Fischer J.W. (2008).

Keyrole of hyaluronan syntase-3 in control of vascular smooth muscle cell phenotype.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2008; 377 Suppl 1: 57/271.

Rabausch B., Twarock S., Dai G., Fischer J.W. (2008)

Hyaluonic acid synthase-3 promotes proliferation of human coronary smooth muscle cells.

Haemostaseologie 2008; 28: 1-98: O-07-05.

## 9.2 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifenberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic Acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic Acid synthases. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1451-1461

Rabausch B., Twarock S., Hanenberg H., Dai G., Geddert H., Fischer J.W. (2008).

Phenotypic Activation of Human Smooth Muscle Cells by Hyaluronic Acid Synthase 3: Implications for Inflammatory Matrix Remodeling

Circ Res (submitted)

## 10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Düsseldorf, den 9. Juni 2008

Berit Rabausch

## 11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens Fischer danke ich sehr herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Betreuung dieser Arbeit. Viele anregende Diskussionen brachten neue Denkansätze, Ideen und Sichtweisen hervor. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können. Die Tagungen in Charleston und Kuopio werden mir immer in Erinnerung bleiben. Herzlichen Dank!

Herrn Prof. Dr. Joachim Jose danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

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

Frau Peggy Marra Mann und Frau Annika Zimmermann danke ich herzlich für die experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

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

Dr. Sören Twarock danke ich für die Hilfe bei der Säulenchromatographie.

Guang Dai danke ich für die Klonierung des HAS3OE-Vektors. Ebenso möchte ich mich bei meinen Bürokollegen für die Hilfe bei diversen Computerproblemen bedanken.

Meiner Mutter und Ariane Melchior danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, sowie meiner Großmutter und meiner Schwester für die ideelle und praktische Unterstützung dieser Arbeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei Andreas Höppner für die nie erlahmende Unterstützung bedanken.

## 12 Lebenslauf

Name: Berit Rabausch  
Wohnort: Saarlauterner Str. 32, 51375 Leverkusen  
Geburtsdatum: 10. April 1978  
Geburtsort: Düsseldorf  
Schulbildung: 1988–1997: Freiherr vom Stein Gymnasium–Leverkusen  
1997: Abitur

Studium: Oktober 1997– September 1998  
Pharmaziestudium an der Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald  
Oktober 1998- April 2002  
Pharmaziestudium an der Universität Hamburg

Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (August 2000)

Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (April 2002)

Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Mai 2003)

Anstellung als

Apotheker Mai 2003– Januar 2005  
Schlehen-Apotheke, Leverkusen

Promotion: Januar 2005– Juni 2008  
Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische  
Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
bei Herrn Prof. Dr. J.W. Fischer

Düsseldorf, Mai 2008