

# **Untersuchung der Effekte von Interleukin-6 auf den Umbau der kardialen extrazellulären Matrix nach akutem Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Julia Müller**  
aus Rinteln

Düsseldorf, Mai 2014

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. rer. nat. Jens W. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2014

# Meiner Familie

*”Zusammenkommen ist ein Beginn,  
Zusammenbleiben ist ein Fortschritt,  
Zusammenarbeiten ist ein Erfolg.”*

Henry Ford

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hyaluronsäure .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Synthese und Funktion.....	3
1.2.2 Abbau .....	4
1.2.3 Bindeproteine und Rezeptoren.....	5
1.2.4 HA und das kardiovaskuläre System.....	5
<b>1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen – Myokardinfarkt.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Inflammatorische Phase .....	7
1.3.2 Proliferative Phase .....	8
1.3.3 Heilungsphase.....	8
<b>1.4 Interleukin-6 .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 IL-6 – Vorkommen, Funktion und Inflammation.....	9
1.4.2 Signaltransduktion .....	11
1.4.2.1 IL-6 classic signaling .....	12
1.4.2.2 IL-6 trans-signaling .....	12
1.4.3 Intrazelluläre Signalkaskade.....	12
1.4.4 Interleukin-6 und Myokardinfarkt .....	14
1.4.5 Weitere Zytokine der Interleukin-6 Familie .....	15
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Tierversuche .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Verwendete Tiere .....	17
2.1.2 Behandlungsgruppen .....	17
2.1.3 Versuchsdurchführung Myokardinfarkt.....	18
2.1.4 Linksventrikuläre Funktionsanalyse mittels Echokardiographie .....	20
2.1.5 Probenentnahme und Aufbereitung.....	20
2.1.6 Histologie.....	21
2.1.6.1 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie .....	21
2.1.7.1 Histochemische Färbungen.....	22
2.1.7.1.1 Hyaluronsäure .....	22
2.1.7.1.2 Makrophagen.....	23
2.1.7.1.3 HA-MAC2 Doppelfärbung .....	23
2.1.7.1.4 Neutrophile Granulozyten.....	23
2.1.7.1.5 Verwendete Antikörper für die histochemischen Färbungen .....	24
2.1.8 Durchflusszytometrie (FACS) .....	24
2.1.9 IL-6 und IL-6-Rezeptor ELISA .....	25
<b>2.2 Zellversuche .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Substanzen und Lösungen.....	26
2.2.1.1 Verwendete Substanzen in der Zellkultur.....	26
2.2.1.2 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Zellkultur .....	27
2.2.2 Isolation kardialer Fibroblasten und Kultur .....	27
2.2.3 Durchflusszytometrie – CD126 (IL-6R).....	28
2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.5 Western Blot.....	29

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	30
2.2.7 HA-ELISA-ähnlicher Assay.....	30
2.2.8 Zytochemische Färbungen.....	31
2.2.8.1 Hyaluronsäure .....	31
2.2.8.2 $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA) .....	31
2.2.8.3 Verwendete Antikörper für die zytochemischen Färbungen.....	32
2.2.9 Migration.....	32
2.2.10 Proliferation .....	33
2.2.11 Multiplex Analyse.....	33
<b>2.3 mRNA Expressionsanalyse.....</b>	<b>33</b>
2.3.1 RNA Isolation und Messung der mRNA-Konzentration.....	33
2.3.2 cDNA reverse Transkription und Real Time quantitative RT-PCR (qPCR) .....	34
2.3.3 Übersicht über die verwendeten Primer .....	34
<b>2.4 Auswertung.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 Färbungen .....	35
2.4.2 Statistik.....	36
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Permanente Okklusion der linken Koronararterie im Zeitverlauf bei C57BL/6J Mäusen.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 HA Expression im Herzgewebe.....	37
3.1.2 Genexpression der Has.....	38
3.1.3 Genexpression der Hyaladherine sowie der Hyaluronidase1 und -2 .....	39
3.1.4 Myofibroblasten Differenzierung.....	40
3.1.5 Plasmakonzentrationen der HA, des IL-6 sowie des sIL-6R .....	41
3.1.6 Genexpression des IL-6 sowie des IL-6R und dem von Makrophagen exprimierten Oberflächenprotein MAC2.....	42
<b>3.2 Applikation eines anti-IL-6 Antikörpers 16 h vor AMI bei C57BL/6J Mäusen .....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Genexpression der Has mRNA 12 h nach AMI .....	43
3.2.2 Plasmakonzentration der HA 12 h nach AMI.....	44
<b>3.3 Induktion der HA Expression in murinen kardialen Fibroblasten .....</b>	<b>45</b>
3.3.1 Stimulation der Zellen mit IL-6 im Zeitverlauf .....	45
3.3.2 Expression des membranständigen IL-6R auf KF.....	46
3.3.3 Stimulation der Zellen mit IL-6 in Kombination mit dem löslichen IL-6R im Zeitverlauf.....	47
3.3.4 Sekretion der HA ins Medium und perizelluläre HA .....	48
<b>3.4 Signaltransduktionsweg der Induktion von Has1 und -2 über IL-6 .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Western Blot Analyse der unterschiedlichen Signalwege .....	49
3.4.2 Hemmung der Phosphorylierung durch Inhibitoren.....	50
3.4.3 Hemmung der Has Genexpression durch die Inhibitoren.....	51
<b>3.5 HA-abhängige Induktion eines Myofibroblasten-Phänotyps durch IL-6 in KF .....</b>	<b>53</b>
3.5.1 Färbung der Zellen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin .....	54
3.5.2 Genexpression des Acta2 .....	54
3.5.3 Proliferation und Migration der KF.....	55
<b>3.6 Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine aus KF durch IL-6 Stimulation.....</b>	<b>56</b>
3.6.1 Multiplex Analyse.....	57
3.6.2 Genexpressionsanalyse der induzierten Zyto- und Chemokine nach 6 und 9 h ...	57
3.6.3 Genexpressionsanalyse in KF aus CD44 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	59
<b>3.7 In vivo Analyse pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine .....</b>	<b>60</b>
3.7.1 Expressionsniveau der Zytokine nach Behandlung mit dem anti-IL-6 AK.....	60
3.7.2 Expressionsniveau der Zytokine nach 4-MU-Behandlung der Tiere .....	61
<b>3.8 Konsequenzen der HA-Inhibition mittels 4-MU auf die inflammatorische Reaktion in vivo post AMI.....</b>	<b>63</b>
3.8.1 HA Expression im Herzgewebe nach 4-MU Behandlung .....	63
3.8.2 Ko-Lokalisierung der HA und Makrophagen 72 h nach AMI .....	64

3.8.3 Makrophagen-Infiltration des infarzierten Herzens nach 4-MU Behandlung .....	65
3.8.4 Neutrophilen-Infiltration im infarzierten Herz nach 4-MU Behandlung .....	68
3.8.5 Blutbildveränderungen nach 4-MU Behandlung .....	70
<b>3.9 Analyse der Herzfunktion 72 h nach AMI .....</b>	<b>71</b>
3.9.1 Ejektionsfraktion .....	71
3.9.2 Schlagvolumen .....	72
3.9.3 Herzzeitvolumen und Herzfrequenz .....	73
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Induktion HA-assoziiertes Genes nach AMI im Herzgewebe .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2 IL-6-Abhängigkeit der HA-Induktion nach AMI .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf das Zellkultur-Modell mit KF ...</b>	<b>78</b>
4.3.1 Signaltransduktionsweg in KF .....	79
<b>4.4 Aktivierung eines Myofibroblasten-Phänotyps in KF durch IL-6 trans-signaling</b>	<b>81</b>
<b>4.5 IL-6- und HA-abhängige Synthese pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine</b>	<b>82</b>
<b>in vitro und in vivo .....</b>	<b>82</b>
<b>4.6 Auswirkung der Hemmung der HA auf die inflammatorische Reaktion in vivo ...</b>	<b>85</b>
<b>4.7 Bewertung der Funktionsanalyse mittels Echokardiographie .....</b>	<b>88</b>
<b>4.8 Ausblick .....</b>	<b>89</b>
<b>4.9 Limitierung .....</b>	<b>90</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>92</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>Originalarbeiten .....</b>	<b>102</b>
<b>Kongressbeiträge .....</b>	<b>103</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>105</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>107</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Todesursachen in Deutschland 2012.....	1
Abbildung 2. Strukturelle Darstellung der HA [8].....	3
Abbildung 3. Darstellung der membranständigen HAS Isoenzyme 1-3. ....	3
Abbildung 4. Schematische Darstellung der drei Phasen nach AMI. ....	7
Abbildung 5. Einfluss des IL-6 auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen. ....	10
Abbildung 6. IL-6 Signaltransduktion.....	11
Abbildung 7. Grundlegende Unterschiede des IL-6 classic signaling und des trans-signaling. .....	12
Abbildung 8. Intrazelluläre Signaltransduktionskaskade des IL-6. ....	13
Abbildung 9. Behandlungsschemata der unterschiedlichen AMI-Gruppen. ....	18
Abbildung 10. Darstellung eines infarzierten Mäuse-Herzens. ....	19
Abbildung 11. Modifizierte Boyden-Kammer. ....	32
Abbildung 12. Hyaluronsäureakkumulation im linken Ventrikel nach Myokardinfarkt. ....	38
Abbildung 13. Has mRNA Expression nach AMI im linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) und im Septum (S). ....	39
Abbildung 14. mRNA Expression nach AMI im linken und rechten Ventrikel sowie im Septum. .....	40
Abbildung 15. Myofibroblasten-Marker.....	41
Abbildung 16. Plasmakonzentrationen im Zeitverlauf nach AMI von 12 h bis 14 d.....	42
Abbildung 17. IL-6 und IL-6R mRNA Expression im linken und rechten Ventrikel und Septum. .....	42
Abbildung 18. Lgals3 (Mac2) mRNA Expression im linken und rechten Ventrikel und im Septum.....	43
Abbildung 19. Has1-3 mRNA Expression 12 h nach AMI. ....	44
Abbildung 20. HA Konzentration im Plasma 12 h nach AMI. ....	44
Abbildung 21. Has1 und -2 mRNA Expression im Zeitverlauf nach IL-6 Stimulation. ....	46
Abbildung 22. IL-6R (CD126) Durchflusszytometrie-(FACS)-Analyse. ....	47
Abbildung 23. Has1-3 mRNA Expression im Zeitverlauf nach IL-6 + sIL-6R Stimulation. ....	48
Abbildung 24. Synthetisierte HA nach Stimulation mit IL-6 + sIL-6R für 24 h. ....	48
Abbildung 25. Western Blot Analyse der Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK. ....	50
Abbildung 26. Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach Inhibition mit AG490. .....	51
Abbildung 27. Hemmung der Has1 und -2 mRNA Expression durch AG490. ....	52
Abbildung 28. Beeinflussung der Has1 und -2 mRNA Expression durch Ly294002 und PD98059. ....	53
Abbildung 29. Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps durch IL-6 trans-signaling. ....	54
Abbildung 30. Acta2 mRNA Induktion in KF durch IL-6 und sIL-6R. ....	54
Abbildung 31. IL-6-abhängige DNA Synthese und Migration in KF. ....	56
Abbildung 33. mRNA Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in KF. ....	58
Abbildung 34. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in WT und CD44 <sup>-/-</sup> KF. ....	59
Abbildung 35. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in vivo post AMI.....	61
Abbildung 36. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in vivo post AMI.....	62
Abbildung 37. Induktion Acta2 mRNA in vivo post AMI.....	63
Abbildung 38. HA Färbung der Gewebeschnitte des Herzens 72 h post AMI.....	64
Abbildung 39. HA/MAC2 Doppelfärbung 72 h post AMI im linken Ventrikel. ....	65
Abbildung 40. MAC2 Färbung 72 h post AMI im linken Ventrikel.....	66
Abbildung 41. FACS-Analyse der Makrophagen (CD11b <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> -Zellen) in der Herzspitze 72 h nach AMI. ....	67
Abbildung 42. Neutrophilen Färbung 72 h post AMI im linken Ventrikel. ....	68
Abbildung 43. FACS-Analyse der Neutrophilen (CD11b <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup> -Zellen) in der Herzspitze 72 h nach AMI. ....	69
Abbildung 44. Analyse des Differenzial-Blutbilds 72 h nach AMI.....	70

<i>Abbildung 45. Echokardiographische Analyse der EF vor und 72 h nach AMI. ....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 46. Endsystolisches und enddiastolisches Kammervolumen vor und 72 h nach OP. ....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 47. Echokardiographische Analyse des SV vor und 72 h nach AMI. ....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 48. Echokardiographische Analyse des HZV vor und 72 h nach AMI. ....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 49. Echokardiographische Analyse der Herzfrequenz vor und 72 h nach AMI. ....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 50. Aktivierung der Synthese der Has Isoenzyme in kardialer Fibroblasten mittels IL-6 trans-signaling. ....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 51. Signaltransduktionsweg zur Induktion der Has mRNA in KF. ....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 52. Zusammenfassende schematische Darstellung der Immunzellrekrutierung in KF. ....</i>	<i>88</i>

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1. Lösungen und Pufferzusammensetzungen Histologie .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2. Antikörper histochemische Färbungen .....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3. Verwendete Substanzen in der Zellkultur .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 4. Lösungen und Pufferzusammensetzungen Zellkultur und Protein-Biochemie .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 5. Gelzusammensetzung SDS-PAGE .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 6. Antikörper Western Blot Analyse .....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 7. Antikörper zytochemische Färbung .....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 8. Verwendete Primer für die RT qPCR .....</i>	<i>35</i>

## Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AKT	Proteinkinase B
AMI	akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCDF	B-Zell Differenzierungs-Faktor
BSA	bovines Serumalbumin
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (z.B. CD44)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan

Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAC	N-Acetylglucosamin
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäure Bindeprotein
HARE	<i>hyaluronan receptor for endocytosis</i>
Has (HAS)	Hyaluronsäuresynthase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HF	Herzfrequenz
HGF	Hybridoma-Wachstumsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HMW-HA	hochmolekulare Hyaluronsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HSF	Hepatozyten-stimulierender Faktor
Hyal	Hyaluronidase
HZV	Herz-Zeit-Volumen
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin (z.B. IL-6)
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor $\alpha$
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KF	kardialer Fibroblast
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
KVE	kardiovaskuläre Erkrankung
KVR	kardiovaskuläre Risikofaktoren
LAD	Teil der linken Koronararterie ( <i>left anterior descending</i> )
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LMW-HA	niedermolekulare Hyaluronsäure

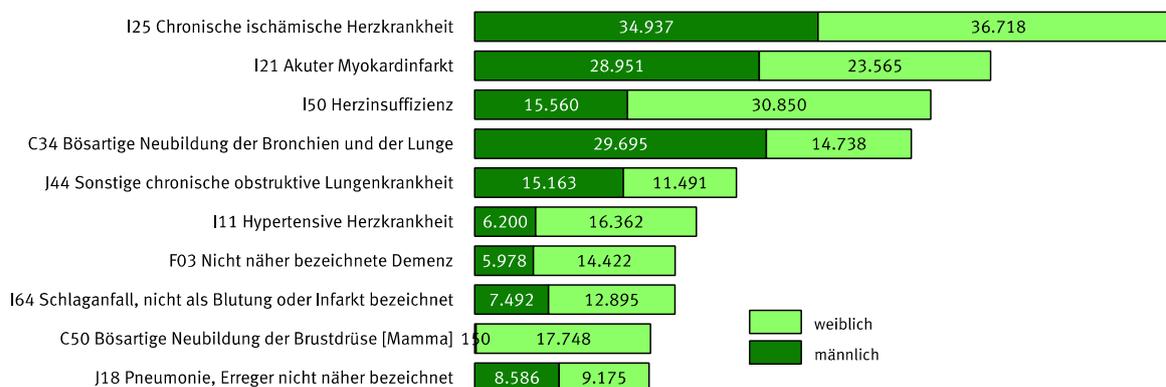
LV	linker Ventrikel
LYVE1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
M	Mol
MAC2	Galektin-3 (Lgals3)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-IL-6	<i>nuclear factor IL-6</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells</i>
OP	Operation
OSM	Oncostatin-M
p	Passage
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pM	Picomol
Raf	Raf-Protein ( <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> )
Ras	G-Protein Ras ( <i>rat sarcoma</i> )
RHAMM	Rezeptor für HA-medierte Motilität
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT qPCR	Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion
RV	rechter Ventrikel

S	Septum
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sIL-6R	löslicher Interleukin-6 Rezeptor
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween® 20
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSG-6	<i>tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
UDP	Uridindiphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -Glattmuskelaktin ( <i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i> )
$\mu$ Ci	Mikrocurie
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland

Kardiovaskuläre Erkrankungen (KVE) sind in Deutschland und auch anderen westlichen Ländern nach wie vor die häufigste Todesursache überhaupt. Fast jeder zweite Todesfall in Deutschland im Jahre 2012 ist auf eine kardiovaskuläre Erkrankung zurück zu führen (40,2%), dazu zählen im engeren Sinne vor allem die arterielle Hypertonie, die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die koronare Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt (MI) sowie Apoplex. Darunter sind wiederum die ischämischen Herzerkrankungen mit 36,6% die am meisten verbreiteten in Deutschland.



### Abbildung 1. Todesursachen in Deutschland 2012.

Darstellung der absoluten Zahlen der häufigsten Todesursache in Deutschland im Jahr 2012 unterteilt in Männer und Frauen. Aus „Todesursachen in Deutschland – Fachserie 12 Reihe 4 - 2012“, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, erschienen 12.12.2013, [www.destatis.de](http://www.destatis.de).

Die Gründe für Erkrankungen des Herzkreislaufsystems sind vielseitig, es handelt sich um typische Erkrankungen der Bevölkerung (Zivilisationskrankheiten) mit meist unbekanntem Ursprung, die durch mannigfaltige Risikofaktoren, die so genannten kardiovaskulären Risikofaktoren (KVR), begünstigt werden. Dazu zählen neben Alter, Übergewicht, Alkoholkonsum und Rauchen auch Vorerkrankungen wie Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes [1]. Da KVE oft erst in späteren Stadien erkannt und therapiert werden, kann oftmals die Ursache nicht behoben, sondern nur die Progression der Erkrankung verzögert werden, was bei einem hohen Prozentsatz der Erkrankten über kurz oder lang zum Tode führt. Da aber auch die Früherkennung solcher Erkrankungen einen letalen Ausgang nicht zwingend verhindern kann, bleibt es weiterhin von besonderem Interesse die Pathomechanismen der KVE zu erforschen.

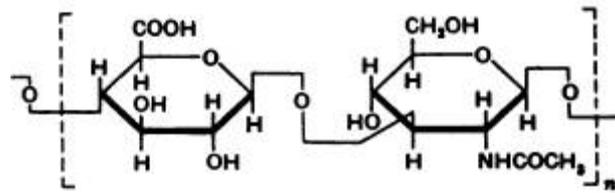
Vor allem das Krankheitsbild des akuten Myokardinfarkts (AMI) stellt therapeutisch eine große Herausforderung dar. Steht auf der einen Seite die Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes zur schnellen Reperfusion des unterversorgten Areals sowie die Hemmung der Hämostase zur Verhinderung weiterer Gefäßverschlüsse im Vordergrund, so ist auf der anderen Seite die Entlastung des geschädigten Herzens sowie die Erhaltung bzw. Wiederherstellung der Kontraktionskraft des geschädigten Gewebes das langfristige Therapieziel (Pocketleitlinie „Akutes Koronarsyndrom mit persistierender ST-Streckenhebung (STEMI)“, *European Society of Cardiology*, 2010) [2].

Die Akuttherapie des Myokardinfarkts ist derweilen relativ weit fortgeschritten wohingegen die Regeneration noch wenig erforscht ist. Es erweist sich als außerordentlich schwierig das Muskelgewebe des ischämischen Herzens zu erhalten bzw. den Umbau des Infarktgewebes in für das Herz funktionsloses Bindegewebe zu verhindern. Die sich im Verlauf des Umbaus ausbildende Infarktnarbe ist meist frei von Myozyten und enthält hauptsächlich Fibroblasten bzw. Myofibroblasten, die jedoch nur begrenzte kontraktile Eigenschaften besitzen. So führt der Umbau des Herzens zu einer bindegewebshaltigen Narbe zwangsläufig zu einer Insuffizienz des Herzens, meist einhergehend mit der Ausbildung einer pathologischen Herzhypertrophie des übrigen intakten Gewebes [3], [4]. Weitere mögliche schwerwiegende Komplikationen sind Ruptur des ausgedünnten infarzierten Herzgewebes und auch Rhythmusstörungen, die zu weiteren Komplikationen wie Schlaganfall, Embolien, Kammerflimmern oder plötzlichem Herztod führen können [5], [6].

Zwar gibt es erste Ansätze zur Inhibition der Fibrose nach MI, jedoch mangelt es weiterhin an etablierten therapeutischen Angriffsmöglichkeiten um den Umbau der kardialen Matrix nach AMI positiv zu beeinflussen [7].

## **1.2 Hyaluronsäure**

Das lineare, aus zwei alternierenden Saccharid-Untereinheiten aufgebaute Glykosaminoglykan (GAG) Hyaluronsäure (HA) besteht aus den beiden Monosacchariden Glukuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc). Die beiden Zucker-Monomere sind dabei  $\beta$ -1,3-glykosidisch und die daraus resultierenden Disaccharide wiederum über  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft.

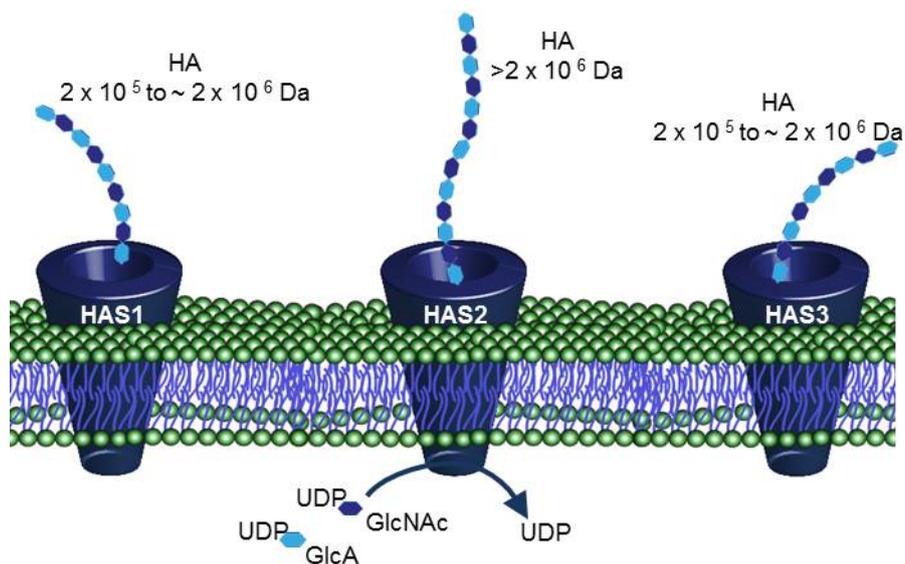


**Abbildung 2. Strukturelle Darstellung der HA [8].**

Alternierende Glukuronsäure- und N-Acetyl-D-glucosamin-Monomere in  $\beta$ -1,3-glykosidischer Verknüpfung.

### 1.2.1 Synthese und Funktion

Synthetisiert wird HA nicht wie die anderen GAGs im Golgi-Apparat sondern von drei transmembranären Synthasen, den Hyaluronsäuresynthase Isoenzymen (HAS) 1-3. Bei der Synthese werden die verknüpften Saccharide dabei direkt in den extrazellulären Raum extrudiert [9]. Besonderheiten gibt es hier bei der HAS3 zu beachten, beim Menschen liegen bislang fünf bekannte Splicevarianten vor, deren genaue Bedeutung noch nicht geklärt ist jedoch wird nicht von allen ein funktionsfähiges Protein gebildet ([www.vega.sanger.ac.uk](http://www.vega.sanger.ac.uk)) [10], wohingegen bei der Maus bislang nur eine Variante der HAS3 bekannt ist. Die HAS unterscheiden sich zum einen in ihrem Genlokus und zum anderen in der Größe der von ihnen synthetisierten HA Moleküle.



**Abbildung 3. Darstellung der membranständigen HAS Isoenzyme 1-3.**

Die HAS Isoenzyme synthetisieren aus den zwei Zuckermolekülen Glukuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin unter Abspaltung von Uridindiphosphat (UDP) HA. Die jeweiligen HAS Enzyme synthetisieren HA unterschiedlichen Molekulargewichts (Angabe in Dalton (Da)) (modifiziert nach Itano et al. 2002 [11]).

Die HA zeichnet sich des Weiteren im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen dadurch aus, dass sie weder der Sulfatierung noch der Acetylierung unterliegt und auch nicht an ein Kernprotein gebunden wird [8].

Ein menschlicher Körper von 70 kg enthält etwa 15 g HA, welche einem relativ hohen Metabolismus unterliegt. Innerhalb von etwa 48 bis 72 h erneuert sich der gesamte HA-Gehalt. Das Molekül besitzt eine erstaunliche Kapazität Wasser zu speichern und wird daher oftmals vor allem mit der Feuchtigkeitsspeicherung in der Haut in Verbindung gebracht, etwa die Hälfte der im Körper befindlichen HA ist auch dort vorzufinden. Darüber hinaus hat dieses vielseitige Molekül aber auch noch weitere wichtige physiologische Eigenschaften. Hohe Konzentrationen an HA sind außerdem im Glaskörper des Auges, als ‚Schmiermittel‘ in der Gelenkflüssigkeit, in der Nabelschnur und vor allem in der extrazellulären Matrix (EZM) des weichen Bindegewebes zu finden [12].

Über diese physiologischen Eigenschaften hinaus besitzt HA auch eine große Bedeutung in vielen pathophysiologischen Prozessen. Darunter sind Wundheilung, Tumorerkrankungen, Lungenerkrankungen, wie Asthma und Lungenfibrose, Nierenerkrankungen, Arthritis, Hirn-Traumata, Herzerkrankungen, wie Atherosklerose und Myokardinfarkt, Diabetes und Lebererkrankungen [13].

### **1.2.2 Abbau**

Der Abbau der HA läuft über fünf verschiedene degradierende Enzyme ab, die Hyaluronidasen (HYAL). Bekannt sind HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 und PH20 sowie ein Pseudogen, welches aber nicht translatiert wird, die Phyal1. Am Abbau der HA beteiligt sind vor allem HYAL1 und HYAL2, wobei die HYAL2 aus hochmolekularer HA (HMW-HA) Fragmente von bis zu 20 kDa Größe produzieren kann. Hingegen besitzt die HYAL1 die Fähigkeit, die HA bis zu einer Tetrasaccharid-Struktur abzubauen. Die Ausbildung von HA-Fragmenten ändert auch maßgeblich deren Eigenschaft. So agiert die HMW-HA wie beschrieben vor allem als Wasserspeicher, Schmiermitteln und vermittelt anti-apoptische Effekte. Niedermolekulare HA-Fragmente (LMW-HA) dahingegen weisen vor allem Eigenschaften als ‚Gefahrssignale‘ auf, sind pro-angiogen, entzündungsfördernd und wirken stimulierend auf das Immunsystem [14].

Neben dem enzymatischen Abbau unterliegt die HA aber auch der Spaltung durch reaktive Sauerstoffspezies, beide Prozesse kommen auch gleichzeitig vor, wie sich der Abbau jedoch genau verteilt ist unklar [12].

### 1.2.3 Bindeproteine und Rezeptoren

HA kann neben der freien Form auch kovalent an verschiedene Proteine gebunden vorliegen, sowohl an Bestandteile der EZM als auch an membranäre Proteine. Dies führt meist zu einer Beeinflussung der Funktion des entsprechenden Proteins. Beispiele hierfür sind CD44, HARE, LYVE1, Rezeptor für HA-mediierte Motilität (RHAMM), Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), TSG-6, Versican und andere. Besondere Bedeutung für pathophysiologische Prozesse haben hierbei die auch als sogenannte HA-Rezeptoren bezeichneten Proteine CD44, RHAMM und TLR, welche durch Aktivierung verschiedener spezifischer Signalwege beispielsweise die Proliferation und Migration von Zellen beeinflussen. Sie sind aber auch maßgeblich an der Vermittlung von Entzündungs-Signalen zur Aktivierung des Immunsystems und Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und auch der Tumorentstehung und Progression beteiligt [13], [15], [16], [17].

### 1.2.4 HA und das kardiovaskuläre System

Im kardiovaskulären System spielt die HA eine besondere Rolle. So zeigten Mäuse mit einer genetischen Deletion der HAS2 bereits im embryonalen Stadium vaskuläre Anomalien und ebenfalls eine starke Malformation des Herzens welche an Tag 9,5 bis 10 der Entwicklung zum Absterben der Embryonen führt [18]. Mäuse, die eine Deletion der HAS1 bzw. der HAS3 aufweisen, scheinen sich hingegen normal zu entwickeln und sind lebensfähig [11].

Daher erklärt sich auch, dass HA bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens reguliert ist und eine wichtige Rolle spielt. So ist in Rattenherzen beobachtet worden, dass im Verlauf einer Hypertrophie die Expression der HAS, die HA selbst und auch ihr Rezeptor CD44 ansteigen und zur Ausbildung des pathologisch vergrößerten Herzens beitragen [19].

Des Weiteren fand man heraus, dass HA in Rattenherzen bereits 24 h nach AMI vermehrt exprimiert wird und zur Wassereinlagerung im Gewebe (Herz-Ödem) beiträgt [20]. In weiteren Studien zeigte sich, dass die Proteine und anderen Bestandteile der EZM nach Infarkt das zelluläre Verhalten modulieren und die EZM einen schnellen Umbau bereits kurz nach der Ischämie durch Degradation und Neusynthese erfährt [21]. Ein wichtiger Mediator in der Umstrukturierung des Herzens nach Infarkt scheint auch CD44 zu sein. Eine Veröffentlichung beschreibt die Expression von CD44 im Herzen nach Infarkt auf vielen Zelltypen, wie z.B. auch Myofibroblasten. Ein Fehlen dieses Glykoproteins führte zu einem verschlechterten Umbau des Herzens und zu einer erhöhten Dilatation [22].

Eine andere Gruppe hat darüber hinaus zur Behandlung und Verbesserung der kardialen Umstrukturierung ein HA-haltiges Hydrogel nach MI injiziert, was tatsächlich zu einem

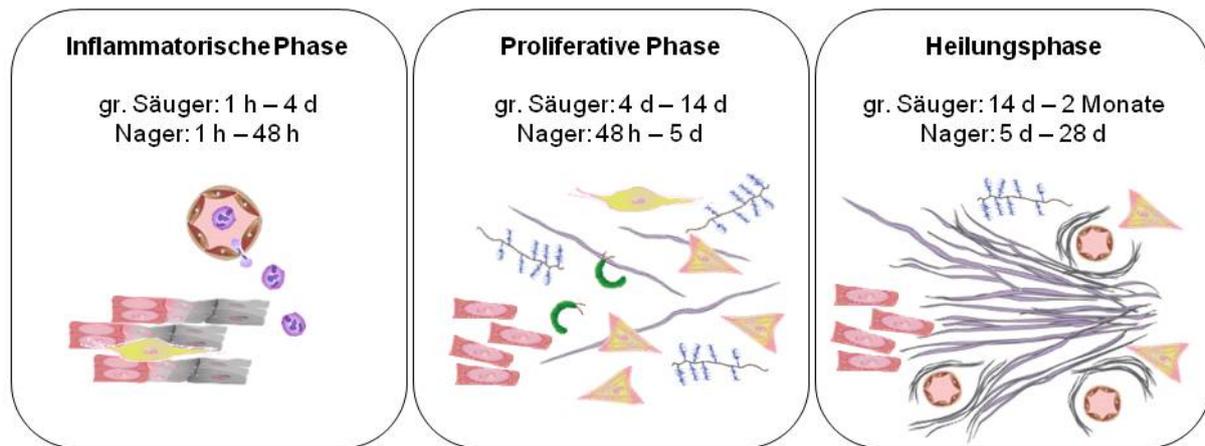
besseren hämodynamischen Resultat, einer stärkeren Wanddicke des Herzens und zu einer verstärkten Neovaskularisierung in den behandelten Tieren führte [23], [24].

Alle diese Studien lassen schlussfolgern, dass die HA im Verlauf von kardiologischen Erkrankungen eine essentielle Rolle einnimmt und man hier durch gezielte Modifikation der HAS einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen kann. Es stellt zudem einen möglichen Angriffspunkt für Medikamente dar.

### **1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen – Myokardinfarkt**

Der Myokardinfarkt ist die KVE mit der nach wie vor höchsten Letalität. Etwa ein Drittel aller Patienten versterben bereits auf dem Weg ins Krankenhaus oder am ersten Tag nach Hospitalisierung, meist bedingt durch ein zu spätes Erkennen der Symptomatik und ein zu spätes Aufsuchen eines Arztes/Krankenhauses. Dagegen ist die 5-Jahres-Überlebensrate nach Überstehen der ersten 28 Tage nach AMI mit 84-89 % vergleichsweise hoch („Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt“, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem statistischen Bundesamt, Heft 33, August 2006).

Der Myokardinfarkt ist die Folge der Okklusion eines versorgenden Herzgefäßes durch ein Blutgerinnsel. Die Größe des verschlossenen Blutgefäßes ist entscheidend für das Ausmaß der Zerstörung des unterversorgten Myokardgewebes. Da das Herz nur eine geringfügige regenerative Kapazität besitzt, führt eine ischämische Unterversorgung fast immer zum Ersetzen von abgestorbenen Kardiomyozyten durch eine bindegewebshaltige Narbe. Der Verlauf sowie der Umbau der Matrix nach MI lassen sich bei Menschen wie auch Nagetieren in drei übergeordnete Phasen unterteilen. Auf die frühe inflammatorische Phase folgt die proliferative Phase auf die wiederum die Reifungs- und Heilungsphase folgt.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung der drei Phasen nach AMI.**  
 Modifiziert nach Dobaczewski *et al.* 2009 [25] und Liehn *et al.* 2011 [26].

Jede dieser Phasen zeichnet sich durch charakteristische Eigenschaften aus, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

### 1.3.1 Inflammatorische Phase

In der unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis auftretenden Entzündungsphase kommt es infolge der Hypoxie zum vermehrten Absterben der Kardiomyozyten und zur schnellen Aktivierung des Komplementsystems, zur Generierung freier Sauerstoffspezies und Aktivierung von TLR-vermittelten Signalwegen. Hierdurch wiederum kommt es zur Expression verschiedener, zum Teil auch kardioprotektiver Zyto- und Chemokine sowie Adhäsionsmoleküle, darunter z.B. IL-6, TNF $\alpha$ , HIF, CCL2, CXCL12 und CCL3. Durch diese massive Ausschüttung an inflammatorischen Zyto- und Chemokinen kommt es bereits schnell nach der Ischämie zur Infiltration des Gewebes mit Neutrophilen. Die Immunzellen sezernieren proteolytische Enzyme wie z.B. MMP (Matrixmetalloproteinasen), die die kardiale Matrix degradieren. Des Weiteren werden chemotaktische Faktoren freigesetzt und dadurch die Akkumulation von frühen inflammatorischen Monozyten gefördert. Die frühen Monozyten wiederum verdauen geschädigtes Gewebe und bereinigen das Infarktareal von Zelltrümmern. Durch die erhöhte Permeabilität der kardialen Mikrogefäße kommt es zur Extravasation von Fibrinogen und Plasma-Fibronektin, welche ein provisorisches EZM-Netzwerk ausbilden.

Die etwas später infiltrierenden Monozyten schwächen die Entzündungsreaktion wieder ab und bewirken eine Akkumulation von Myofibroblasten und fördern die Angiogenese. Die Expression von TGF- $\beta$  und IL-10 stoppt die Entzündungsreaktion gänzlich und der Übergang zur proliferativen Phase wird geschaffen.

### 1.3.2 Proliferative Phase

Sobald das Infarktgebiet vollständig von toten Zellen und Zelltrümmern befreit ist wird es umso wichtiger, die Entzündungsreaktion zu unterdrücken um weiteren Schaden zu verhindern. Durch Einwanderung der nicht-inflammatorischen Monozyten sowie Lymphozyten und Mastzellen und der Sekretion der anti-inflammatorischen Zyto- und Chemokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 wird die proliferative Phase eingeleitet. Verschiedene Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), CXCL12, CXCL1, CXCL2, MIF und CCL2 werden vermehrt exprimiert und führen unter anderem zur Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen, die zur Bildung eines mikrovaskulären Netzwerkes zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen beitragen. Von den Lymphozyten wird neben IL-10 auch TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*)-1 sekretiert, der den weiteren Abbau der Matrix durch MMPs verhindert. Die Fibroblasten synthetisieren große Mengen an Matrixbestandteilen und geben dadurch mechanische Unterstützung. Die Differenzierung dieser Zellen sowie deren Proliferation werden unter anderem durch TGF- $\beta$  und CCL2 gefördert. Die aktivierten Myofibroblasten übernehmen kontraktile Charakteristika von glatten Muskelzellen, um die Herzfunktion in geringem Maße zu imitieren. Die neu synthetisierten Matrixmoleküle wie Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine bilden eine neue EZM aus, die die provisorische Fibrinogen- und Fibronectin-haltige Matrix nach und nach ersetzt. Zell-Zell-Interaktionen werden hier hauptsächlich durch die matrizellulären Proteine Thrombospondin-1 und -2, Osteopontin, TenascinC, Periostin und weitere übermittelt. Diese werden in gesunden Herzen nicht exprimiert und sind für die proliferative Phase charakteristisch, sie sind wichtig um die dynamischen zellulären Veränderungen im Herzen nach Infarkt zu vermitteln.

### 1.3.3 Heilungsphase

Die Reifungs- und Heilungsphase ist die abschließende Phase zur Ausbildung einer stabilen Narbe. Bereits in der proliferativen Phasen werde einige Enzyme (z.B. Lysyl-Oxidase) zur Quervernetzung der EZM Moleküle, wie Kollagen und HA, exprimiert, die auch hier aktiv sind und an der Ausbildung einer dicht vernetzen kollagenhaltigen Narbe beteiligt sind. Die reife Narbe erhöht die Zugfestigkeit des infarzierten Gewebes und gleichzeitig aber auch die Steifigkeit des Herzens und erhöht die damit verbundene myokardiale Dysfunktion. Ein Großteil der Kardimyozyten und Gefäßzellen unterliegt hier der Apoptose, die Narbe ist ein sehr zellarmes Gewebe mit nur geringer metabolischer Aktivität [25], [26].

Der gesamte Prozess der Postinfarkt-Umstrukturierung wird durch den schnellen Ab- und Umbau sowie die Neusynthese von Matrixmolekülen bestimmt. Welche Funktion und Auswirkung diese Prozesse im Detail haben ist noch nicht vollständig geklärt.

## **1.4 Interleukin-6**

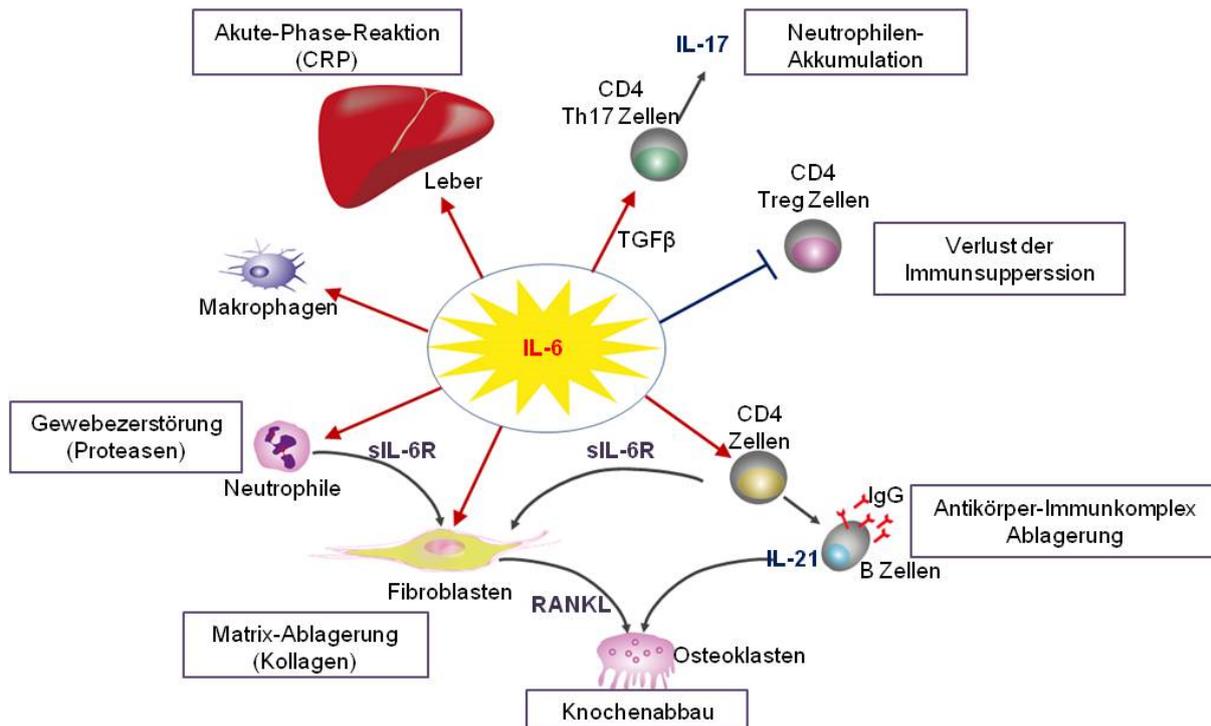
1980 erstmals entdeckt und damals noch als Interferon  $\beta 2$  oder auch das 26-kDa-Protein bezeichnet, war Interleukin-6 aufgrund seiner mangelnden antiviralen Eigenschaft als Molekül ohne Funktion bezeichnet worden. Viele andere Forschergruppen waren ebenfalls diesem Molekül auf der Spur und da es erst spät als ein und das selbe Molekül identifiziert werden konnte, hatte Interleukin-6 bis zur endgültigen Charakterisierung viele verschiedene Namen, Hybridoma-Wachstumsfaktor (HGF), B-Zell Differenzierungs-Faktor (BCDF) oder auch Hepatozyten-stimulierender Faktor (HSF) [27]. Erst 1987 identifizierten Poupart *et al.*, dass es sich bei all diesen Molekülen um ein identisches handelte und schlugen vor es einheitlich als Interleukin-6 (IL-6) zu bezeichnen, was 1988 von dem *New Yorker Academy of Science* Kongress bestätigt und angenommen wurde [28].

Heute ist bekannt, dass Interleukin-6 unter anderem eine wichtige Rolle in der Immunantwort, im speziellen der Akut-Phase-Reaktion, der Entzündungsreaktionen, der Hämatopoese und der Onkogenese spielt [29].

### **1.4.1 IL-6 – Vorkommen, Funktion und Inflammation**

Das 21 kDa (beobachtet wurden 21 - 28 kDa) große IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das zum einen von vielen verschiedenen Zellen durch unterschiedlichste Stimuli synthetisiert wird und auf der anderen Seite über unterschiedliche Wege ebenfalls viele verschiedene Zellen als Zielstruktur aufweist. Es wird synthetisiert von Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen), von B-Zellen und auch zu einem geringeren Maß von T-Helfer-Zellen. Daneben gibt es auch eine Reihe an nicht-Leukozyten die IL-6 sekretieren, darunter Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Muskelzellen und einige maligne Zelllinien. Gemeinsam ist den unterschiedlichen Stimuli des IL-6, dass sie meist durch ähnliche exogene oder endogene Reize hervorgerufen werden (z.B. UV-Licht, Bestrahlung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Produkte mikrobiellen Ursprungs, Viren oder auch andere pro-inflammatorische Zytokine) [30], [31]. Ebenso vielfältig wie die synthetisierenden Zellen des IL-6 ist seine Funktion. Dachte man noch kurz nach seiner Entdeckung, IL-6 sei schlicht ein Marker für inflammatorische Prozesse, so hat sich in den Jahren darauf gezeigt, dass IL-6 tatsächlich an der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen beteiligt ist. Man fand erhöhte IL-6-Plasmaspiegel in Erkrankungen wie

Arthritis, Morbus Castleman und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn), welche teilweise auch mit dem Schweregrad der Erkrankung in Relation standen [32]. Erst Jahre später gab es die ersten Belege dafür, dass IL-6 direkt an der Entstehung von z.B. Arthritis beteiligt ist. Hier zeigten IL-6-defiziente Mäuse eine Resistenz gegen die kollageninduzierte Arthritis im Tiermodell [33]. Erste Vermutungen zur möglichen Blockade von IL-6 bzw. dem IL-6R im Hinblick auf die Therapie der Arthritis wurden aufgestellt, die sich später bestätigten [34].



**Abbildung 5. Einfluss des IL-6 auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen.**

Überblick diverser Mechanismen über die IL-6 zur Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen beitragen kann (modifiziert nach Rincon 2012 [30]).

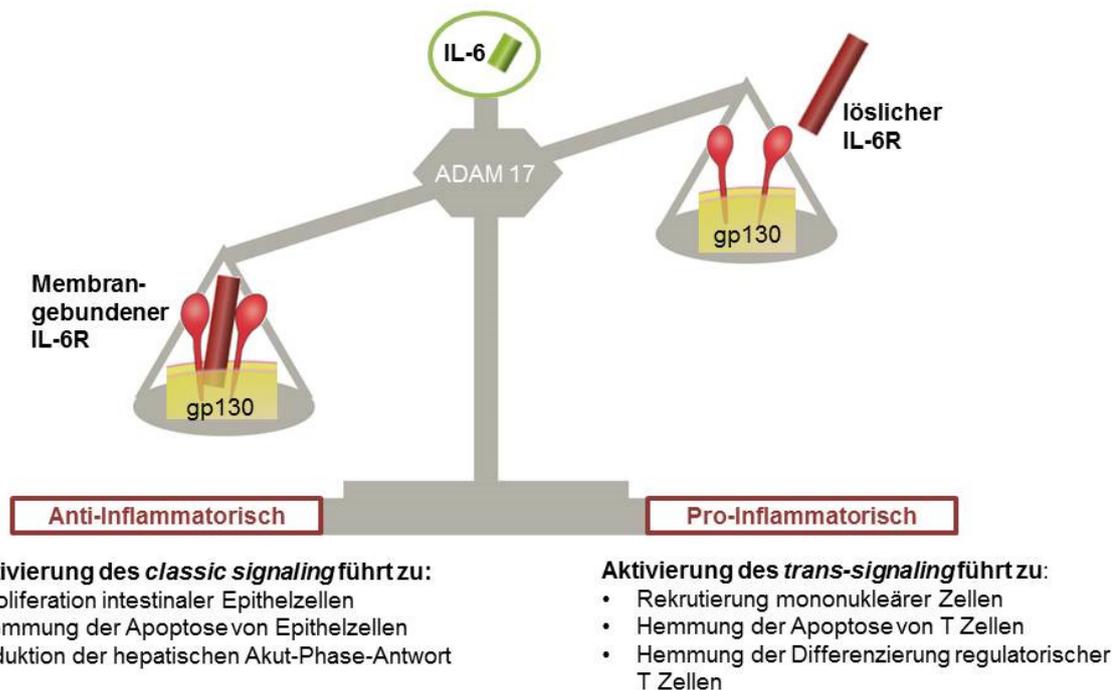
IL-6 beeinflusst regulierend das Zellwachstum, die Genaktivierung, die Proliferation, das Zellüberleben sowie die Differenzierung. Es spielt eine entscheidende multifunktionale Rolle in vielen entzündlichen Erkrankungen, in deren Entstehung sowie in der Ausprägung des Schweregrads [30].

Darüber hinaus spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunantwort als Mediator der Akut-Phase-Reaktion und ist an der Produktion verschiedener Akut-Phase-Proteine in der Leber beteiligt [35]. Die Aufgabe der Akut-Phase-Reaktion ist vor allem die Gewebeerstörung durch entzündliche Reize zu minimieren und die Wundheilung des geschädigten Gewebes zu fördern.

### 1.4.2 Signaltransduktion

Zur IL-6-vermittelten Signaltransduktion bedarf es eines Rezeptorkomplexes aus dem IL-6 Rezeptor  $\alpha$  (IL-6R) und dem transmembranären Protein gp130. Das Glykoprotein gp130 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen es nur einige wenige Zellen gibt, die auch den IL-6R exprimieren, dazu zählen vor allem Zellen des Immunsystems, wie CD4<sup>+</sup>-Zellen oder Neutrophile und auch Hepatozyten.

IL-6 hat jedoch eine Vielzahl von Effektor-Zellen, und um all diese dem IL-6 zugänglich zu machen, ist eine lösliche Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R) nötig, welche durch ‚shedding‘ des membrangebundenen Rezeptors entsteht [36]. Hauptsächlich an der Abspaltung des Rezeptors von der Membran beteiligt ist ADAM17, eine Metalloprotease die viele verschiedene Substrate hat [37]. Im Menschen gibt es eine weitere Möglichkeit der Entstehung von sIL-6R durch alternatives *Splicing*, in der Maus ist dies allerdings nicht beschrieben [38]. Entgegengesetzt zu anderen Signaltransduktionswegen bei denen die lösliche Form eines Rezeptors meist als Inhibitor oder Antagonist fungiert übernimmt der sIL-6R hier ebenfalls eine agonistische Wirkung. Jedoch gibt es einige Veröffentlichungen, die vermuten lassen, dass das *classic* und das *trans-signaling* unterschiedliche Antworten hervorrufen.



#### Abbildung 6. IL-6 Signaltransduktion.

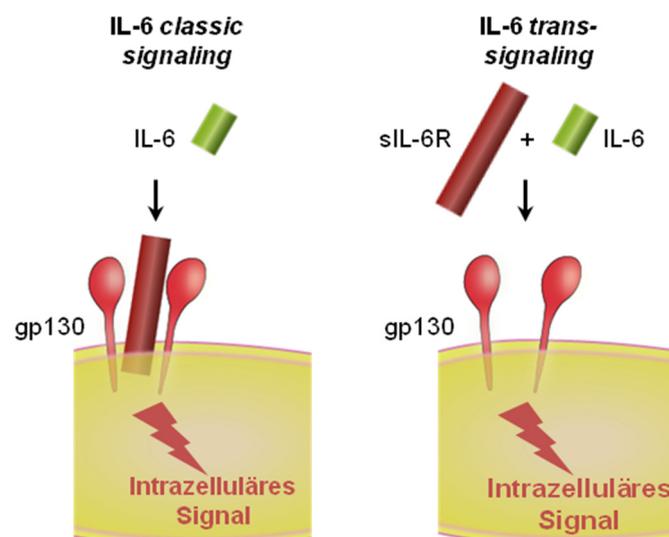
Unterschiedliche pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften des IL-6 *classic signaling* und des IL-6 *trans-signaling*. Die Regulation der Menge des löslichen Rezeptors wird über Metalloproteasen wie ADAM17 reguliert (modifiziert nach Rose-John 2012 [39]).

### 1.4.2.1 IL-6 classic signaling

Das *classic signaling* des IL-6 ist charakterisiert durch den membrangebundenen IL-6R, der das freie IL-6 bindet und anschließend einen Komplex mit zwei gp130 Molekülen eingeht, was die Signaltransduktionskaskade in Gang setzt. Dieser Prozess findet zum Beispiel in der Leber vor allem auf Hepatozyten statt und ist für die Vermittlung der Akut-Phase-Reaktion essentiell.

### 1.4.2.2 IL-6 trans-signaling

Der Weg des *trans-signaling* unterscheidet sich in einem wesentlichen Punkt vom *classic signaling*. Hierbei entsteht durch Abspalten des membrangebundenen IL-6R von IL-6R exprimierenden Zellen durch Enzyme (z.B. ADAM17) der lösliche Rezeptor, welcher dann in freier Form vorliegt. Der sIL-6R kann direkt das freie IL-6 binden und der Komplex kann wiederum viele verschiedene Zellen aktivieren, die zwar das ubiquitäre gp130 aber nicht den IL-6R exprimieren. Auch hier bindet der Komplex aus IL-6 und sIL-6R an zwei gp130 Moleküle und es kommt zur Signaltransduktion (siehe Abb. 7).



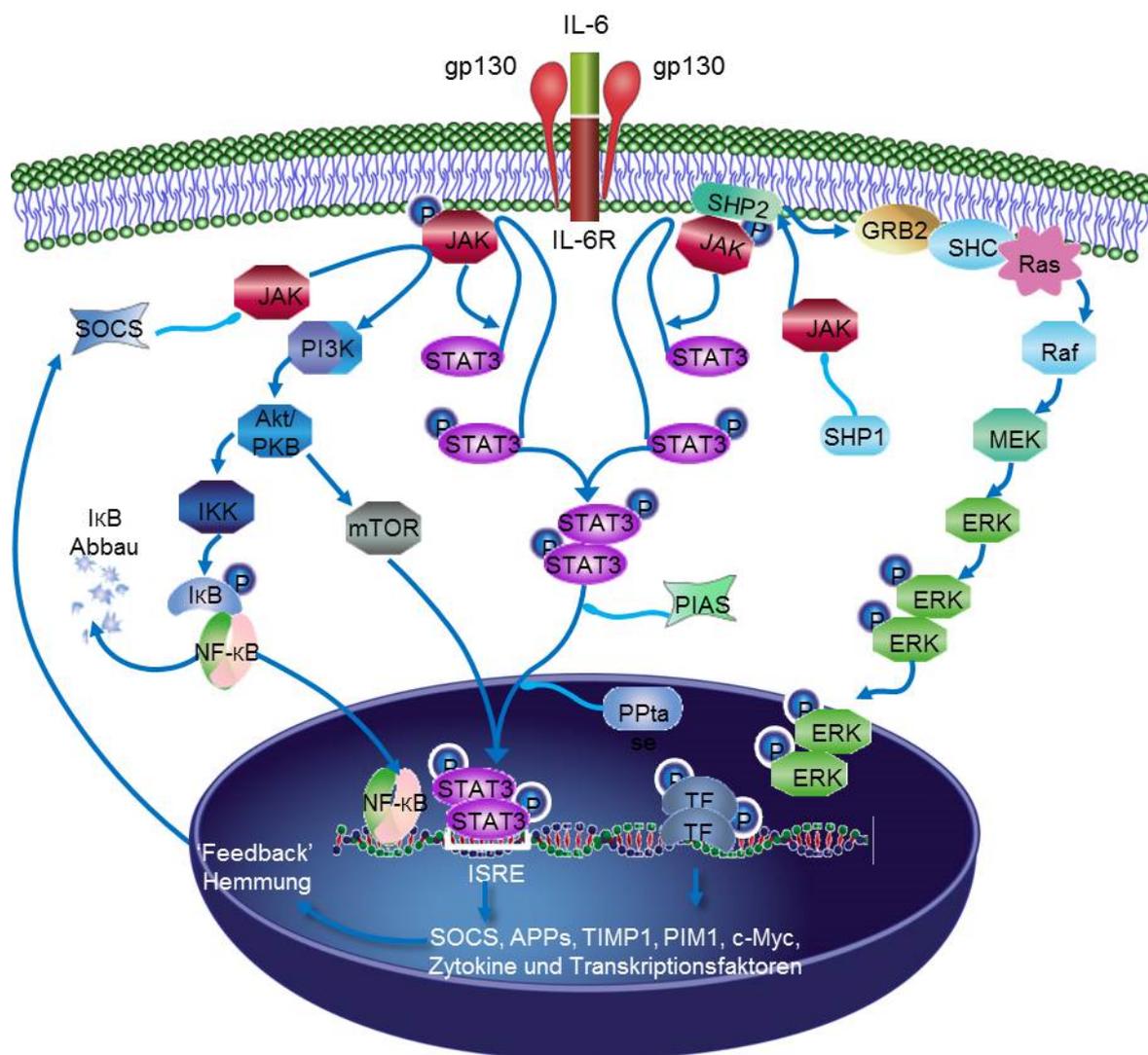
**Abbildung 7. Grundlegende Unterschiede des IL-6 classic signaling und des trans-signaling.**

Die Vermittlung des Signals erfolgt bei dem *classic signaling* über die beiden membranständigen Rezeptoren IL-6R und gp130 wohingegen das *trans-signaling* über den löslichen IL-6R und den membranständigen gp130 Rezeptor vermittelt wird (modifiziert nach Rose-John 2012 [39]).

### 1.4.3 Intrazelluläre Signalkaskade

IL-6-vermittelte Signalkaskaden können über verschiedene Wege ablaufen. Zum einen kommt es nach Aktivierung der Januskinase (JAK) zur Phosphorylierung von STAT (*Signal*

*Transducers and Activators of Transcription*), insbesondere von STAT3, welches nach Dimerisierung in den Zellkern translozieren kann und so die Gentranskription aktiviert. Ein weiterer Weg führt über die Aktivierung der Ras (*rat sarcoma*)/Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) Kaskade welche die MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase induziert, welche wiederum Transkriptionsfaktoren wie Elk1 und NF-IL-6 (*nuclear factor IL-6*) aktiviert, die die Transkription vermitteln [29]. Als weitere Möglichkeit der intrazellulären Signaltransduktion bietet sich die PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B (*phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B/nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells*) Kaskade an, über welche vor allem anti-apoptotische Effekte vermittelt werden [40].



**Abbildung 8. Intrazelluläre Signaltransduktionskaskade des IL-6.**

Signalwege ausgelöst durch Aktivierung der Zelle mittels IL-6 (*classic signaling*) modifiziert nach [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6\\_Pathway](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway).

#### 1.4.4 Interleukin-6 und Myokardinfarkt

So wie IL-6 in vielen inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige und kritische Rolle spielt, so ist auch der Einfluss von IL-6 im Geschehen nach AMI sehr entscheidend. Es gibt diverse Studien, die sich mit IL-6 und AMI auseinandergesetzt haben. Zum Beispiel zeigten Miyao *et al.* 1993 [41] und Ueda *et al.* 1999 [42], dass die Plasmaspiegel von IL-6 nach AMI deutlich erhöht sind, die Rolle des IL-6 war zu dem Zeitpunkt aber weitgehend unbekannt. Etwas später konnte von Lindmark *et al.* gezeigt werden, dass hohe IL-6 Spiegel nach einem ischämischen Ereignis, wie z.B. bei der koronaren Herzkrankheit, mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate einhergehen [43]. Des Weiteren gibt es Belege, dass IL-6 selbst von Kardiomyozyten produziert wird [44] und daher auch vermehrt im Herzgewebe nach Infarkt vorkommt [45]. Um die Rolle von IL-6 im Infarkt-Geschehen weiter zu charakterisieren haben Kobara *et al.* Mäusen nach AMI einen Antikörper, der gegen den IL-6 Rezeptor gerichtet ist, appliziert und konnten damit eine verminderte inflammatorische Reaktion sowie einen verbesserten Umbau des linken Ventrikels zeigen [46]. Eine andere Gruppe zeigte wiederum, dass Tiere, denen kurz vor der Induktion eines AMI ein Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R in den linken Ventrikel injiziert wird, eine signifikant kleinere Infarktgröße aufweisen, da das Absterben des Myokards reduziert ist [47]. Im Gegensatz zu den genannten Studien steht allerdings eine Veröffentlichung von Fuchs *et al.*, die zeigte, dass Mäuse mit einem *knock out* des IL-6 Gens nach Infarkt keinerlei Unterschiede im Überleben und in der Infarktgröße im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufweisen. Darüber hinaus zeigte die Applikation von exogenem IL-6 bei Wildtyp-Mäusen nach Infarkt ebenfalls keinen Effekt. Man vermutete aber in dieser Publikation, dass die Funktionen des IL-6 möglicherweise durch andere inflammatorische Zytokine übernommen werden, die ebenfalls über den gp130 Rezeptor ihre Effekte vermitteln [48].

All diese Studien lassen vermuten, dass IL-6 durchaus eine Zielstruktur in der Therapie des AMI darstellen kann, jedoch ist nicht eindeutig geklärt ob IL-6 allein destruktive oder aber protektive Effekte nach AMI vermittelt. Eine ausgewogene Aktivierung des IL-6 scheint jedoch nötig zu sein.

Weitere Indizien, dass IL-6-vermittelte Entzündungsreaktionen nach Infarkt wichtig für die Heilung sind, jedoch eine verlängerte Aktivierung der IL-6-Zielstruktur, des STAT3, ebenfalls auch sehr negative Auswirkungen haben kann, zeigten einige sehr aufwändige Publikationen von Hilfiker-Kleiner *et al.* [49], [50]. Diese lassen vermuten, dass eine frühe inflammatorische Aktivierung des STAT3 eine wichtige kardioprotektive Rolle spielt, aber die permanente Aktivierung des STAT3, wie sie z.B. bei dauerhaft erhöhten IL-6 Plasmaspiegeln vorkommt, zu vermehrt negativen Ereignissen, wie linksventrikulären Rupturen und Herzinsuffizienz, nach AMI führt.

### **1.4.5 Weitere Zytokine der Interleukin-6 Familie**

Die Zytokine vom Interleukin-6-Typ umfassen neben IL-6 noch IL-11, IL-27, IL-31, LIF (*leukemia inhibitory factor*), OSM (Onkostatin M), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin-1*) und CLC (*cardiotrophin-like cytokine*). Mit Ausnahme von IL-31 haben all diese Zytokine gemeinsam, dass sie in ihrer Signaltransduktionskaskade den gp130 Rezeptor nutzen.

Darüber hinaus sind sie auch strukturell ähnlich, die funktionelle Redundanz die diese Zytokine zu einem großen Teil aufweisen ist anhand der geteilten Rezeptoruntereinheit gp130 zu erklären. Es ist bekannt, dass die Zytokine der IL-6 Familie vor allem an der Immunreaktion und auch Knochen-, Muskel-, Hirn- und kardiovaskulären Funktionen beteiligt sind [51].

## 1.5 Zielsetzung

Da der Myokardinfarkt nach wie vor die KVE mit der höchsten Sterblichkeitsrate ist, ist es zwingend notwendig, dass weitere Analysen möglicher Angriffspunkte zur Beeinflussung der verschiedenen Pathomechanismen nach Infarkt durchgeführt werden.

Da in vielen westlichen Ländern die Risikofaktoren, einen Myokardinfarkt zu erleiden immer weiter steigen und zum Großteil von der Bevölkerung als wenig kritisch betrachtet und deshalb missachtet werden, ist es von ungeheurer Wichtigkeit, Möglichkeiten zu erforschen, die die Ausbildung einer nahezu funktionslosen Narbe beeinflussen oder sogar vermindern können. Die kardiologische Akutversorgung nach AMI ist relativ weit fortgeschritten und kann kaum mehr wesentlich verbessert werden, es mangelt jedoch an Strategien zur Reduktion der Schäden am Myokard. Hier wäre wünschenswert positiven Einfluss auf den Umbau des kardialen Gewebes nach AMI nehmen zu können, um zumindest teilweise die kontraktile Funktion des Herzens zu erhalten

Das Tiermodell des Myokardinfarktes ist zu diesem Zweck sehr nützlich, da man die jeweiligen Stadien nach Infarkt hier sehr gut auf histologischer und molekularbiologischer Ebene untersuchen kann und darüber hinaus verschiedene Prozesse im Vorfeld durch Antikörper, Medikamente oder andere Substanzen inhibieren oder induzieren und deren Auswirkungen auf die Umstrukturierung des Gewebes analysieren kann.

Des Weiteren können aus demselben Mausstamm problemlos primäre Herzzell-Kulturen gewonnen werden, die zur Überprüfung der *in vivo* Ergebnisse dienen können und die mechanistische Analyse stützen.

Die schnelle Umwandlung und Degradation der Matrix beginnt unmittelbar nach Infarkt. Es gibt Hinweise, dass auch hier bereits Synthese von Matrixmolekülen stattfindet, die ebenfalls an der inflammatorischen Antwort nach Infarkt beteiligt sein könnten.

Das Ziel dieser Arbeit liegt daher darin, die einflussnehmenden Faktoren des frühen Matrix-Umbaus nach Infarkt und die damit verbundenen Auswirkungen auf das Herz zu analysieren.

Folgende Fragen stehen dabei im Fokus:

- Welche Faktoren führen zu der frühen Synthese von HA?  
→ Induktoren, Zeitraum nach AMI (Akut- und Subakut-Phase), Degradierung
- Welche Auswirkungen hat das auf den Fibroblasten-Phänotyp?  
→ Myofibroblasten-Aktivierung, Funktion, Matrix-Synthese
- Welche Konsequenzen resultieren daraus für die inflammatorische Antwort?  
→ Immunzellinfiltration, hämodynamische Auswirkungen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuche

#### 2.1.1 Verwendete Tiere

Die für die Versuche verwendeten männlichen C57BL/6J Mäuse wurden über Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. Die Haltung der Tiere sowie die Durchführung der Versuche erfolgten in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter standardisierten Bedingungen. Die Tiere hatten freien Zugang zu entkeimtem Trinkwasser sowie Futter (z.T. in Sondermischungen) der Firma Ssniff (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest).

Die Genehmigung der hier durchgeführten Versuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 erteilt (Aktenzeichen 84-02.04.2012.A138).

#### 2.1.2 Behandlungsgruppen

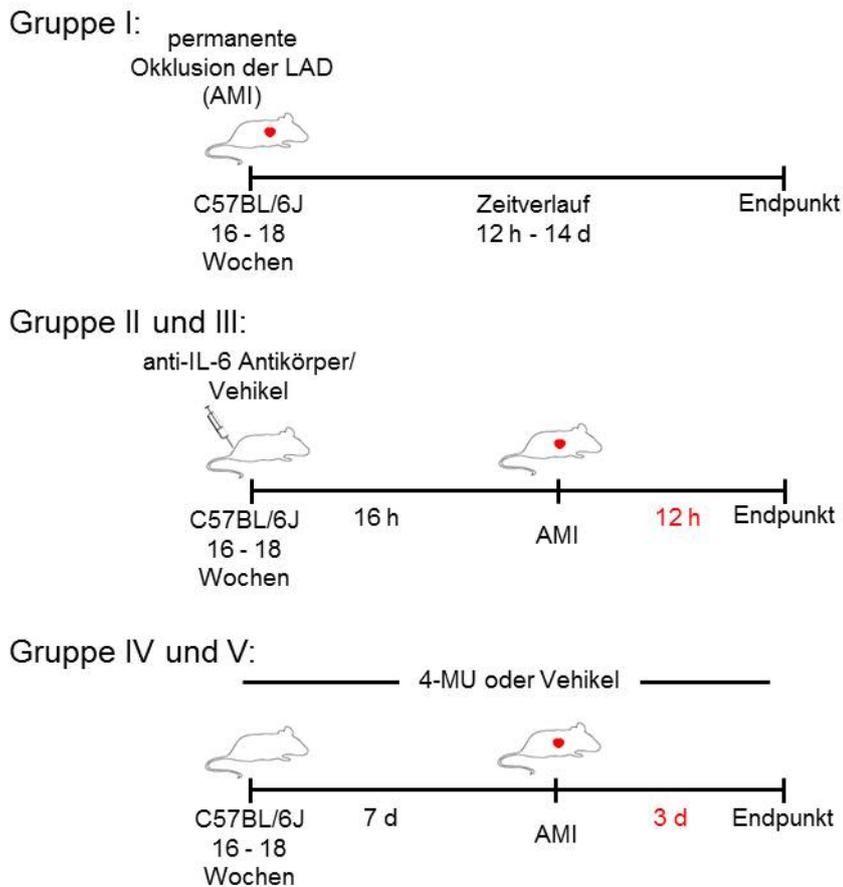
Es wurden für die Versuche fünf verschiedene Behandlungsgruppen unterschieden:

- I. keine Behandlung, Normalfutter
- II. anti-IL-6 Antikörper Injektion, Normalfutter
- III. PBS (Vehikel) Injektion, Normalfutter
- IV. keine Behandlung, Spezialfutter (50 g/kg 4-Methylumbelliferon (4-MU), Schoko-Aroma)
- V. keine Behandlung, Spezialfutter (Schoko-Aroma, Vehikel)

Die Tiere wurden in einem Alter von 16 - 18 Wochen für die Versuche verwendet, dazu wurden sie analog der Abb. 9 vorab behandelt bzw. direkt für die Versuche verwendet. Die Tiere der Gruppe I wurden ohne Vorbehandlung direkt der Operation (OP) unterzogen, das heißt es wurde eine myokardiale Ischämie induziert bzw. eine Schein-OP (Kontrolle) durchgeführt.

Die Tiere der Gruppe II und III erhielten zur Blockade des IL-6 einen neutralisierenden anti-IL-6 Antikörper oder aber das Vehikel (PBS) 16 h vor Induktion des Infarktes bzw. der Schein-OP mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion.

Gruppe IV und V erhielten bereits sieben Tage vor der OP ein Spezialfutter, das entweder 4-MU und zur Geschmacksmaskierung Schokoaroma enthielt oder aber zur Kontrolle nur Schokoaroma. Dieses Futter erhielten die jeweiligen Gruppen bis Versuchsende.



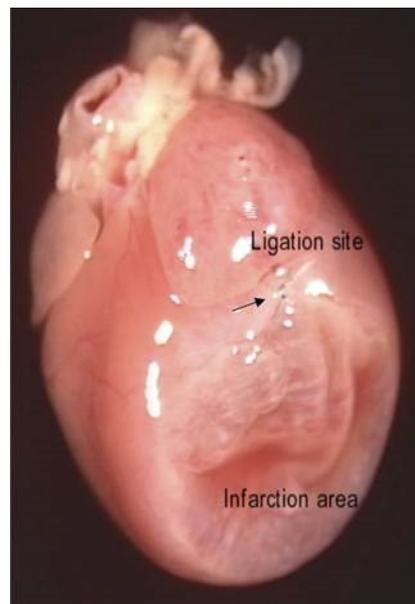
**Abbildung 9. Behandlungsschemata der unterschiedlichen AMI-Gruppen.**

### 2.1.3 Versuchsdurchführung Myokardinfarkt

Die Tiere wurden mittels i.p. Injektion von Ketamin (45 mg/kg Körpergewicht, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht, Bayer AG, Leverkusen) anästhesiert. Nach dem die Narkosetiefe mittels des Hinterbeinreflexes kontrolliert worden ist, wurden die Mäuse an ein Beatmungsgerät für Kleinnager (UNO Microventilator, Zevenaar, Niederlande) angeschlossen. Die Mäuse wurden mit einem Tidalvolumen von 200

µl mit einer Mischung aus 2/3 Luft und 1/3 Sauerstoff mit einem Isofluran-Gehalt (Forene®, Abbott GmbH, Deutschland) von 2% (V/V) beatmet.

In Rückenlage wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte positioniert, die Körpertemperatur wurde konstant bei 37°C gehalten und das Elektrokardiogramm (EKG) wurde überwacht. Linksseitig wurde zwischen der dritten und vierten Rippe der Thorax eröffnet, das Perikard wurde präpariert und ein 7-0 Nahtmaterial wurde vorsichtig unter dem linken vorderen absteigenden Koronararterieast durchgeführt (LAD) und in einer Position 1 mm von der Spitze des linken Vorhofs platziert. Der MI wurde durch Festziehen des Nahtmaterials induziert und anhand der Farbänderung (erblassen) der Herzspitze visuell und mittels EKG (ST-Hebung) auch elektrokardiologisch überprüft. Der Thorax wurde mittels vier Stichen unter Verwendung eines 6-0 Fadens wieder verschlossen (Abb. 10) und die inhalative Gabe des Isoflurans wieder eingestellt. Nach Zurückerlangen der Spontanatmung wurden die Tiere extubiert und ihnen 100% Sauerstoff zum Atmen zur Verfügung gestellt (Liehn *et al.* [52]).



**Abbildung 10. Darstellung eines infarzierten Mäuse-Herzens.**  
Die Stelle der Ligatur sowie das infarzierte Areal sind gekennzeichnet [53].

Zur Analgesie wurde den Mäusen unmittelbar nach der OP Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg Körpergewicht, Temgesic, Reckitt Benckiser, Berkshire, Großbritannien) verabreicht, ebenfalls am Abend danach und an den beiden darauf folgenden Tagen, morgens und abends.

### **2.1.4 Linksventrikuläre Funktionsanalyse mittels Echokardiographie**

Die Mäuse wurden zur Analyse der Herzfunktion basal vor der OP und ebenfalls zum Zeitpunkt 72 h nach der OP echokardiographisch analysiert. Unter Verwendung eines Visual Sonic Vevo 2100 hochauflösenden Bildgebungssystems und dem dazugehörigen, speziell für kardiovaskuläre Untersuchungen an der Maus ausgelegten, Schallkopf MS400 (18-38 MHz; beides von Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada) wurde die Analyse der Mäuse durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in eine Narkosekammer verbracht und mit 2% (V/V) Isofluran in Sauerstoff beatmet. Nach Erreichen einer genügenden Narkosetiefe wurden die Tiere an eine Atemmaske für Kleinnager überführt und die Narkose aufrechterhalten. Die Tiere wurden dazu auf einem Elektroden-Kontakt-Block fixiert, mit dem eine Überwachung des Tieres über den vollständigen Versuchszeitraum von max. 30 min möglich war, zusätzlich war der Block beheizbar, so dass die Temperatur konstant auf 37°C gehalten werden konnte. Es wurden kontinuierlich die Herzfrequenz (HF), die Atemfrequenz und ein Elektrokardiogramm (EKG) aufgezeichnet um die Vitalparameter zu überprüfen.

Um Einflüsse von Prä- und Postkonditionierung des Isoflurans auszuschließen wurde zwischen Echokardiographie und OP stets ein Abstand von mindestens 24 h eingehalten. Das Fell des Thorax der Maus wurde vor der Analyse mittels Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser, Berkshire, Großbritannien) entfernt und zur Verbesserung der Bildgebung wurde vorgewärmtes Aquasonic 100 Gel (Parker Laboratories, Fairfield, NJ, USA) als Ultraschallkontaktgel auf den Brustkorb der Maus aufgetragen. Bei der Untersuchung wurde parasternal die Lange- und die Kurze-Achse des linken Ventrikels analysiert. Aus den verschiedenen Aufnahmen konnten mehrere Parameter wie das linksventrikuläre endsystolische (ESV) und das enddiastolische Volumen (EDV), die Ejektionsfraktion (EF), das Schlagvolumen (SV) sowie das Herzzeitvolumen (HZV) abgeleitet werden.

Die Induktion des Myokardinfarkts sowie die Echokardiographie-Analyse wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Simone Gorreßen, Institut für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt.

### **2.1.5 Probenentnahme und Aufbereitung**

Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> Inhalation getötet und die Proben für die unterschiedlichen Analysemethoden aufgearbeitet.

Die Tiere wurden vor der Thoraxeröffnung mit Isopropanol 70% desinfiziert, mit sterilem, RNase freiem Besteck geöffnet und das Herz freigelegt, Blut wurde direkt aus dem rechten Vorhof entnommen und zur Antikoagulation mit 0,9% NaCl (B. Braun AG, Melsungen) und

0,1 M EDTA (Merck KGaA, Darmstadt) versetzt, zur Entfernung von Blutresten wurde das Herz mit sterilem PBS gespült und anschließend entnommen. Es wurde von der Herzspitze ausgehend in 2 mm dicke Scheiben geschnitten von denen die Spitze entweder zur Proteinanalyse eingefroren wurde oder direkt zur Durchflusszytometrie-Analyse weiter bearbeitet wurde. Die nachfolgende Scheibe wurde entweder für Gefriergewebeschnitte oder Paraffingewebeschnitte eingebettet und der nachfolgende Ring wurde zur Analyse der RNA in linken, infarzierten Ventrikel, rechten Ventrikel und Septum unterteilt und einzeln weiter bearbeitet (weitere Aufbereitung siehe RNA Isolation).

Aus dem Vollblut wurde mittels Zentrifugation für 15 min bei 3.000 rpm, 4°C und erneuter Zentrifugation des Überstands für 5 min bei 13.000 rpm bei 4°C, Plasma gewonnen, welches anschließend für verschiedene Testverfahren verwendet wurde.

## 2.1.6 Histologie

Die entnommenen Herzscheiben wurden nativ in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Alphen aan de Rijn, Niederlande) mit Hilfe von flüssigem Isopentan bei -40°C eingebettet und anschließend im Kryostaten (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) bei -20°C 12 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Alternativ wurden die Scheiben in Roti®-Histofix 4% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar) geschnitten, so dass 5 µm dicke Gewebeschnitte erhalten wurden.

### 2.1.6.1 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Histologie

**Tabelle 1. Lösungen und Pufferzusammensetzungen Histologie**

<b>PBS</b>	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
<b>Blockierlösung (Histologie)</b>	2% BSA 10% FCS in 1-fach PBS
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blockierlösung</b>	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1-fach PBS
<b>Trispuffer (TB)</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,6

### **2.1.7.1 Histochemische Färbungen**

Um die Kryoschnitte auf den Objektträgern zu fixieren wurden diese für 20 min in absolutem Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschprozess mit PBS (Tab. 1) für jeweils 5 min.

Die Paraffinschnitte wurden hingegen für 1 h bei 60°C hitzefixiert und anschließend entparaffiniert, in dem sie dreimal für jeweils 15 min mit Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe), und für jeweils 2 min mit absolutem Ethanol, 95% Ethanol und zuletzt mit 75% Ethanol behandelt wurden. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen in PBS für 5 min.

Fortfahrend wurden die Schnitte nun gleich behandelt.

#### **2.1.7.1.1 Hyaluronsäure**

Die Färbung der HA auf den fixierten Kryo- bzw. Paraffin-Schnitten erforderte zunächst eine Blockierung von endogenen Biotin-Strukturen mittels eines Avidin-Biotin-Blockiersystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers und anschließender Behandlung der Schnitte mit Blockierlösung (siehe Tab. 1) für 1 h bei Raumtemperatur. Darauffolgend wurde das biotinylierte Hyaluronsäure Bindeprotein (HAbP) (Konzentrationen und Hersteller siehe Tabelle) in entsprechender Verdünnung in 1% BSA in PBS-Lösung auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block (3%) zur Inaktivierung von Peroxidasen durchgeführt und erneut gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, die nach einstündiger Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen mit PBS mit Hilfe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Reagenz, Zytomed, Berlin) detektiert wurde. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) und die Schnitte wurden wasserfrei mit Roti®-Mount (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) Eindeckmedium fixiert. Für die Fluoreszenz-Färbung wurde ebenfalls HAbP in 1% BSA in PBS-Lösung verwendet, detektiert mit Streptavidin/Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und die Zellkerne wurden mit Hilfe von Roti®-Mount FluorCare DAPI Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) fluoreszent angefärbt.

### **2.1.7.1.2 Makrophagen**

Die Färbung der Makrophagen wurde analog zu der im Abschnitt 2.1.7.1.1 beschriebenen Färbung durchgeführt. Der Avidin-Biotin-Block entfällt hierbei, als Primärantikörper wurde anti-MAC2 verwendet und es wurde ein anti-Kaninchen-HRP-konjugiertes IgG als Sekundärantikörper verwendet (siehe Tab. 2).

### **2.1.7.1.3 HA-MAC2 Doppelfärbung**

Zur histologischen Fluoreszenz-Doppelfärbung von HA und Makrophagen wurde mit der Färbung der HA wie oben beschrieben begonnen. Nach Inkubation mit dem HAbP wurde eine weitere Inkubation mit dem anti-MAC2 Antikörper in feuchter Kammer für 1 h bei Raumtemperatur angeschlossen. Zur Detektion der beiden Antikörper wurden die entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper Streptavidin/FITC und anti-Kaninchen-Rhodamin IgG in PBS für eine weitere Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurden die Schnitte mit Roti®-Mount FluorCare DAPI Medium eingedeckt.

### **2.1.7.1.4 Neutrophile Granulozyten**

Zur Visualisierung und Quantifizierung der Neutrophilen im infarzierten Herzgewebe wurden die Paraffin-Schnitte gemäß den Angaben des Herstellers mit einem Naphthol AS-D Chloroacetat-Esterase Kit spezifisch angefärbt (Tab. 2). Man machte sich hierbei die endogene Enzymaktivität der in den Neutrophilen lokalisierten Esterase zu nutze. Diese führte nach Zugabe eines löslichen Substrates zur Umsetzung dieses in einen unlöslichen Farbstoff, der die Zellen purpurrot färbte. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte ebenfalls mit Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte dauerhaft mit Roti®-Mount Medium eingedeckt.

### 2.1.7.1.5 Verwendete Antikörper für die histochemischen Färbungen

**Tabelle 2. Antikörper histochemische Färbungen**

Antikörper / Kit	Hersteller	Konzentration
Biotinyliertes Hyaluronsäure-Bindeprotein (HAbP)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	1:250
Anti-MAC2	Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada	1:200
Naphthol AS-D Chloroacetate, spezifische Esterase Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	
Streptavidin, HRP-konjugiert	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	1:200
Streptavidin/FITC	Dako, Glostrup, Dänemark	1:200
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	1:200
Rhodamine Red <sup>TM</sup> -X	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA	1:200

### 2.1.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Herzspitze wurde 72 h nach Infarkt zur Bestimmung der Menge an Makrophagen und Neutrophilen herangezogen. Der Apex wurde für 30 min bei 37°C in einer Kollagenase-Lösung mit 600 U/ml Kollagenase II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) und 60 U/ml DNase I (Roche Applied Science, Basel, Schweiz) gelöst in gepufferter Salzlösung nach Hank (HbSS) verdaut. Das Herzgewebe wurde dann vorsichtig dissoziiert und durch ein 100 µm Zellsieb gegeben. Kardiomyozyten wurden mittels Zentrifugation bei 60 x g für 10 min und 4°C, anschließender Filtration durch ein 40 µm Zellsieb (beide von Greiner, Frickenhausen) und erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 10 min und 4°C abgetrennt. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 GlutaMAX<sup>TM</sup> Medium (Gibco® Life Technologies<sup>TM</sup>, Paisley, Großbritannien) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 10 min wurde das Zellpellet welches nun die nicht-Myozyten-Fraktion enthielt in ISOTON® II Lösung (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) aufgenommen und mit LIVE/DEAD® *Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>TM</sup> Corporation, Carlsbad, CA, USA) und den folgenden Antikörpern gefärbt: anti-CD45-PE, 30-F11, anti-CD11b-Pazifik Blau, M1/70, anti-F4/80-Alexa Fluor 488, BM8, Anti-Ly6G-Pazifik Blau, 1A8, (alle von BioLegend, San Diego, CA, USA) und CD11b-PE, M1/70 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Die FACS Messung wurde mit einem GALLOS<sup>TM</sup> Durchflusszytometer durchgeführt und analysiert mit Hilfe der Kaluza Analyse-Software (beides von Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Nach Ausschluss von toten Zellen und Zelltrümmern konnten die Makrophagen in der CD45<sup>+</sup>-

Leukozytenfraktion durch die Expression von CD11b und F4/80 identifiziert werden und die Neutrophilen durch die Expression von CD11b und Ly6G bestimmt werden. Die Menge an Makrophagen und Neutrophilen wurde als Zellen pro mg Herzgewebe angegeben.

Die Durchflusszytometrie wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Grandoch und Frau Kathrin Feldmann, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt.

### **2.1.9 IL-6 und IL-6-Rezeptor ELISA**

Der murine IL-6 Rezeptor (IL-6R) sowie das murine IL-6 Protein wurden im Maus-Plasma mit Hilfe zweier ELISA (IL-6R, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!* Kit, eBioscience, San Diego, USA) jeweils nach Herstellerinstruktionen bestimmt. Die Plasmaproben wurden je nach Konzentration unverdünnt oder 1:5 mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) verdünnt gemessen. Bei 450 nm wurde die Extinktion mit Hilfe eines ELISA-*Plate Reader* (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen und analog einer Standardreihe die Konzentration errechnet.

## 2.2 Zellversuche

### 2.2.1 Substanzen und Lösungen

#### 2.2.1.1 Verwendete Substanzen in der Zellkultur

Tabelle 3. Verwendete Substanzen in der Zellkultur

Substanz	Hersteller
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose</b>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
<b>Fetales Kälberserum (FCS)</b>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
<b>PenStrep</b>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
<b>Medium 199</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>Pferdeserum</b>	BioConcept, Allschwil, Schweiz
<b>Trypsin EDTA</b>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), steril</b>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
<b>IL-6, human rekombinant</b>	biomol, Hamburg
<b>IL-6 <math>\alpha</math>, human rekombinant</b>	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
<b>hyper-IL-6</b>	wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Stefan Rose-John zur Verfügung gestellt, Christian-Albrechts-Universität Kiel
<b>bFGF, human rekombinant</b>	BPS Bioscience, San Diego, CA, USA
<b>AG490</b>	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
<b>LY294002</b>	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
<b>PD98059</b>	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
<b>4-Methylumbelliferon Natriumsalz</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>PurCol® (Kollagen Typ I)</b>	Advanced BioMatrix, San Diego, CA, USA

### 2.2.1.2 Lösungen und Pufferzusammensetzungen in der Zellkultur

**Tabelle 4. Lösungen und Pufferzusammensetzungen Zellkultur und Protein-Biochemie**

<b>Ausplantiermedium (100 ml)</b>	34,0 ml DMEM (1% PenStrep) 52,5 ml FSC 5,0 ml Pferdeserum 8,5 ml Medium 199 8 ng/ml bFGF
<b>Wachstumsmedium (100 ml)</b>	80,0 ml DMEM 20,0 ml FCS 8 ng/ml bFGF
<b>PBS</b>	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
<b>TBS</b>	20 mM Tris 137 mM NaCl
<b>TBS/T</b>	0,1% Tween® 20 (Polysorbat) in 1-fach TBS pH 7,4
<b>Zellyse-Puffer</b>	50 mM NaCl 120 mM Tris pH 6,8 10% Glycerin 2% Natriumdodecylsulfat (SDS)
<b>4-fach Auftragspuffer</b>	150 mM Tris 30% Glycerin 2% SDS 7% β-Mercaptoethanol (frisch dazu geben)
<b>Blockierlösung (Western Blot)</b>	3% BSA in 1-fach TBS/T
<b>Laufpuffer</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
<b>Transferpuffer</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
<b>Essigsäure Fixierlösung</b>	3,7% Formaldehyd 70% Ethanol 5% Essigsäure in 1-fach PBS
<b>Standard Fixierlösung</b>	3,7% Formaldehyd in 1-fach PBS

### 2.2.2 Isolation kardialer Fibroblasten und Kultur

Für die Isolation der kardialen Fibroblasten (KF) wurden männliche C57BL/6J Mäuse (Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich) oder aber CD44 *knock out* (CD44<sup>-/-</sup>) Mäuse auf C57BL/6J Hintergrund (zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Véronique Orian-Rousseau, KIT Karlsruhe) im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, mit 70% Isopropanol desinfiziert und der Thorax eröffnet um das Herz

ohne Vorhöfe zu entnehmen und in vorgewärmtes (37°C), steriles PBS zu überführen. Die Herzen wurden mehrfach mit sterilem PBS gewaschen und in eine Zellkulturschale überführt, in der sie mit Hilfe von sterilen Skalpellen in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stück geschnitten wurden. Die Herzstücke wurden erneut mit sterilem PBS gewaschen, bis alle Blutrückstände entfernt waren. Anschließend wurden die Stücke in mit Kollagen (PureCol®, *Bovine Collagen Solution, Type I*, San Diego, CA, USA) beschichtete 6-Loch Platten überführt, gleichmäßig verteilt und mit 750 µl Ausplantiermedium (Tab. 4) bedeckt (Passage 0 (p0)). Das Ausplantiermedium wurde nach 24 h durch Wachstumsmedium (Tab. 4) ersetzt und dieses jeden zweiten Tag erneuert. Nach einer Ausplantierphase von 2-3 Wochen wurden die ausgewachsenen Zellen mittels Trypsin EDTA von der Platte gelöst und in eine T75-Zellkulturflasche mit DMEM, 10% FCS (Tab. 3), überführt (p1), nach weiteren 5-7 Tagen wurden die Zellen erneut mit Trypsin EDTA abgelöst und entsprechend der verschiedenen Versuche ausgesät (p2). 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit DMEM, 2% FCS, synchronisiert.

Für die *in vitro* Experimente wurden die KF mit 50 ng/ml IL-6, 100 ng/ml sIL-6R, 10 ng/ml hyper-IL-6, 20 µM AG490, 20 µM PD98059, 20 µM LY294002 oder 300 µM 4-MU-Natriumsalz für die jeweils angegebenen Zeitpunkte behandelt (siehe Tab. 3).

### 2.2.3 Durchflusszytometrie – CD126 (IL-6R)

Zur Messung des membranständigen Interleukin-6 Rezeptor  $\alpha$  wurden die KF ohne vorhergehende Stimulation mittels Accutase (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) abgelöst und zweimal mit FACS Puffer (1% BSA in PBS) gewaschen. Die zum Vergleich verwendeten CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden als Einzelzellsuspension aus der gesamten Milz einer C57BL/6J Maus gewonnen, ebenfalls zweimal mit FACS Puffer gewaschen und für 15 min mit FCS blockiert.

Die Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R) Antikörper oder der entsprechenden PE-gekoppelten Isotypkontrolle (beide von BioLegend, San Diego, CA, USA) gefärbt. Die murinen Milzzellen wurden zusätzlich mit einem APC-gekoppelten anti-Maus CD4 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) angefärbt. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 0,5 ml FACS Puffer aufgenommen und mit einem Canto II FACS (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) sowie der FCS Express Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) analysiert.

### 2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die quantitative Proteinanalyse wurden Zellen für 10, 30, 60 und 120 min mit Stimulanzen behandelt und nach den entsprechenden Zeitpunkten in Zellyse-Puffer (siehe Tab. 4) mit Phosphatase-Inhibitoren (Natriumorthovanadat 2 mM,  $\beta$ -Glycerophosphat 40 mM, Natriumfluorid 10 mM) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Analyse wurden die Zellysate mit 4-fach Auftragspuffer (Tab. 4) versetzt, für 5 min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und zusammen mit einem Marker (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf ein 10% Polyacrylamid-SDS-Gel mit Sammelgel (5%) aufgetragen (siehe Tab. 5). Bis zum Erreichen des Trenngels wurden die Proben bei 100 V laufen gelassen, anschließend zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe bei 160 V (Laemmli 1970, [54]).

**Tabelle 5. Gelzusammensetzung SDS-PAGE**

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
1 M Tris pH 6,8		0,5625 ml
1,5 M Tris pH 8,7	1,875 ml	
dH <sub>2</sub> O	3,6 ml	3,2625 ml
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,075 ml	0,045 ml
40% Acrylamid	1,875 ml	0,5625 ml
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,075 ml	0,045 ml
Temed	0,005 ml	0,005 ml

### 2.2.5 Western Blot

Die Proteinbanden wurden aus dem Gel mittels elektrophoretischem Transfer (*Semidry-Blot-System*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) unter Verwendung eines Transferpuffers (Tab. 4) sowie Whatman® Chromatographie-Papiers (Whatman® 3mm Chr *Chromatography Paper*, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien) 1,5 h bei 1000 mA auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman® Protran® BA83 0,2  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien) übertragen, welche dann für 1 h mit 3% BSA in TBS/T (Tab. 4) bei Raumtemperatur blockiert wurde (Burnette, 1981, [55]). Der Erstantikörper wurde ebenfalls in einer 3% BSA in TBS/T Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Wiederholtes Waschen der Membran in TBS/T sollte überschüssigen Erstantikörper entfernen, so dass der an Protein gebundene Antikörper anschließend mit Hilfe eines IRDye®-markierten Sekundärantikörpers (Tab. 6) (1 h bei Raumtemperatur) detektiert werden konnte. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels des Licor Odyssey Infrarot Bildgebungs-System (Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE, USA) detektiert.

**Tabelle 6. Antikörper Western Blot Analyse**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
STAT3	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:2000
phospho-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:2000
AKT	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:500
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (ERK1/2)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
$\beta$ -Tubulin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:10000
IRDye 680 Ziege-anti-Kaninchen IgG	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA	1:5000
IRDye 800 CW Ziege-anti- Kaninchen IgG	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA	1:5000
IRDye 800CW Ziege-anti-Maus IgG	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA	1:5000
IRDye 680 Ziege-anti-Maus IgG	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA	1:5000
IRDye 800 Esel-anti-Ziege IgG	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA	1:5000

### 2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [56]. Auf einer 96-Loch Platte wurden pro Loch 200  $\mu$ l eines 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnten Bradford-Reagenz (Biorad, München) pipettiert. Als Standard wurde eine BSA-Eichreihe von 0  $\mu$ g bis 10  $\mu$ g BSA verwendet (Doppelbestimmung). Nach Zugabe der unverdünnten Zelllysate-Proben erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in einem ELISA-Plate Reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.2.7 HA-ELISA-ähnlicher Assay

Die HA Konzentration im Mediumsüberstand der Zellen sowie im Maus-Plasma wurde mit Hilfe eines *Hyaluronic Acid Test Kits* (Corgenix, Colorado, USA) nach Protokoll des Herstellers gemessen. Die Zellüberstandsproben wurden unverdünnt, die Plasmaproben, abhängig davon ob sie innerhalb des messbaren Bereichs lagen, unverdünnt oder 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt bestimmt. Die Extinktion wurde mittels ELISA-Plate Reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 450 nm

gemessen. Die HA Konzentration wurde mit Hilfe einer Eichreihe berechnet und auf die Gesamtproteinkonzentration des Zelllysats bezogen.

## **2.2.8 Zytochemische Färbungen**

Die Zellen wurden zur zytochemischen Analyse auf sterilen runden Deckgläsern (Ø 18 mm) in einer 12-Lochplatte wie beschrieben kultiviert.

### **2.2.8.1 Hyaluronsäure**

Für die Färbung der perizellulären HA der KF bedurfte es einer besonderen Fixierung der Zellen. Hierzu wurde eine essigsäure Fixierlösung (Tab. 4) für 20 min bei Raumtemperatur verwendet. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 3% BSA in PBS blockiert und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit HABP inkubiert, mehrfach mit PBS gewaschen und mit Streptavidin/FITC (Tab. 4) wiederum für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden erneut mit PBS gewaschen und zuletzt mit Hilfe von Roti®-Mount FluorCare DAPI Eindeckmedium mit der mit Zellen beschichteten Seite nach unten auf einem Glasobjektträger fixiert.

### **2.2.8.2 $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA)**

Die Fixierung der Zellen für die Färbung auf  $\alpha$ SMA erfolgte mit Standard-Fixierlösung (siehe Tab. 4) für 20 min bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Deckgläschen wurden diese mit einer 0,3% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) Lösung in PBS für 10 min permeabilisiert und wiederum mit PBS gewaschen. Das Blockieren erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in 3% BSA in PBS, anschließend wurden die Zellen für 1 h mit dem  $\alpha$ SMA-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der anti-Kaninchen Sekundärantikörper Alexa Fluor 647 (Tab. 4) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Das Eindecken erfolgte analog zu der HA-Färbung.

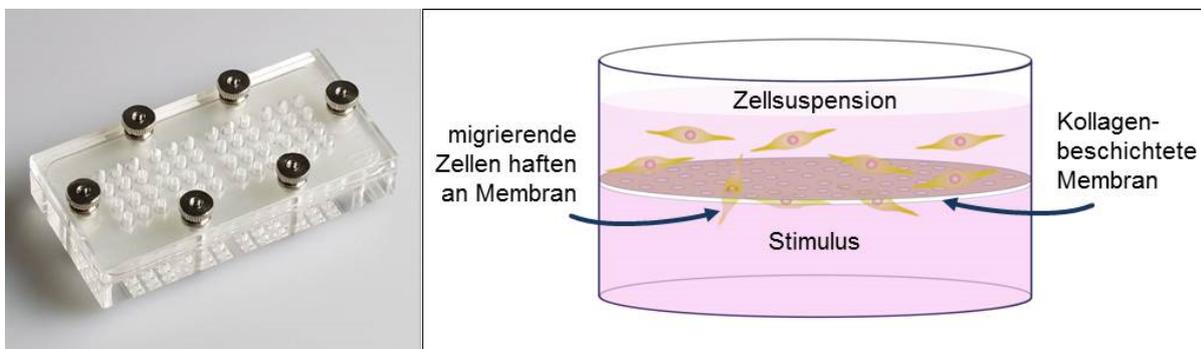
### 2.2.8.3 Verwendete Antikörper für die zytochemischen Färbungen

Tabelle 7. Antikörper zytochemische Färbung

Antikörper / Kit	Hersteller	Konzentration
Biotinyliertes Hyaluronsäure-Bindeprotein (HAbP)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	1:250
Streptavidin/FITC	Dako, Glostrup, Dänemark	1:1000
$\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA)	ab5649, abcam, Cambridge, Großbritannien	1:
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 647	Invitrogen™ Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	1:500

### 2.2.9 Migration

Zur Analyse der migratorischen Eigenschaften der Zellen wurde eine modifizierte Boydenkammer verwendet [57]. Eine 10  $\mu$ m Membran (*Polycarbonate Membranes 10  $\mu$ m pores 25x80 mm*, NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) wurde mit essigsaurer Kollagen-Lösung (*PureCol®, Bovine Collagen Solution, Type I*, SanDiego, CA, USA) beschichtet, die unteren Kammern der Boydenkammer (*48-well micro chemotaxis chamber*, NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) wurden mit Kontrollmedium  $\pm$  Stimulanz befüllt, so dass sich ein konvexer Meniskus bildete, auf den möglichst luftblasenfrei die beschichtete Membran gelegt wurde. Der obere Teil der Boydenkammer wurde aufgesetzt, fest verschraubt und mit je 20.000 trypsinierten Zellen in 45  $\mu$ l Kontrollmedium pro Loch bestückt (Abb. 12). Nach einer Migrationszeit von 6 h wurden die Membran entnommen, die obere Seite mittels eines Gummischabers von Zellen befreit, so dass nur die durch die Membran migrierten Zellen auf der Membranunterseite mit Methanol fixiert und anschließend mit Coomassie-Lösung angefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte mittels des Licor Odyssey Infrarot Bildgebungs-Systems (Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE, USA).



**Abbildung 11. Modifizierte Boyden-Kammer.**

Bild einer verwendeten Boyden-Kammer ([www.neuroprobe.com](http://www.neuroprobe.com)) sowie die schematische Darstellung der gerichteten Chemotaxis.

### 2.2.10 Proliferation

Zur Analyse der Proliferation wurde die Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin (Perkin Elmer, Bodgau-Jügesheim) in die neu-synthetisierte DNA gemessen [58]. In einer 24-Loch Platte wurden 5000 Zellen pro Loch ausgesät, 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Wachstumsmedium zur Synchronisierung gegen FCS-freies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt und 6 h vor Ende des Versuchs 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Fibroblasten zweimal mit kaltem PBS sowie zweimal mit kalter 0,1 M Perchlorsäure gewaschen und anschließend mit 0,1 M NaOH lysiert. Ein Teil des NaOH-Proteinlysats wurde zur Proteingehaltsbestimmung mittels Bradford-Analyse abgenommen, das restliche Lysat wurde nach Zugabe von Rotiszint® eco plus (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) Szintilationsmix im Szintilationscounter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) vermessen. Die *counts per minute* wurden anschließend auf die Gesamtproteinmenge bezogen und ausgewertet.

### 2.2.11 Multiplex Analyse

Die Analyse der sekretierten Zyto- und Chemokine erfolgte mit Hilfe einer Multiplex Analyse [59]. Die Zellen wurden nach vorheriger Synchronisierung für 24 h Serum-frei mit 10 ng/ml hyper-IL-6 stimuliert und der Überstand anschließend unverdünnt für die Analyse verwendet. Die Zytokin-Bestimmung erfolgte mit dem Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay unter Verwendung des Bio-Plex® 200 Systems (beides von BioRad, Hercules, CA, USA) nach Angaben des Herstellers und wurde anschließend auf die Gesamtproteinmenge der Zellen bezogen.

## 2.3 mRNA Expressionsanalyse

### 2.3.1 RNA Isolation und Messung der mRNA-Konzentration

Für die Analyse der RNA aus Zellen wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten das Medium abgesaugt und nach Zugabe von 1 ml TriFast-Reagenz (peqGOLD TriFast™, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) die Zellen für 15 min bei RT lysiert.

Die Analyse der nativen Herzstücke erfolgte nach Zerkleinerung der Proben in flüssigem Stickstoff mit Hilfe einer MM400 Schwingmühle (RETSCH GmbH, Haan) und anschließender Inkubation der Proben in 1 ml TriFast-Reagenz bei 37°C für 30 Minuten.

Die in TriFast Reagenz aufgenommenen Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dies beinhaltete ein Ausschütteln der wässrigen Phase mit Chloroform, eine anschließende Fällung der RNA aus der wässrigen Phase mit Hilfe von Isopropanol sowie einen Waschschrift des RNA-Pellets mit 70% Ethanol. Das RNA-Pellet wurde in 20 µl RNase freiem Wasser (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) aufgenommen und die RNA-Konzentration mit einem NanoDrop-1000 Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 260 nm gemessen.

### **2.3.2 cDNA reverse Transkription und Real Time quantitative RT-PCR (qPCR)**

Von der Gesamt-RNA wurde 1 µg unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll in kodierende DANN (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde mittels qPCR mit einem ABI 7300 Real-Time PCR System unter Verwendung des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kits (alles von Applied Biosystems® Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA) analysiert. Jeder Reaktionsansatz bestand aus 10 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, 5 µl cDNA und 5 µl Primer-Mischung bestehend aus 1:1 Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pM Endkonzentration).

### **2.3.3 Übersicht über die verwendeten Primer**

Die entsprechenden PCR-Primersequenzen (Tab. 8) wurden mit der Primer3Plus Software entworfen (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) und über Invitrogen™ (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA) bezogen. Als endogene Kontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) gewählt. Eine Analyse der Schmelzkurven wurde nach PCR-Ende durchgeführt, um die verwendeten Primer auf Spezifität zu prüfen und die PCR-Bedingungen zu kontrollieren. Die Genexpression wurde bezogen auf die endogene Kontrolle Gapdh anhand der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode berechnet.

Tabelle 8. Verwendete Primer für die RT qPCR

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
<i>Gapdh</i>	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCCG
<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
<i>Has2</i>	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC
<i>Csf2</i>	ATGCCTGTCACGTTGAATGA	CCGTAGACCCTGCTCGAATA
<i>Csf3</i>	GCCCAGATCACCCAGAATCC	GCCTCTCGTCCTGACCATAG
<i>Ccl5</i>	GTGCCACGTC AAGGAGTAT	CCCACCTTCTTCTCTGGGTTG
<i>Ccl2 (Mcp1)</i>	TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG
<i>Cxcl1</i>	GCACCCAAACCGAAGTCATA	AGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Tnf (Tnfa)</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG
<i>Acta2</i>	CAGGCATGGATGGCATCAATCAC	ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTCCG
<i>Cd44</i>	AGGATGACTCCTTCTTTATCCG	CTTGAGTGTCCAGCTAATTCCG
<i>Hyal1</i>	AAGTACCAAGGAATCATGCC	CTCAGGATAACTTGGATGGC
<i>Hyal2</i>	GGTGGACCTTATCTCTACCAT	TATTGGCAGGTCTCCATACTT
<i>Il6</i>	GATGGATGCTACCAAACCTGGA	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
<i>Il6ra</i>	GGCACTCCTTGGATAGCAGA	CTCGTGGTTGGCAGAGTCTT

## 2.4 Auswertung

### 2.4.1 Färbungen

Bilder der (immun)-histochemischen und (immun)-zytochemischen Färbungen wurde mit einem Axiolmager.M2 Mikroskop mit AxioCam und der AxioVS40V 4.8.2.0 Software (alles von Zeiss, Jena) in den angegebenen Vergrößerungen aufgenommen. Mit Ausnahme der HA-MAC2 Doppelfärbung welche unter Verwendung eines AxioObserver.Z1 ApoTome Mikroskops (Zeiss, Jena) in den angegebenen Vergrößerungen aufgenommen wurde. Zur Quantifizierung der Aufnahmen wurden diese als *Tif*-Dateien exportiert und mit Hilfe der ImageJ 1.45s Software (*National Institutes of health*, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) analysiert. Zur Auftrennung der einzelnen Farbkanäle der Bilder wurde das Zusatzprogramm *Colour deconvolution* (<http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>) verwendet. Über das Ermitteln eines Schwellenwertes (*threshold*) wurde, unter Berücksichtigung von mindestens drei Bildern pro Färbung, objektiv festgelegt, welcher Teil des Signals einer Färbung als spezifisch angesehen wurden und welcher als Hintergrundsignal aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Der so ermittelte

Schwellenwert wurde dann auf alle Bilder einer Färbe-Serie angewendet. Zur Quantifizierung der HA und der Makrophagen wurde der gesamte infarzierte Bereich sowie die Randregion des Infarktes manuell umfahren und der prozentuale Anteil des gefärbten Areals ermittelt (*Area fraction*). Für die Neutrophilen-Auswertung wurden drei Bilder in der Randregion und im infarzierten Bereich pro Schnitt in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, pro Bild wurden fünf Blickfelder analysiert, in dem die purpurroten positiv-gefärbten Zellen mit Hilfe von ImageJ gezählt wurden. Als Ergebnisse wurde dementsprechend entweder ein prozentualer Wert der positiv gefärbten Fläche angegeben (*Area fraction*) oder die Anzahl positiv gefärbter Zellen bezogen auf einen definierten Bildausschnitt bzw. normalisiert auf 100 Zellen dargestellt.

### **2.4.2 Statistik**

Zur statistischen Analyse aller Ergebnisse wurde das Statistik-Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla – San Diego, CA, USA) verwendet. Die Daten wurden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus  $n$  unabhängigen Experimenten. Wurden zwei Datensätze miteinander verglichen, wurden diese unter Zuhilfenahme des ungepaarten Student's- $t$ -Test analysiert. Bei mehr als zwei mit einander zu vergleichenden Versuchsgruppen wurden die Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) mit anschließendem Bonferroni-Test analysiert. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

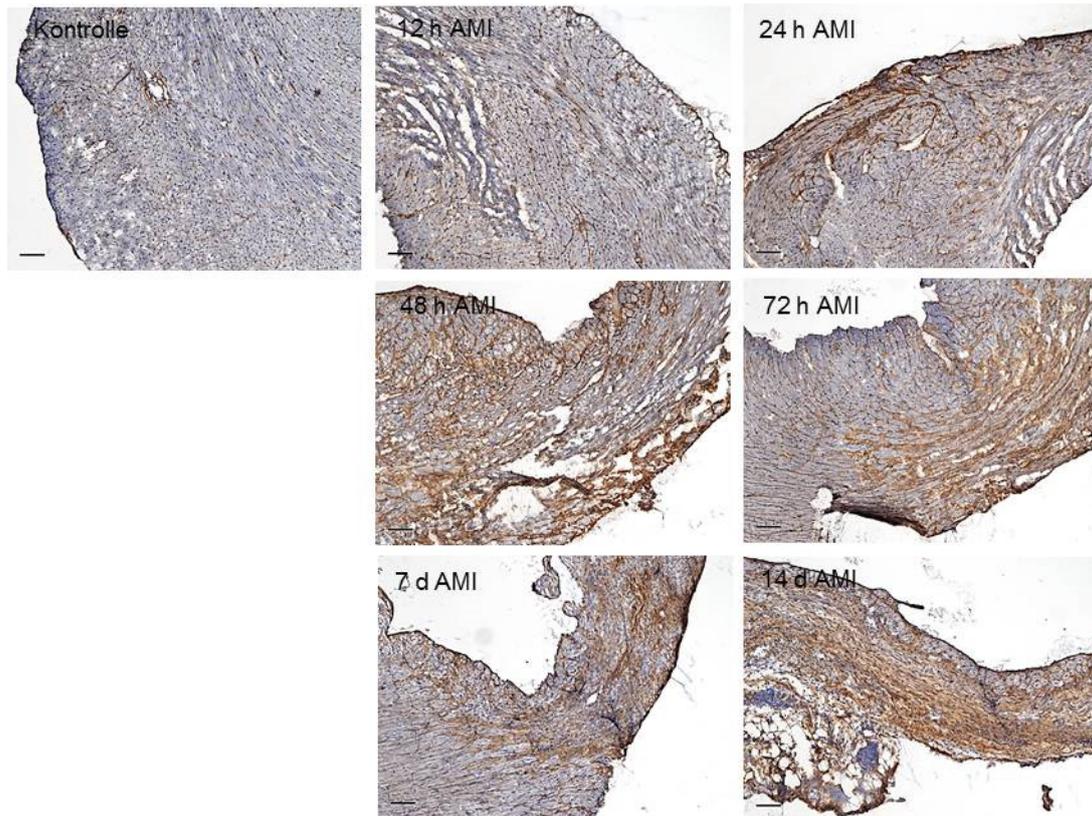
## **3 Ergebnisse**

### ***3.1 Permanente Okklusion der linken Koronararterie im Zeitverlauf bei C57BL/6J Mäusen***

Zur Analyse der HA Expression und damit verbundener Prozesse im Herzen nach Infarkt wurden nach permanenter Okklusion der linken Koronararterie die Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten (zwischen 12 h und 14 d) nach kardialer Ischämie analysiert, Blut entnommen und die Herzen histologisch sowie molekularbiologisch aufgearbeitet.

#### **3.1.1 HA Expression im Herzgewebe**

Die Visualisierung der im Herzen nach AMI gebildeten HA erfolgte mittels einer histologischen Färbung mit HAbP (Abb. 12). Hierbei zeigte sich, dass 12 h nach Infarkt noch wenig HA gebildet wurde, aber bereits ab 24 h nach Infarkt vor allem im Randbereich des Infarkts und im infarzierten Gewebe HA zu detektieren war. Nach 48 und 72 h schien die Synthese der HA weiter erhöht und auch Herzgewebe über den infarzierten Bereich hinaus exprimierte vermehrt HA. In der späteren Phase nach Infarkt, vor allem an Tag 14, begrenzte sich die starke Ausbildung der HA auf das Narbengewebe.

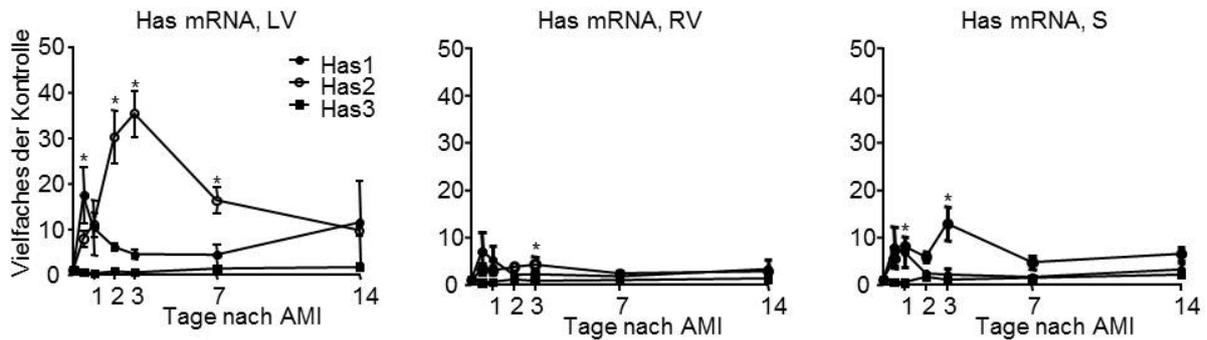


**Abbildung 12. Hyaluronsäureakkumulation im linken Ventrikel nach Myokardinfarkt.**

Aufnahmen 12, 24, 48, 72 h, 7 und 14 d nach Ischämie im Vergleich zu einem schein-operierten Tier (Kontrolle). Repräsentative Bilder von n=3-5 Herzen sind gezeigt, 100-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.1.2 Genexpression der Has

Analog zu der Färbung in Abbildung 12 wurde die Expression der mRNA der Has1, -2 und -3 im Zeitverlauf im linken und rechten Ventrikel sowie im Septum gemessen (Abb. 13). Die Expression der Has1 erreichte ein signifikantes Maximum bereits innerhalb der ersten 12 h nach Infarkt, gefolgt von einem massiven Anstieg der Has2 an Tag zwei, drei und sieben, welcher im Maximum eine mehr als 30-fache Expression der Has2 bezogen auf die Kontrolle erreichte. Das Expressionsniveau der Has3 war im Zeitverlauf nach Infarkt nicht verändert. Ähnliche Expressionsmuster der Has Isoenzyme zeigten sich in einem geringeren Ausmaß auch in den nicht infarzierten Herzarealen, dem rechten Ventrikel und dem Septum.



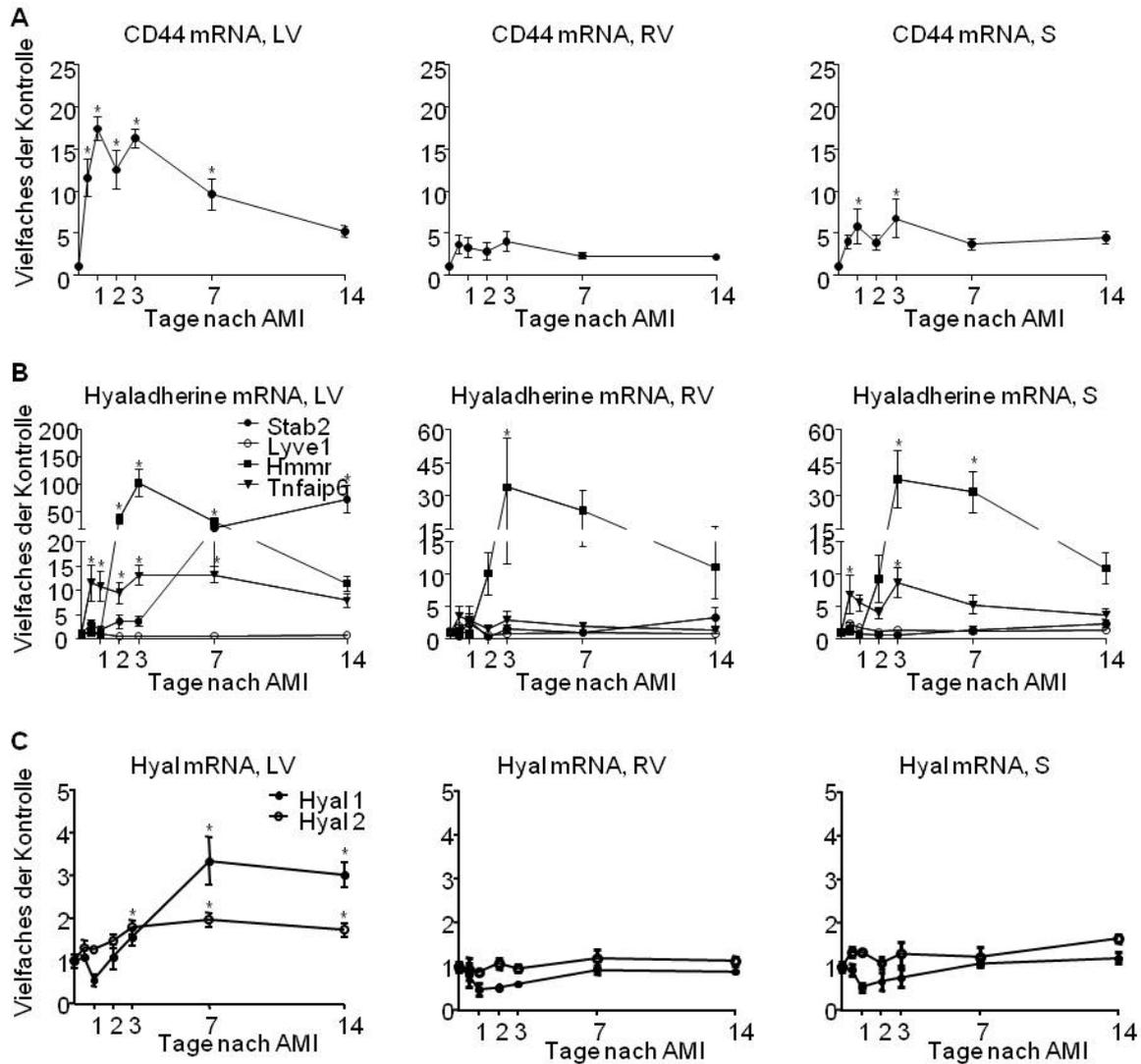
**Abbildung 13. Has mRNA Expression nach AMI im linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) und im Septum (S).**

Zeitverlauf von 12 h bis 14 d; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-5; \* p<0,05.

### 3.1.3 Genexpression der Hyaladherine sowie der Hyaluronidase1 und -2

Zur weiteren Charakterisierung der HA nach Infarkt wurden im Folgenden die Expressionen verschiedener HA-assoziiierter Gene, darunter die HA Rezeptoren und Bindeproteine (Hyaladherine) sowie die abbauenden Enzyme Hyal1 und -2, analysiert.

Der maßgeblich für die HA-medierte Signaltransduktion verantwortliche Rezeptor CD44 war nach AMI in der frühen inflammatorischen sowie in der proliferativen Phase signifikant induziert (12 h bis 7 d) (siehe Abb. 14 A). Das lässt darauf schließen, dass die HA im Herzen nach AMI neben der Gewebeintegrität vermittelnden Eigenschaft auch direkt an der Signalübertragung beteiligt ist. CD44 scheint für diese Vermittlung eine wichtige Rolle zu spielen. Ein weiterer Rezeptor für HA ist RHAMM, welcher vor allem die Motilität und Proliferation von Zellen beeinflusst. Dieser war ebenfalls im Verlauf nach AMI signifikant induziert, jedoch erst an Tag zwei, drei und sieben. Dieses Expressionsmuster war ähnlich zu dem der Has2, was einen möglichen Zusammenhang von RHAMM (Hmnr)-vermittelten Zellsignalen und der von der Has2 produzierten HA vermuten lässt. Des Weiteren waren die HA Bindeproteine TSG-6 (Tnfaip6) und HARE (Stab2) induziert (Abb. 14 B), was die wichtige Funktion der HA im Umbau der kardialen Matrix nach AMI zusätzlich unterstreicht. Die degradierenden Enzyme Hyal1 und -2 waren nur gering induziert, was vermuten lässt, dass der Abbau der HA im Herzen über diese Enzyme nach AMI nur eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 14 C).

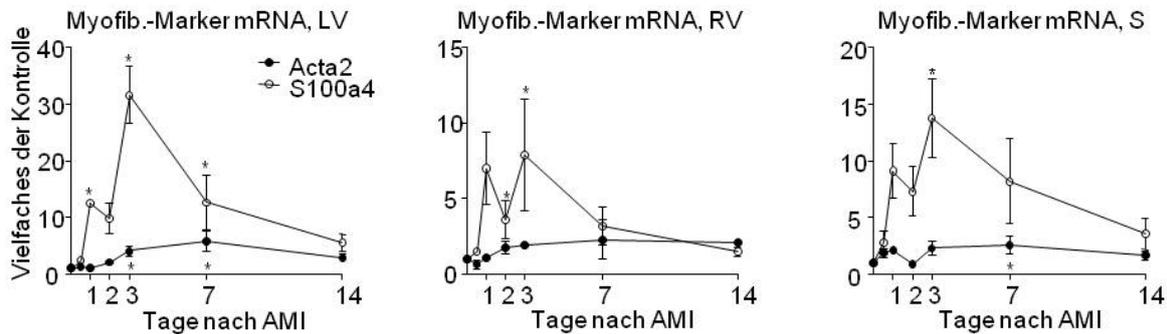


**Abbildung 14. mRNA Expression nach AMI im linken und rechten Ventrikel sowie im Septum.** Zeitverlauf von 12 h bis 14 d. **A**, HA-Rezeptor Cd44. **B**, HA-Bindeproteine HARE (Stab2), Lyve1, RHAMM (Hmnr) und TSG-6 (Tnfaip6). **C**, Hyal1 und -2; als Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-5; \* p<0,05.

### 3.1.4 Myofibroblasten Differenzierung

Als Maß für die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten wurden im Herzen zwei Gene untersucht, Fibroblasten-spezifisches Protein1 (FSP1, S100a4) sollte hierbei als Fibroblasten-Marker und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA, Acta2) als Myofibroblasten-Marker dienen. Acta2 zeigte einen erwarteten Verlauf mit einer signifikanten Induktion ab Tag drei nach Infarkt, wohingegen S100a4 zunächst nach 24 h bereits signifikant und im Verlauf nach drei und sieben Tagen induziert war (siehe Abb. 15). Im Folgenden wurde auf die Analyse des S100a4 verzichtet, da eine aktuelle Publikation von Kong *et al.* zeigt, dass FSP1 im Herzen nicht spezifisch für Fibroblasten/Myofibroblasten ist, sondern auch hämatopoetische

Zellen dieses Protein exprimieren [60]. Zur Charakterisierung des Myofibroblasten-Phänotyps wurde daher nur die Expression von Acta2 herangezogen.



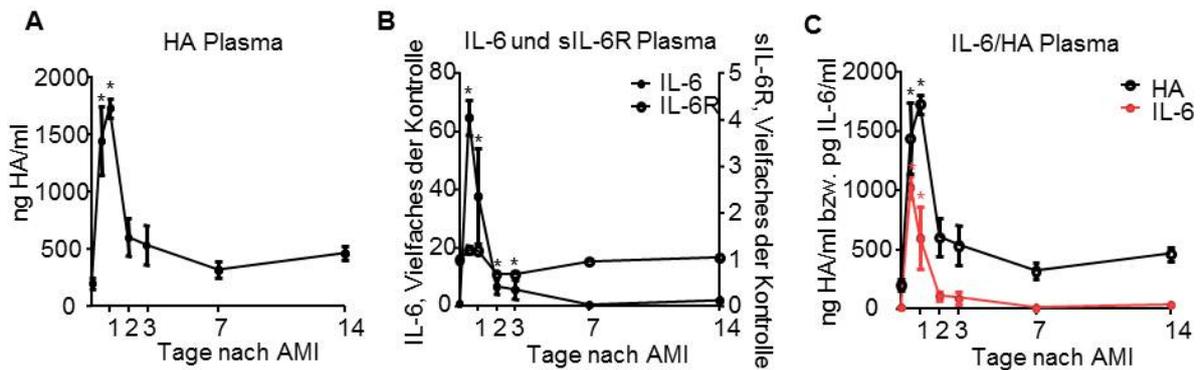
**Abbildung 15. Myofibroblasten-Marker.**

$\alpha$ SMA (Acta2) und FSP1 (S100a4) mRNA Expression im linken und rechten Ventrikel und im Septum. Dargestellt ist der Zeitverlauf von 12 h bis 14 d nach AMI; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-5; \* p<0,05.

### 3.1.5 Plasmakonzentrationen der HA, des IL-6 sowie des sIL-6R

Im Plasma der infarzierten Mäuse wurde die HA Konzentration mittels eines ELISA-ähnlichen Assay gemessen. Es zeigte sich eine mehr als 7-fach erhöhte signifikante Induktion der freien HA im Plasma nach 12 und 24 h die schnell wieder abnahm (Abb. 16 A). Ob diese HA aus der degradierten, geschädigten myokardialen Matrix stammte oder ob es sich hierbei eventuell um neu synthetisierte HA aus dem Herzen handelte, ist nicht bekannt. Interessanterweise zeigte sich in diesem Kontext ebenfalls eine sehr starke Induktion des inflammatorischen Zytokins IL-6. Bei Betrachtung der rasanten Plasmaanstiege des IL-6 und der HA (Abb. 16 C), war es auffällig, dass die Induktion des IL-6 dem Anstieg der HA voraus zu gehen schien und die Kurven parallel verschoben erschienen. Möglicherweise handelte es sich hierbei um einen Induktor der HA.

Neben IL-6 wurde auch der sIL-6R im Plasma mittels ELISA gemessen und es zeigte sich eine signifikante Reduktion des Plasmaspiegels an Tag zwei und drei nach AMI (Abb. 16 B) was in Verbindung mit der vorausgegangenen Induktion des IL-6-Spiegels auf einen Verbrauch des Rezeptors aus dem Plasma hindeutete.



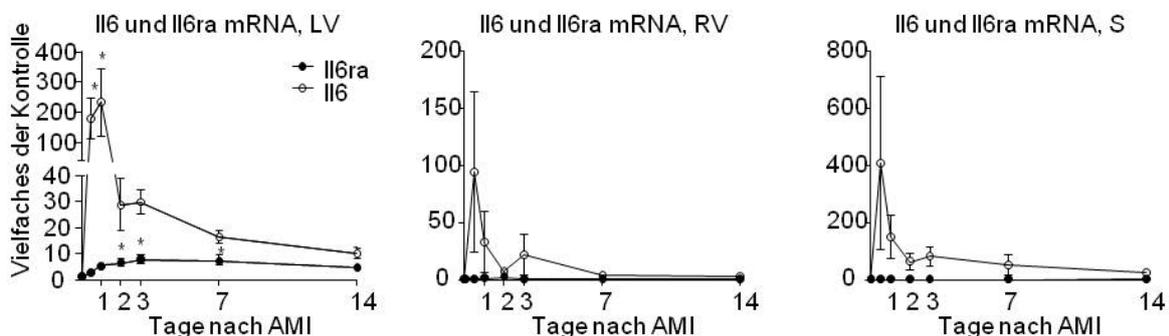
**Abbildung 16. Plasmakonzentrationen im Zeitverlauf nach AMI von 12 h bis 14 d.**

**A**, Gesamtkonzentration der HA im Plasma. **B**, IL-6 und sIL-6R Plasmaspiegel als Vielfaches der Kontrolle. **C**, Vergleich IL-6/HA Plasmaspiegelverlauf; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=3-5$ ; \*  $p<0,05$ .

### 3.1.6 Genexpression des IL-6 sowie des IL-6R und dem von Makrophagen exprimierten Oberflächenprotein MAC2

Zur weiteren Analyse des IL-6 wurde ebenfalls die mRNA Expression von IL-6 und dem membranständigen IL-6R analysiert (siehe Abb. 17). IL-6 zeigte eine ebenso ausgeprägte Induktion der mRNA wie bereits im Plasmaspiegel beobachtet werden konnte. Bereits nach 12 und 24 h zeigte sich eine signifikante Induktion, die im Verlauf wieder abnahm. Neben dem infarzierten Gewebe zeigten auch der rechte Ventrikel und das Septum eine deutliche Expression des IL-6. Dies lässt vermuten, dass der Plasmaanstieg des IL-6 durch eine vermehrte Synthese des Zytokins direkt im ischämischen Herzen hervorgerufen wurde.

Der membranständige IL-6R zeigte ebenfalls eine signifikante Induktion der mRNA an Tag zwei und drei nach Infarkt, was unter anderem mit dem Einwandern von Rezeptor-exprimierenden Immunzellen erklärt werden könnte.

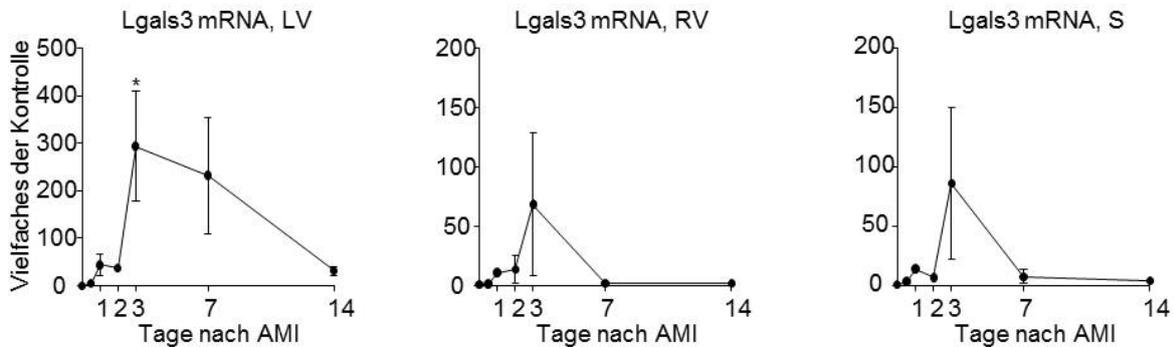


**Abbildung 17. IL-6 und IL-6R mRNA Expression im linken und rechten Ventrikel und Septum.**

Dargestellt ist der Zeitverlauf von 12 h bis 14 d nach AMI; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=3-5$ ; \*  $p<0,05$ .

Die Analyse der mRNA Expression des Makrophagen-Oberflächenproteins MAC2 (Lgals3) (Abb. 18) ergab einen starken Anstieg vor allem an Tag drei nach Infarkt. Dies ist

einhergehend mit den Literaturangaben, die diesen Zeitpunkt mit der höchsten Infiltrationsrate an mononukleären Zellen bzw. Makrophagen charakterisieren [61]. Im Folgenden wurden aufgrund dessen die Auswirkungen der HA auf das inflammatorische Geschehen 72 h nach AMI analysiert.



**Abbildung 18. Lgals3 (Mac2) mRNA Expression im linken und rechten Ventrikel und im Septum.**

Dargestellt ist der Zeitverlauf von 12 h bis 14 d nach AMI; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=3-5$ , \*  $p<0,05$ .

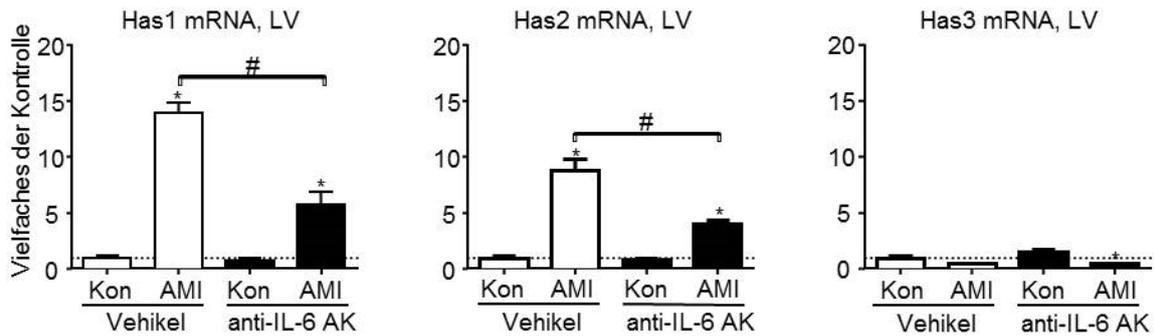
Nachfolgende Genexpressionsanalysen beschränken sich auf den linken Ventrikel, der als infarzierter Bereich die stärkste Genregulation aufwies.

### **3.2 Applikation eines anti-IL-6 Antikörpers 16 h vor AMI bei C57BL/6J Mäusen**

Um den direkten Zusammenhang zwischen IL-6 und der Induktion der Has1 und -2 mRNA sowie der HA im Plasma zu untersuchen wurde ein weiteres Versuchsmodell verwendet (siehe Abb. 9, Gruppe II bzw. III). 16 h vor AMI wurde den Mäusen durch intraperitoneale Injektion ein blockierender Antikörper gegen IL-6 verabreicht, um dadurch die IL-6 Signaltransduktion nach AMI zu hemmen. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit der Trägersubstanz (Vehikel, Kontrolle).

#### **3.2.1 Genexpression der Has mRNA 12 h nach AMI**

Um den frühen Anstieg der Has1 und -2 mRNA sowie den Plasmaanstieg der HA bestmöglich zu erfassen, wurden die Mäuse bereits zu dem frühen Zeitpunkt von 12 h nach Infarkt analysiert. Es zeigte sich in der Tat, dass in der mit Antikörper behandelten Gruppe II eine signifikante Reduktion der Has1 sowie der Has2 mRNA Expression 12 h nach AMI verglichen zu den Vehikel-behandelten AMI-Tieren (Gruppe III) beobachtet werden konnte (siehe Abb. 19).



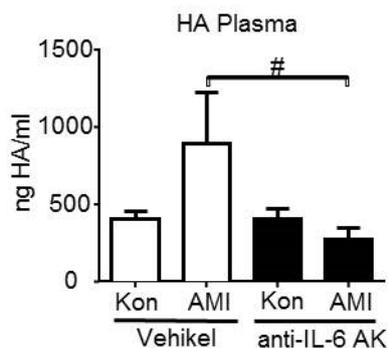
**Abbildung 19. Has1-3 mRNA Expression 12 h nach AMI.**

Tiere 16 h vor Kontroll-OP bzw. AMI-Induktion mit anti-IL-6 Antikörper oder entsprechendem Vehikel behandelt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5, \* gegen Kontrolle,  $p < 0,05$ ; # AMI Vehikel gegen AMI anti-IL-6 AK,  $p < 0,05$ .

### 3.2.2 Plasmakonzentration der HA 12 h nach AMI

Neben der verminderten Has mRNA Expression unter anti-IL-6 Antikörper Behandlung zeigte sich ebenfalls eine reduzierte HA-Konzentration im Plasma. Bei den anti-IL-6-behandelten Tieren lag nach AMI die im Plasma detektierte Konzentration der HA auf Höhe der Plasmaspiegel der Schein-operierten Kontrolltiere (Abb. 20).

Diese Ergebnisse ließen die Annahme zu, dass es sich bei der frühen Induktion der HA nach AMI um einen zumindest zum Teil IL-6-abhängigen Prozess/Mechanismus handelte.



**Abbildung 20. HA Konzentration im Plasma 12 h nach AMI.**

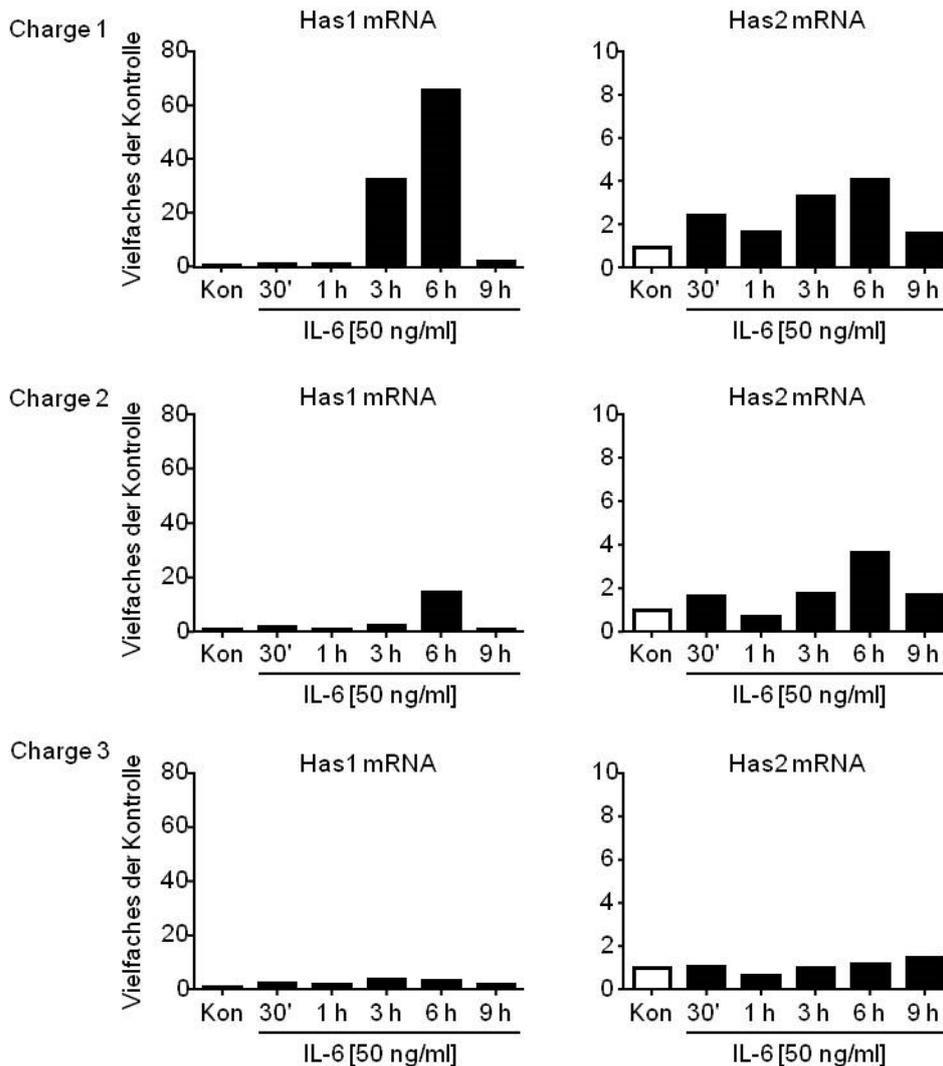
Tiere wurden 16 h vor Kontroll-OP bzw. AMI-Induktion mit einem anti-IL-6 Antikörper oder entsprechendem Vehikel behandelt und 12 h nach OP analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5, # AMI Vehikel gegen AMI anti-IL-6 AK,  $p < 0,05$ .

### **3.3 Induktion der HA Expression in murinen kardialen Fibroblasten**

Um die Grundlagen und Mechanismen der gewonnenen Erkenntnisse aus der *in vivo* Analyse der C57BL/6 Mäuse weiter zu untersuchen, wurden für die *in vitro* Analyse KF aus männlichen Mäusen desselben Stamms isoliert. Die Verwendung von Fibroblasten begründet sich in der Tatsache, dass diese eine der Hauptquellen für die Synthese von Matrixmolekülen darstellen [62]. Nach Stimulation wurde die Expression der Has, die sekretierte HA ins Medium und die zugrundeliegenden intrazellulären Signaltransduktionswege untersucht.

#### **3.3.1 Stimulation der Zellen mit IL-6 im Zeitverlauf**

Für einen ersten Stimulationsversuch wurden KF aus drei unabhängigen Isolationen über einen Zeitraum von 30 min bis 9 h mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Es zeigte sich in der Expression der Has1 und -2 ein sehr ungleichmäßiges Ergebnis (Abb. 21). Eine Zellpräparation (Charge) reagierte mit einer sehr starken Induktion der Has1 und auch der Has2, eine weitere reagierte nur mit einer schwachen Induktion und eine dritte Zellpräparation reagierte gar nicht auf die Stimulation mit IL-6. Die Analyse zweier weiterer Chargen brachte ebenfalls nur eine schwache bzw. gar keine Reaktion der Zellen (Daten nicht gezeigt).



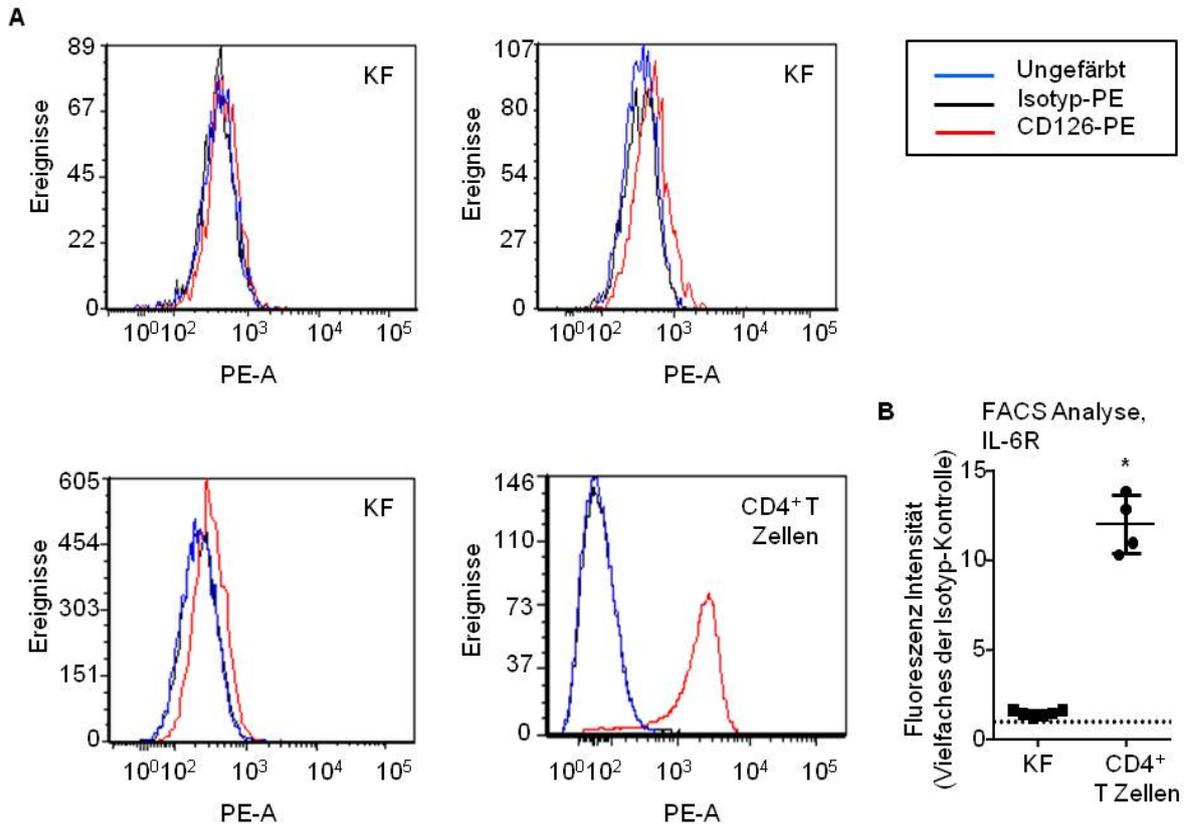
**Abbildung 21. Has1 und -2 mRNA Expression im Zeitverlauf nach IL-6 Stimulation.**

Zellchargen dreier unterschiedlicher Isolationen von KF aus C57BL/6J Mäusen sind nach entsprechender Stimulation mit IL-6 und sIL-6R gezeigt.

### 3.3.2 Expression des membranständigen IL-6R auf KF

Dieses ungleichmäßige Expressionsverhalten der Has1 und -2 in KF nach IL-6-Stimulation führte zu der Frage, ob diese Zellen eine ausreichende Menge an membranständigen IL-6R aufweisen. Es ist nicht vollständig beschrieben, ob KF diesen Rezeptor tatsächlich exprimieren können, in Vorversuchen konnte zumindest die mRNA dieses Proteins in KF detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um dies zu klären, wurden verschiedene Zellchargen mittels Durchflusszytometrie analysiert und als Positivkontrolle mit primären CD4<sup>+</sup>-Milzzellen verglichen (Abb. 22).

Die Milzzellen zeigten eine starke Färbung für den IL-6R (CD126) wohingegen die KF nur eine sehr geringe Menge des Rezeptors zeigten bzw. gar kein Rezeptor detektiert werden konnte.



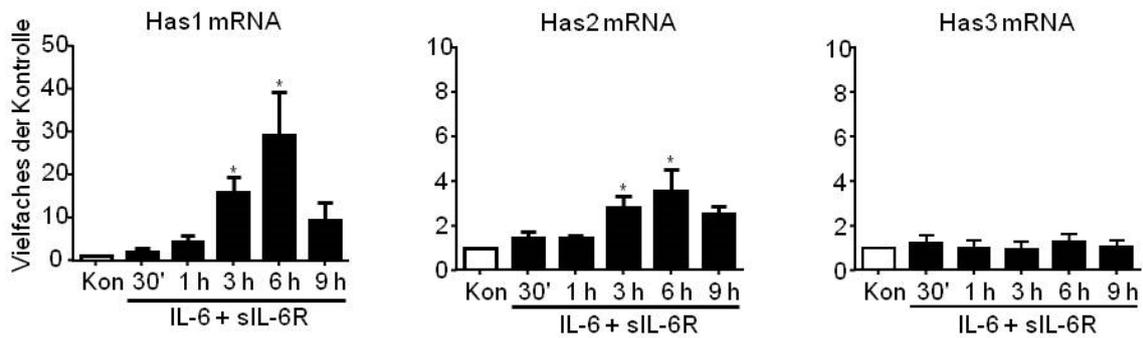
**Abbildung 22. IL-6R (CD126) Durchflusszytometrie-(FACS)-Analyse.**

**A**, repräsentative FACS-Diagramme der KF im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T Zellen sind gezeigt. **B**, Quantifizierung; Vielfaches der Isotyp-Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-6; \* p<0,05.

Als Konsequenz daraus wurden alle nachfolgenden Stimulationsexperimente mit IL-6 in Kombination mit dem löslichen Rezeptor (sIL-6R) durchgeführt, um somit das IL-6 *trans-signaling* zu imitieren.

### 3.3.3 Stimulation der Zellen mit IL-6 in Kombination mit dem löslichen IL-6R im Zeitverlauf

Die Stimulation der KF mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R ergab eine signifikante Induktion der Has1 und -2 mRNA Expression nach 3 und 6 h in unterschiedlichen Zellchargen (Abb. 23). Dies bestätigte die Sensitivität der Zellen für IL-6, jedoch auch gleichzeitig die verminderte bzw. fehlende Expression des membranständigen Rezeptors. Folglich ist der lösliche Rezeptor für das Ansprechen der KF auf IL-6 notwendig. Die Has3 mRNA Expression blieb von der Stimulation unbeeinflusst.

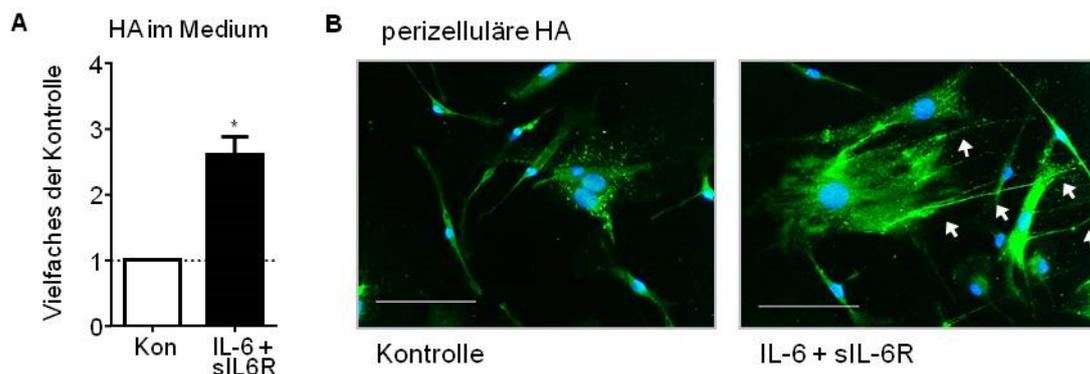


**Abbildung 23. Has1-3 mRNA Expression im Zeitverlauf nach IL-6 + sIL-6R Stimulation.** IL-6 *trans-signaling* Stimulation in KF; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5; \* p<0,05.

### 3.3.4 Sekretion der HA ins Medium und perizelluläre HA

Neben der vermehrten Expression der Has1 und -2 mRNA konnte auch eine erhöhte Sekretion der HA ins Medium nach 24 h Stimulation mit IL-6 und sIL-6R detektiert werden (Abb. 24 A). Diese wurde mit einem ELISA-ähnlichen Assay bestimmt und auf Gesamtproteinmenge der Zellen bezogen.

Fixierte man die Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit essigsaurer Formaldehyd-Lösung, so zeigte sich nach Anfärben der HA mit HAbP eine deutliche Ausbildung kabelähnlicher Strukturen an den KF (siehe Pfeile in Abb. 24 B).



**Abbildung 24. Synthetisierte HA nach Stimulation mit IL-6 + sIL-6R für 24 h.**

**A**, sezernierte HA ins Medium; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=6; \* p<0,05. **B**, perizelluläre kabelähnliche HA Strukturen. Pfeile weisen auf die Kabelstrukturen hin. Repräsentative Bilder von n=6 Experimenten sind gezeigt; 400-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse stärken die aus den *in vivo* Versuchen gewonnenen Erkenntnisse in denen gezeigt wurde, dass nach AMI IL-6 zu einer Induktion der Has1 und -2 mRNA sowie einem

starken Anstieg der HA-Plasmaspiegel führte. Vermutlich wurde zumindest ein Teil der freien HA im Plasma durch die induzierte HA Synthese in den KF produziert.

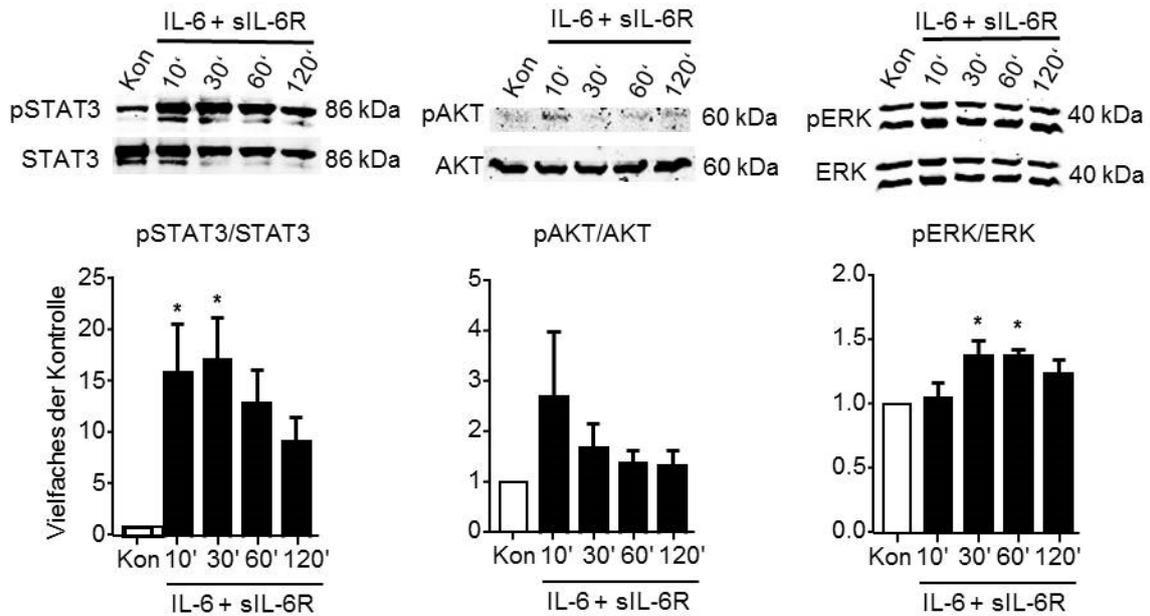
### **3.4 Signaltransduktionsweg der Induktion von Has1 und -2 über IL-6**

Wie bereits beschrieben vermag IL-6 seine intrazelluläre Signaltransduktion über verschiedene Wege zu vermitteln. Hierbei laufen die meisten Signalkaskaden über den dominanten JAK/STAT Weg und untergeordnet ebenfalls über die Aktivierung des PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B und des Ras/Raf/MEK/ERK-Weges ab [29], [40].

#### **3.4.1 Western Blot Analyse der unterschiedlichen Signalwege**

Zur Analyse des im Falle der IL-6-vermittelten Has Aktivierung beteiligten Signalweges wurden diese drei Mechanismen anhand ihrer phosphorylierten Signalproteine untersucht. Für den JAK/STAT-Weg wurde die Phosphorylierung des STAT3 nach Stimulation der KF mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R quantifiziert. Die phosphorylierte Form dieser Proteine ist meist nur eine begrenzte Zeit detektierbar und läuft relativ schnell ab, so dass für die Analyse ein Zeitverlauf von 10 min bis hin zu 120 min gewählt wurde.

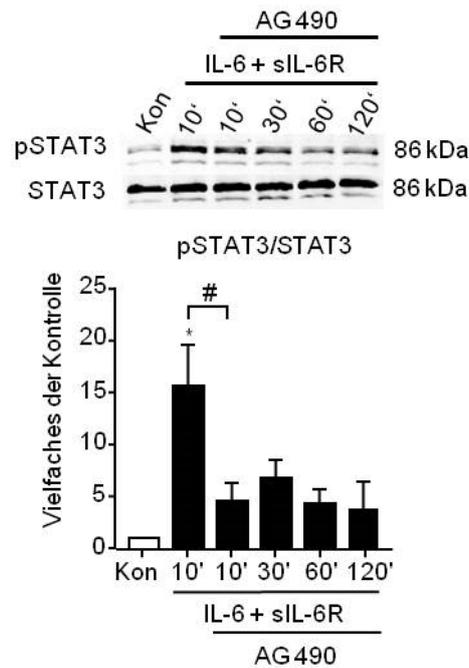
Wie in Abbildung 25 ersichtlich zeigte sich eine ausgeprägte Phosphorylierung des STAT3 bereits 10 min nach Stimulation, die ihr Maximum nach 30 min erreichte und danach wieder abnahm. Die Phosphorylierung von AKT zeigte nach 10 min einen Trend, jedoch keine signifikanten Veränderungen im Zeitverlauf nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R. Für ERK konnte eine sehr geringe, aber signifikante Phosphorylierung nach 30 und 60 min beobachtet werden.



**Abbildung 25. Western Blot Analyse der Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK.** Repräsentative Blots sowie Quantifizierung als Vielfaches der Kontrolle sind gezeigt. Stimulation der Zellen mit 50 ng/ml IL-6 + 100 ng/ml sIL-6R für 10 bis 120 min; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=5-6$ ; \*  $p<0,05$ .

### 3.4.2 Hemmung der Phosphorylierung durch Inhibitoren

Die starke Phosphorylierung von STAT3 gab erste Hinweise, dass der JAK/STAT-Weg maßgeblich an der Induktion der Has mRNA durch IL-6 und sIL-6R beteiligt war. Um diese Vermutung weiter zu kräftigen wurden verschiedene Substanzen verwendet, um die einzelnen Signaltransduktionswege zu inhibieren. Zur Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 wurde der unspezifische JAK/STAT Inhibitor AG490 verwendet mit dem die Zellen vor der Stimulation mit IL-6 und sIL-6R behandelt wurden. Durch die Verwendung von 20  $\mu$ M AG490 30 min vor der Stimulation konnte die Phosphorylierung von STAT3 signifikant gehemmt werden (Abb. 26), dies lässt eine wichtige Funktion dieses Signalweges vermuten.

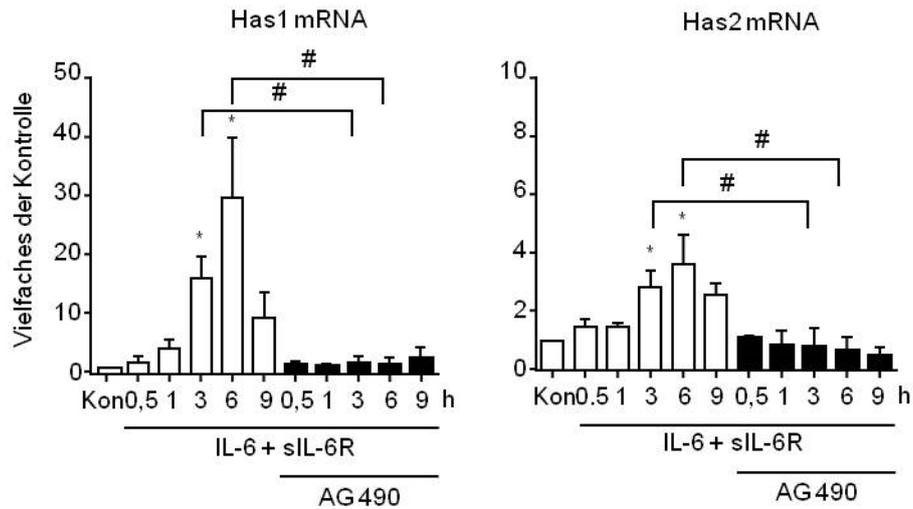


**Abbildung 26. Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach Inhibition mit AG490.** 30 min vor der Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R wurden die Zellen mit 20  $\mu$ M AG490 behandelt. Ein repräsentativer Blot sowie die Quantifizierung als Vielfaches der Kontrolle sind gezeigt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-5; \*  $p < 0,05$ .

Zur Inhibition des PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B-Weges wurde LY294002 und des Ras/Raf/MEK/ERK-Weges PD98059 verwendet. Da die Phosphorylierung dieser beiden Proteine nach Stimulation nicht stark ausgeprägt war, konnte durch Einsatz der Inhibitoren in der Western Blot Analyse kein signifikanter Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.3 Hemmung der Has Genexpression durch die Inhibitoren

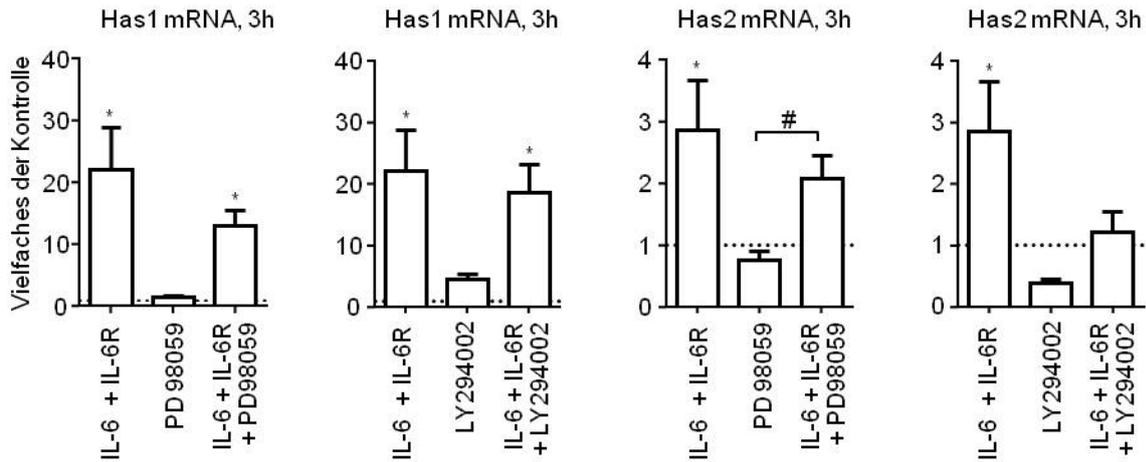
Um die Ergebnisse weiter zu stärken wurden erneut Zellen mit 20  $\mu$ M AG490 behandelt und anschließend die mRNA Expression im Zeitverlauf nach IL-6 und sIL-6R Stimulation analysiert. Es zeigte sich, dass der Einsatz des JAK/STAT Inhibitors zu einer signifikanten Reduktion der mRNA Expression nach Stimulation in KF führte (Abb. 27). Die Expression der Has1 und -2 reduzierte sich auf Basalniveau.



**Abbildung 27. Hemmung der Has1 und -2 mRNA Expression durch AG490.**

30 min vor der Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R wurden die KF mit 20  $\mu$ M AG490 behandelt. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-5; \* gegen Kontrolle,  $p < 0,05$ ; # gegen entsprechenden Zeitpunkt,  $p < 0,05$ .

Ebenfalls wurden die Auswirkungen der anderen beiden Inhibitoren auf die Has mRNA Expression untersucht. Die KF wurden wiederum 30 min vor der eigentlichen Stimulation mit entweder 20  $\mu$ M LY294002 oder 20  $\mu$ M PG98059 behandelt und für drei Stunden anschließend mit IL-6 und sIL-6R stimuliert (Abb. 28). Es zeigte sich ein leichter Trend der Reduktion der mRNA der Has1 und 2 nach Behandlung mit den Inhibitoren, jedoch waren diese nicht signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation. Die Reduktion der Has2 nach Behandlung LY294002 nach Stimulation ist durch die Reduktion der Basalexpression durch den Inhibitor allein zu erklären.



**Abbildung 28. Beeinflussung der Has1 und -2 mRNA Expression durch Ly294002 und PD98059.** 30 min vor der Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R wurden die KF mit 20  $\mu$ M Ly294002 oder PD98059 behandelt. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-5; \* gegen Kontrolle, p<0,05; # gegen Inhibitor-Kontrolle, p<0,05.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die IL-6-vermittelte Induktion der Has1 und -2 mRNA in KF über den intrazellulären JAK/STAT Signalweg ablief und die Involvierung anderer Kaskaden hierbei nur eine untergeordnete Rolle spielte.

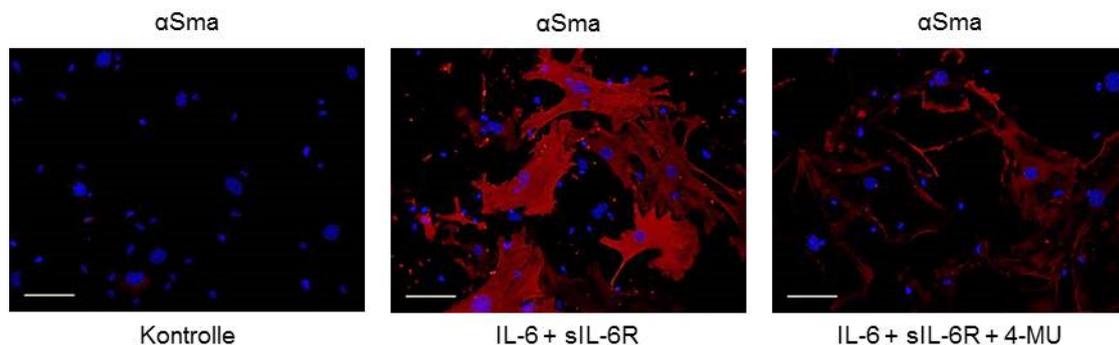
### 3.5 HA-abhängige Induktion eines Myofibroblasten-Phänotyps durch IL-6 in KF

Wie in der Literatur beschrieben kommt es nach Infarkt zu einer vermehrten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese unterscheiden sich vor allem durch die Ausbildung eines Aktin-Myosin-Skeletts und der vermehrten Bildung von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin. Dadurch sind Myofibroblasten in der Lage zu kontrahieren und können somit in begrenztem Maße einen Teil der abgestorbenen Myozytenfunktion ersetzen. Des Weiteren sind Myofibroblasten ähnlich wie auch die Fibroblasten selbst Produzenten großer Mengen an EZM Molekülen wie z.B. Kollagen. Es wurde bereits für andere Zelltypen beschrieben, dass HA ebenfalls an der Ausbildung eines Myofibroblasten-Phänotyps beteiligt ist und daher sollte dies nun im Folgenden überprüft werden [25], [63], [64].

Die KF wurden für einen Zeitraum von 48 h mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R behandelt und anschließend für immunzytochemischen Färbung fixiert oder für die RNA-Analyse aufbereitet.

### 3.5.1 Färbung der Zellen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin

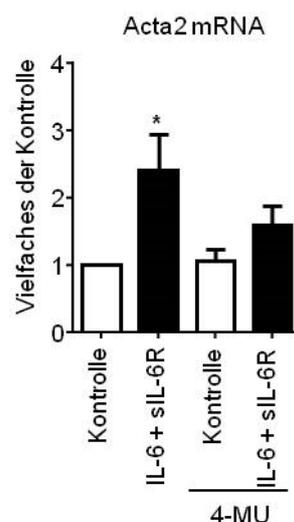
Mittels der Färbung mit einem  $\alpha$ SMA-Antikörper zeigte sich in den stimulierten KF eine deutlich vermehrte Ausbildung von Aktin-Grundgerüsten in den Zellen. IL-6 *trans-signaling* führte in den KF zur Ausbildung eines Myofibroblasten-Phänotyps. Behandelte man die KF 60 min vor der Stimulation und über den Stimulationszeitraum hinweg mit 4-MU, einem Inhibitor der HA Synthese, so konnte die Ausbildung des Aktingerüstes eindrucksvoll verhindert werden (siehe Abb. 29). Darüber hinaus zeigten die stimulierten Zellen eine signifikante Induktion der Acta2 mRNA nach 48 h, welche in den mit 4-MU behandelten Zellen nicht mehr signifikant war.



**Abbildung 29. Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps durch IL-6 *trans-signaling*.**

Die KF wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R stimuliert und zur Inhibition der HA Synthese 60 min vorher mit 300  $\mu$ M 4-MU behandelt. Repräsentative Bilder von n=4 unabhängigen  $\alpha$ SMA Färbung sind gezeigt; 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

### 3.5.2 Genexpression des Acta2



**Abbildung 30. Acta2 mRNA Induktion in KF durch IL-6 und sIL-6R.**

Die KF wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R stimuliert und zur Inhibition der HA Synthese 60 min vor Stimulation mit 300  $\mu$ M 4-MU behandelt. Quantifizierung der Acta2 mRNA Expression; Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=6; \* p<0,05.

Wie bereits aus der Färbung ersichtlich konnte auch auf mRNA Ebene gezeigt werden, dass es durch Stimulation mit IL-6 und sIL-6R zu einer vermehrten Expression von Acta2 kam, welche mit 4-MU gehemmt werden konnte.

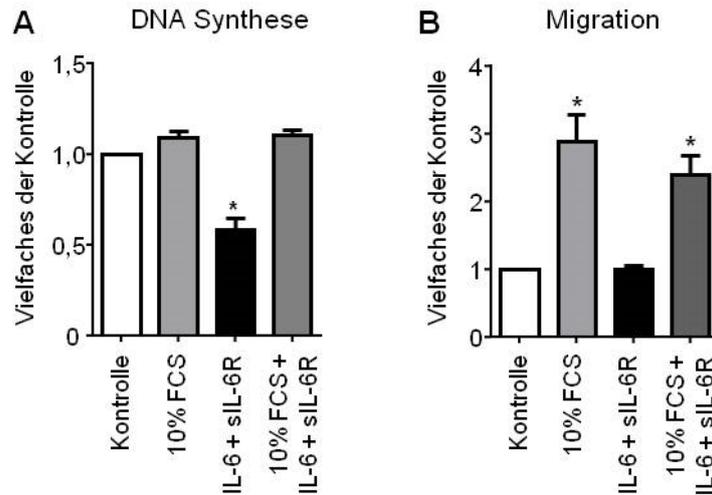
Diese Ergebnisse belegen, dass die durch IL-6 *trans-signaling* vermittelte Ausbildung eines Aktin-Grundgerüsts und die damit einhergehende Aktivierung des Myofibroblasten-Phänotyps in KF HA-abhängig sind.

### 3.5.3 Proliferation und Migration der KF

Eine vermehrte Synthese von HA ist oftmals mit einer erhöhten migratorischen Aktivität der Zellen verbunden und hat ebenfalls Auswirkungen auf die Proliferation [65], [66]. Ob dies für die durch IL-6 aktivierten Fibroblasten ebenfalls zutrifft oder die vermehrte HA Synthese möglicherweise andere Funktionen hat, sollte im Folgenden anhand der Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA als Maß für die Proliferation sowie mittels einer modifizierten Boyden-Kammer zur Ermittlung der migratorischen Eigenschaften der Zellen überprüft werden. Als Positivkontrolle wurde jeweils der Einfluss auf die Proliferation und Migration durch 10% FCS herangezogen.

Die Proliferation der KF wurde durch die IL-6 *trans-signaling* Stimulation der Zellen signifikant inhibiert (Abb. 31 A). Die Behandlung der Zellen mit 10% FCS wies zwar hier kaum eine Steigerung der Proliferation auf, dies könnte allerdings an der allgemein niedrigen Proliferationsrate der primären KF *in vitro* gelegen haben. Die Inhibierung der Proliferation durch IL-6 und sIL-6R auf etwa 60% war jedoch sehr deutlich.

Bei der Migration ist eine signifikante Steigerung durch den positiven Stimulus 10% FCS zu verzeichnen. Jedoch hatte die Migration der Zellen gegen IL-6 und sIL-6R keinen Effekt auf die gerichtete Wanderung der KF (Abb. 31 B).



**Abbildung 31. IL-6-abhängige DNA Synthese und Migration in KF.**

**A**, [<sup>3</sup>H]-Thymidin Inkorporation nach Stimulation der Zellen mit 10% FCS, 50 ng/ml IL-6 + 100 ng/ml sIL-6R oder einer Kombination aus beidem. **B**, Migration gerichtet gegen die unterschiedlichen Stimuli aus A in einer modifizierten Boyden-Kammer. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert ± SEM; n=6; \*, p<0,05.

Die Qualitäten der KF, Proliferation und Migration, waren durch die Behandlung der Zellen mit dem inflammatorischen Stimulus IL-6 und dem sIL-6R negativ bzw. gar nicht beeinflusst. Die Inhibition der Proliferation und die fehlende migratorische Antwort der Zellen lassen darauf schließen, dass die vermehrte Synthese der HA in diesen Zellen einem anderen Zweck zu dienen scheint.

### **3.6 Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine aus KF durch IL-6 Stimulation**

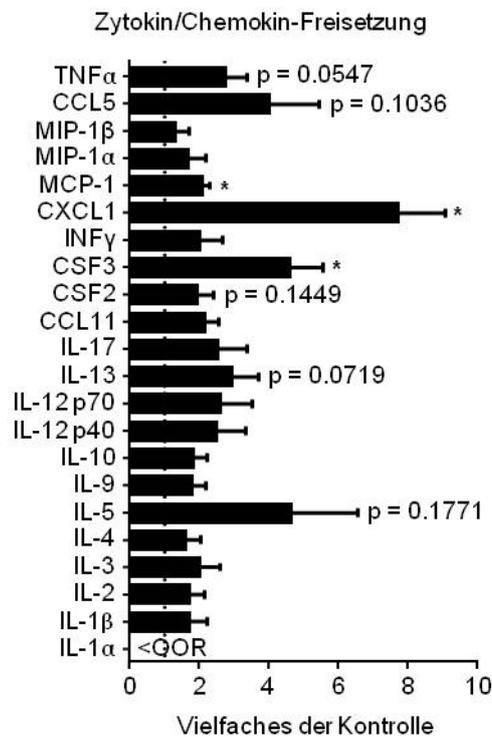
Da die vermehrte Synthese der HA hier nicht als Stimulus für die Migration oder Proliferation diene, war es naheliegend, dass sie eine andere Funktion in diesem Kontext erfüllen musste. Da vor allem die mRNA Expression der Has2 an den Tagen zwei und drei nach Infarkt sehr stark induziert ist und dieses ebenfalls mit der Aktivierung der Myofibroblasten einhergeht, galt es insbesondere diesen Zeitraum und damit verbundene mögliche Aufgaben der HA *in vivo* weiter zu untersuchen.

Da die Zeit zwischen zwei und drei Tagen nach AMI auch als die gekennzeichnet ist, in der die Infiltration des infarzierten Gewebes mit Immunzellen am größten ist, lag die Analyse eines immunmodulatorischen Phänotyps der KF nach IL-6 Stimulation nahe.

### 3.6.1 Multiplex Analyse

Zu diesem Zweck wurden für die *in vitro* Analyse KF für 24 h mit Hyper-IL-6 stimuliert, welches ebenfalls das IL-6 *trans-signaling* imitiert, und anschließend die von den KF ins Medium sekretierten inflammatorischen Zytokine und Chemokine mittels einer Multiplex Analyse identifiziert.

Hierbei zeigte sich, dass die KF nach Aktivierung durch IL-6 und sIL-6R viele verschiedene inflammatorische Zyto- und Chemokine sekretierten. MCP1, CXCL1 und CSF3 waren signifikant induziert, TNF $\alpha$ , CCL5, CSF2, IL-13 und IL-5 zeigten einen deutlichen Trend zur vermehrten Sekretion (Abb. 32). Interessant war hier, dass fast alle dieser Zytokine der Rekrutierung von Immunzellen, wie Neutrophile und mononukleäre Zellen, zum Ort des inflammatorischen Geschehens dienen.



**Abbildung 32. Multiplex Analyse pro-inflammatorischer Zytokine.**

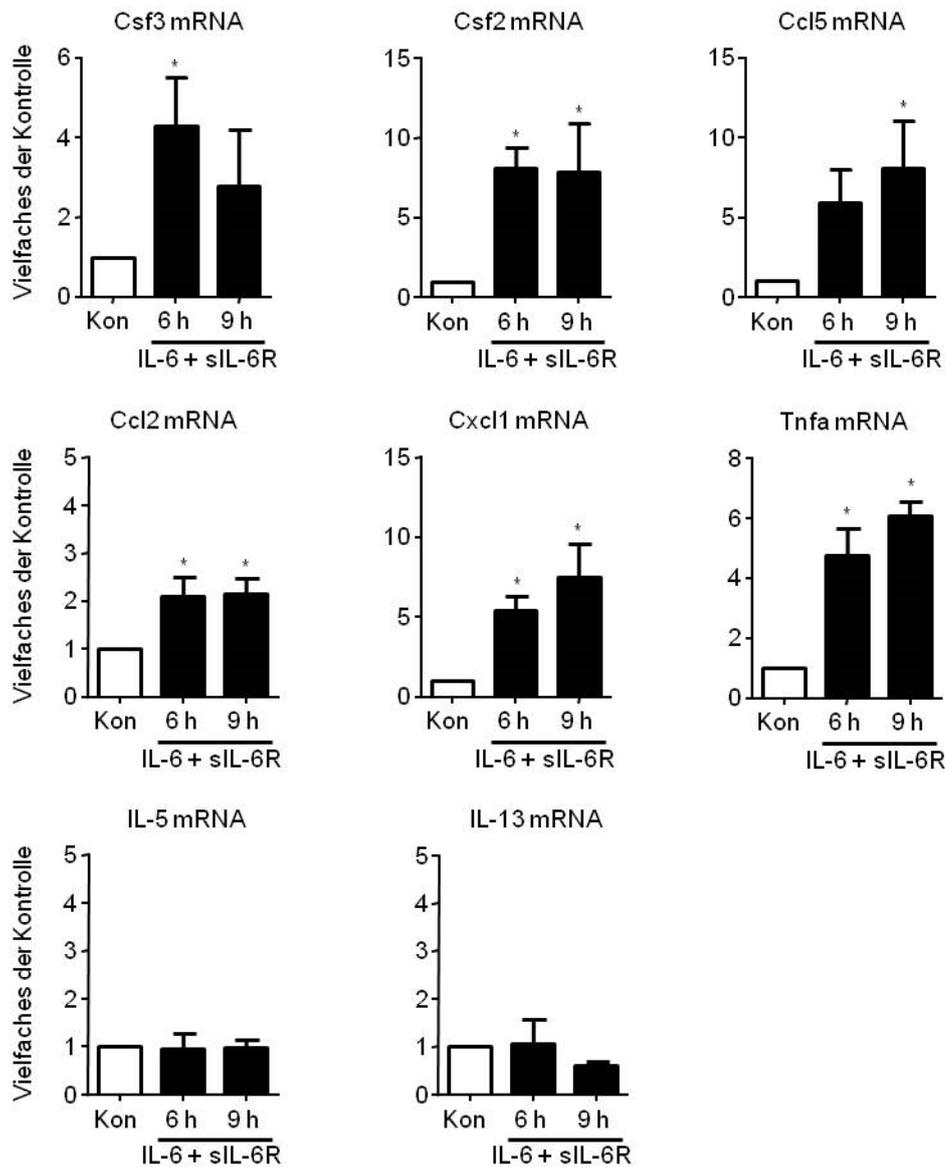
Nach Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 wurden die ins Medium sekretierten Zyto- und Chemokine mittels Multiplex Analyse identifiziert. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; \*, p<0,05.

### 3.6.2 Genexpressionsanalyse der induzierten Zyto- und Chemokine nach 6 und 9 h

Die acht Kandidaten, die hier eine signifikante Induktion bzw. einen deutlich erhöhten Trend zeigten, wurden anschließend hinsichtlich der Induktion der mRNA analysiert. Dazu wurden zwei verschiedene Zeitpunkte nach Stimulation gewählt, 6 und 9 h, da diese zeitlich nach der

Induktion der Has1 und -2 mRNA in den KF lagen und in das Zeitfenster der Sekretion der Zyto- und Chemokine passten.

Bei fast allen Kandidaten war auch die mRNA Induktion signifikant reguliert, mit Ausnahme von IL-5 und IL-13, die keine Induktion zeigten (Abb. 33). Somit induzierte eine erhöhte IL-6 Konzentration auf direktem oder indirektem Wege die mRNA Expression sowie die Synthese der inflammatorischen Zyto- und Chemokine, Csf3, Csf2, Ccl5, Mcp1 (Ccl2), Cxcl1 und Tnfa.



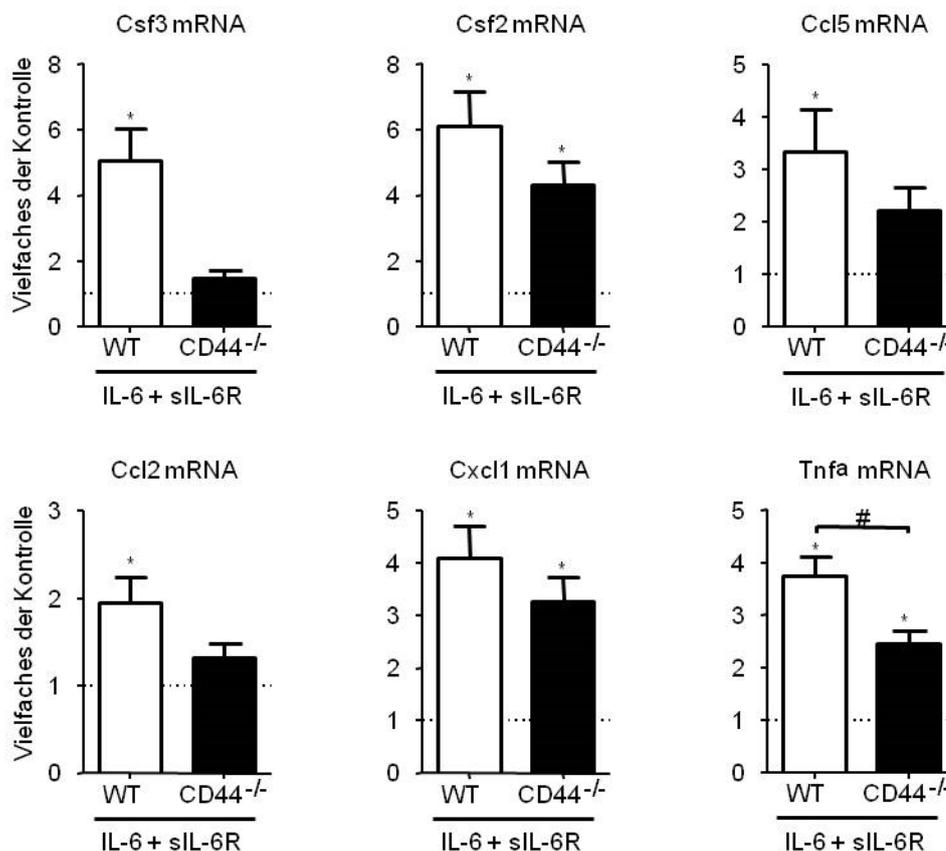
**Abbildung 33. mRNA Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in KF.**

Stimulation der Zellen für 6 und 9 h mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-8; \* p<0,05.

### 3.6.3 Genexpressionsanalyse in KF aus CD44<sup>-/-</sup> Mäusen

Um zu überprüfen ob die erhöhte Expression der Has und die vermehrte HA Synthese einen Einfluss auf die Zytokin- und Chemokinexpression hat, wurden KF aus CD44<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und analog zu den Wildtyp KF (WT) für 6 h mit IL-6 und sIL-6R stimuliert. Da CD44 der Hauptrezeptor für HA-vermittelte Signaltransduktion ist, erschien das Modell in diesem Fall als besser geeignet als die Inhibition der HA Synthese mittels 4-MU, da durch 4-MU keine vollständige Hemmung der HA erzielt werden kann.

Durch den Mangel an CD44 waren Csf3, Ccl5 und Mcp1 (Ccl2) nicht mehr signifikant induziert verglichen mit der Stimulation der WT KF. Tnfa zeigte zwar weiterhin eine signifikante Induktion, war aber gegenüber den WT KF signifikant reduziert (Abb. 34).



**Abbildung 34. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine in WT und CD44<sup>-/-</sup> KF.**

Stimulation der Zellen für 6 h mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R. Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-8; \* p<0,05.

Diese Ergebnisse bestätigten somit den direkten Einfluss der durch IL-6 *trans-signaling* induzierten HA auf die Expression pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine, wie Csf3, Ccl5, Mcp1 (Ccl2) und Tnfa, in KF.

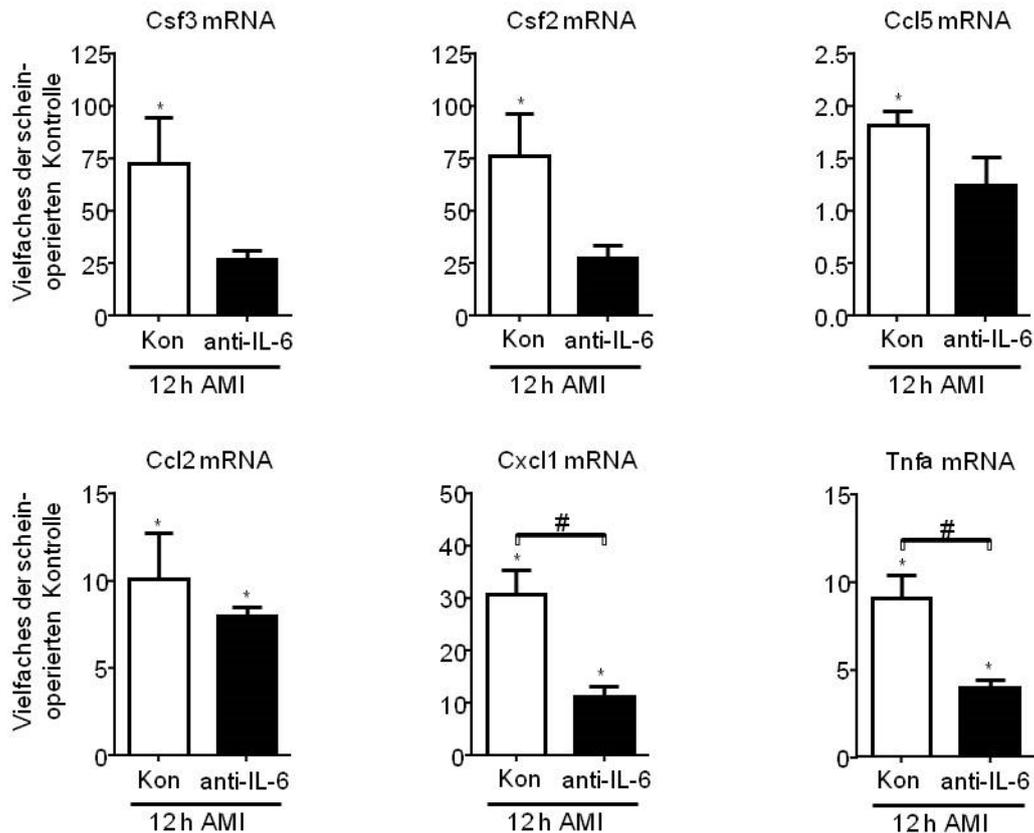
### **3.7 *In vivo* Analyse pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine**

Da die vorangegangenen Untersuchungen zunächst die *in vitro* Konsequenzen der IL-6-induzierten HA im inflammatorischen Kontext zeigten, sollte dies auch schrittweise *in vivo* analysiert werden.

#### **3.7.1 Expressionsniveau der Zytokine nach Behandlung mit dem anti-IL-6 AK**

Zunächst wurde die mRNA der induzierten Zyto- und Chemokine in dem 12 h-Infarktmodell, das zuvor den anti-IL-6 AK erhalten hatte, untersucht. Hierbei sollte der Zusammenhang zwischen den Zellkulturdaten und dem Tiermodell geschaffen werden. Es zeigte sich bei der Analyse der mRNA der Zyto- und Chemokine im linken Ventrikel der Vehikel-behandelten Tiere nach 12 h eine mehr als 30-fache Induktion von Csf3, Csf2 und Cxcl1. Im Verhältnis dazu weniger stark aber dennoch signifikant induziert waren Ccl5, Mcp1 (Ccl2) und Tnfa. Betrachtete man im Vergleich hierzu die Tiere, die 16 h vor AMI mit dem Antikörper gegen IL-6 behandelt wurden, so fand man eine signifikante Reduktion der mRNA Induktion von Csf2, Csf3, Cxcl1 sowie Tnfa. Ccl5 und Mcp1 zeigten einen leichten Trend zur Reduktion der mRNA Expression (Abb. 35).

Dies bestätigte, dass die pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokine, die *in vitro* durch Stimulation der Zellen mit IL-6 und sIL-6R induziert wurden auch *in vivo* zumindest zum Teil eine Abhängigkeit zu IL-6 aufwiesen.



**Abbildung 35. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine *in vivo* post AMI.**

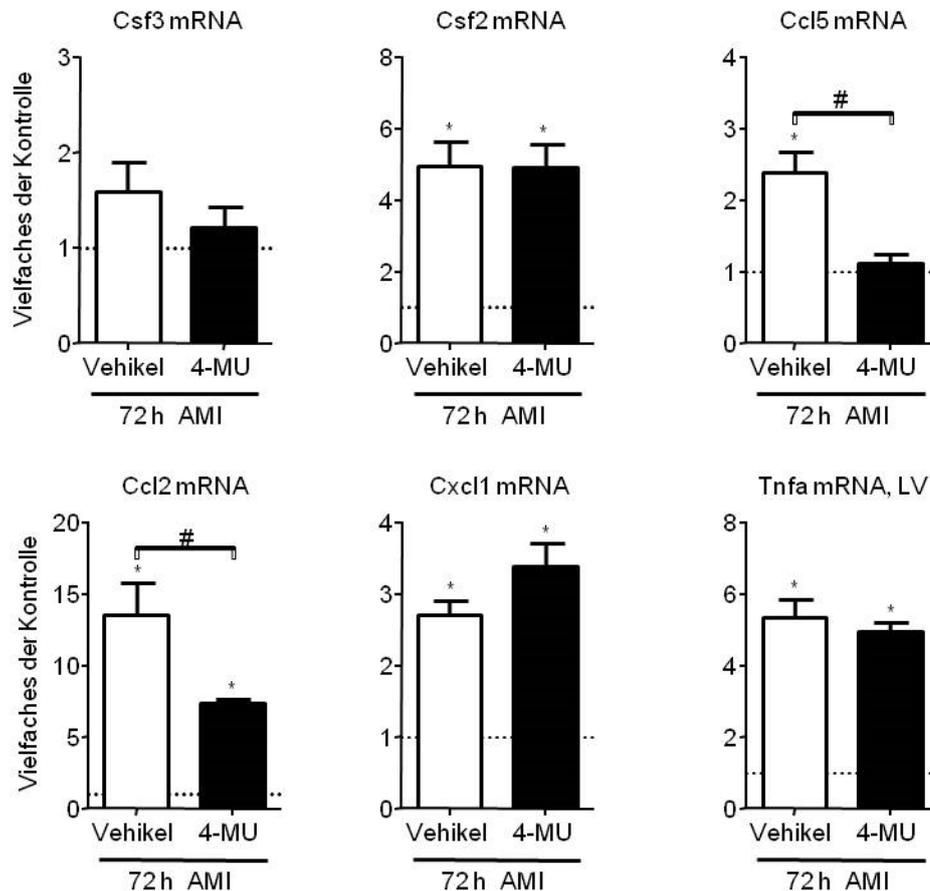
Mäuse wurden 16 h vor OP mit 250 µg anti-IL-6 AK/Maus oder Vehikel behandelt und 12 h nach AMI die mRNA Expression der Zyto- und Chemokine im linken Ventrikel bestimmt. Vielfaches der Scheinoperierten Kontrolle; Mittelwert ± SEM; n=5; \* gegen Kontrolle, p<0,05; # gegen Vehikel AMI, p<0,05.

### 3.7.2 Expressionsniveau der Zytokine nach 4-MU-Behandlung der Tiere

Da die Auswirkungen der HA auf die inflammatorische Reaktion nach AMI in diesem Modell von großem Interesse war, wurde für die folgenden Experimente ein Zeitpunkt von drei Tagen nach AMI gewählt. Da die einmalige Applikation des anti-IL-6 AK vermutlich nicht ausreichend sei um die HA über einen längeren Zeitraum zu hemmen und es zur mehrmaligen Applikation des Antikörpers keinerlei Erfahrungen gibt, wurde für die sichere und langfristige Inhibition der HA die orale Applikation von 4-MU gewählt.

Die Tiere erhielten bereits sieben Tage vor der OP und über den gesamten Verlauf des Experiments eine Dosis von 250 mg 4-MU/Maus/Tag bzw. Vehikel. Analysiert wurden die Tiere an Tag drei nach Infarkt um den Zeitpunkt mit der höchst möglichen Infiltration von Immunzellen zu erfassen. In der Expression der mRNA der verschiedenen Zyto- und Chemokine zeigte sich hier eine signifikante Induktion von Csf2, Ccl5, Mcp1 (Ccl2), Cxcl1 und Tnfa bei den Vehikel-behandelten Tieren. Im Vergleich zu der Induktion nach 12 h waren diese nur schwach bis mäßig induziert (2,5- bis 14-fach). Die 4-MU-behandelten Tiere

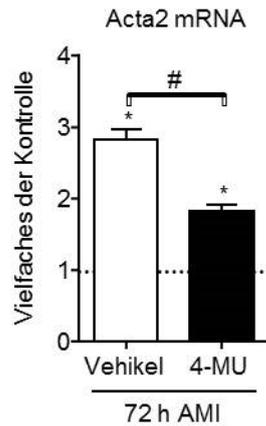
wiesen für Ccl5 und Mcp1 (Ccl2) eine signifikante Reduktion der Induktion der mRNA auf (Abb. 36). So schien die Induktion von Ccl5 und Mcp1 zum Zeitpunkt drei Tage nach AMI tatsächlich HA-abhängig zu sein, diese Erkenntnis deckte sich in Teilen mit den zuvor gewonnenen *in vitro* Ergebnissen.



**Abbildung 36. Induktion inflammatorischer Zyto- und Chemokine *in vivo* post AMI.**

Mäuse wurden sieben Tage vor und bis drei Tage nach OP mit 250 mg 4-MU/Tag/Maus oder Vehikel behandelt und 72 h nach AMI die mRNA Expression der Zyto- und Chemokine im linken Ventrikel bestimmt. Vielfaches der Vehikel-behandelten Schein-operierten Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-8; \* gegen Kontrolle, p<0,05; # gegen Vehikel AMI, p<0,05.

Darüber hinaus konnte bei den 4-MU- im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der Acta2 mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 37), was sich ebenfalls mit den *in vitro* Ergebnissen deckte.



**Abbildung 37. Induktion Acta2 mRNA *in vivo* post AMI.**

Mäuse wurden sieben Tage vor und bis drei Tage nach OP mit 250 mg 4-MU/Tag/Maus oder Vehikel behandelt und 72 h nach AMI die Acta2 mRNA Expression im linken Ventrikel bestimmt. Vielfaches der Vehikel-behandelten Schein-operierten Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-8; \* gegen Kontrolle,  $p < 0,05$ ; # gegen Vehikel AMI,  $p < 0,05$ .

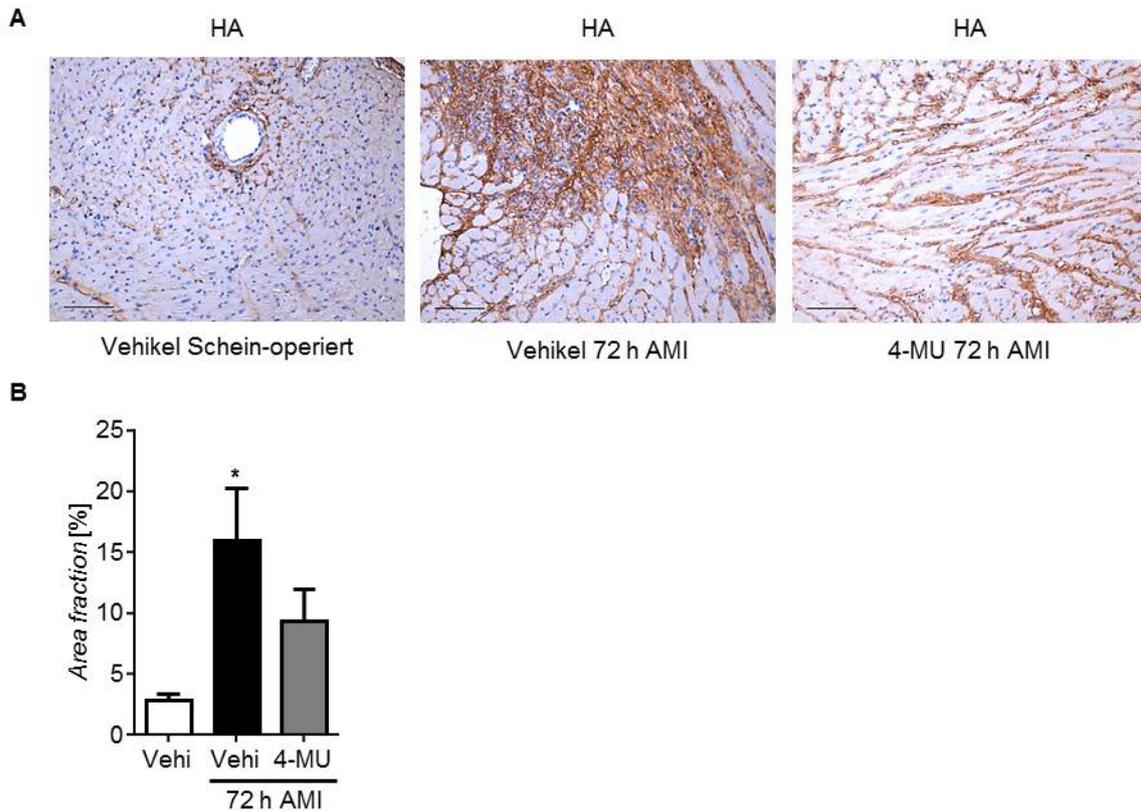
Folglich hatte die Hemmung der HA *in vivo* nach AMI einen vergleichbaren Effekt wie die *in vitro* Hemmung. HA war verantwortlich für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und vermittelte die Signalkaskade zur Aktivierung der Synthese von pro-inflammatorischen Chemokinen wie Ccl5 und Mcp1.

### **3.8 Konsequenzen der HA-Inhibition mittels 4-MU auf die inflammatorische Reaktion *in vivo* post AMI**

Da die HA wie oben dargestellt tatsächlich einen direkten Einfluss auf die inflammatorische Reaktion nach AMI zeigte, war der nächste Schritt die Auswirkung der Inhibition der HA und der damit verbundenen Hemmung der inflammatorischen Chemokine CCL5 und MCP1 auf die Infiltration des infarzierten Gewebes mit Neutrophilen und mononukleären Zellen (im speziellen Makrophagen) zu untersuchen.

#### **3.8.1 HA Expression im Herzgewebe nach 4-MU Behandlung**

Zunächst sollte anhand einer Färbung der HA im infarzierten Herzgewebe belegt werden, dass die Behandlung mit 4-MU tatsächlich die Ausbildung der HA im infarzierten Herzen hemmt (Abb. 38 A). Hierzu wurde an Gewebeschnitten die HA Expression im Randgebiet des Infarktes quantifiziert (Abb. 38 B).



**Abbildung 38. HA Färbung der Gewebeschnitte des Herzens 72 h post AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. A, repräsentative Bilder und B, Quantifizierung sind gezeigt. 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100 µm. Vielfaches der Vehikel-behandelten Schein-operierten Kontrolle; Mittelwert ± SEM; n=3-4; \* p<0,05.

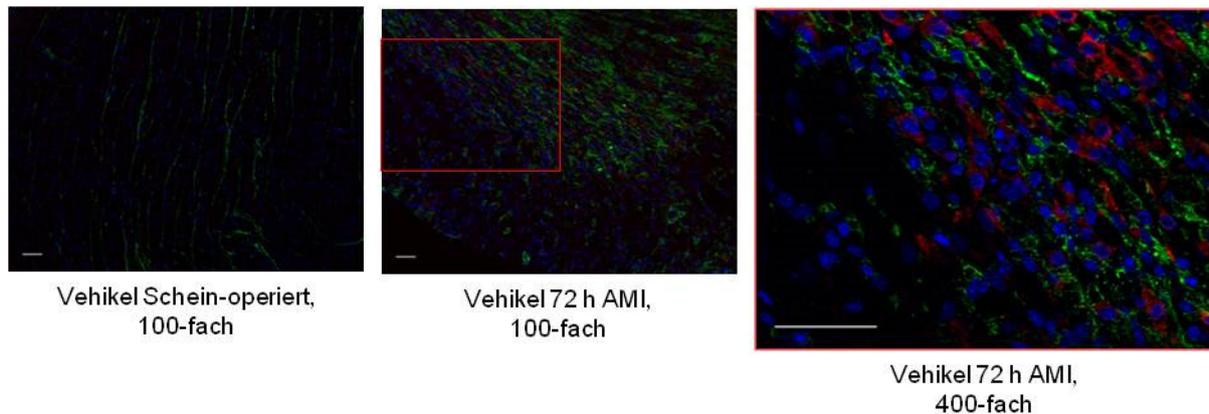
Die 72 h nach AMI signifikant erhöhte Expression der HA war in den 4-MU behandelten Tieren nach Infarkt deutlich reduziert und nicht mehr signifikant erhöht gegenüber den Schein-operierten Kontroll-Tieren, was den *in vivo* Effekt des 4-MU belegte.

### 3.8.2 Ko-Lokalisierung der HA und Makrophagen 72 h nach AMI

Da für HA eine Adhäsionskapazität für Monozyten an z.B. glatten Muskelzellen bekannt ist [67], wurde die Infiltration des infarzierten Gewebes mit Immunzellen in Abhängigkeit von HA untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Fluoreszenz-Doppelfärbung der Gewebsschnitte für HA (grün) und Makrophagen (MAC2, rot) an Vehikel-behandelten schein-operierten und infarzierten Tieren durchgeführt.

Deutlich war anhand der Färbungen zu erkennen, dass HA und ebenfalls die Makrophagen sehr stark in der Randregion sowie auch im infarzierten Bereich des linken Ventrikels nachzuweisen waren. In der höheren Vergrößerung (400-fach) konnte man weiterhin sehr gut erkennen, dass die infiltrierten Makrophagen sich deutlich dort lokalisierten, wo auch die HA vermehrt vorlag und dass es teilweise sogar erschien, als wäre die HA direkt mit den

Makrophagen verbunden (Abb. 39). Hier konnte von einer Ko-Lokalisierung der HA und Makrophagen ausgegangen werden.

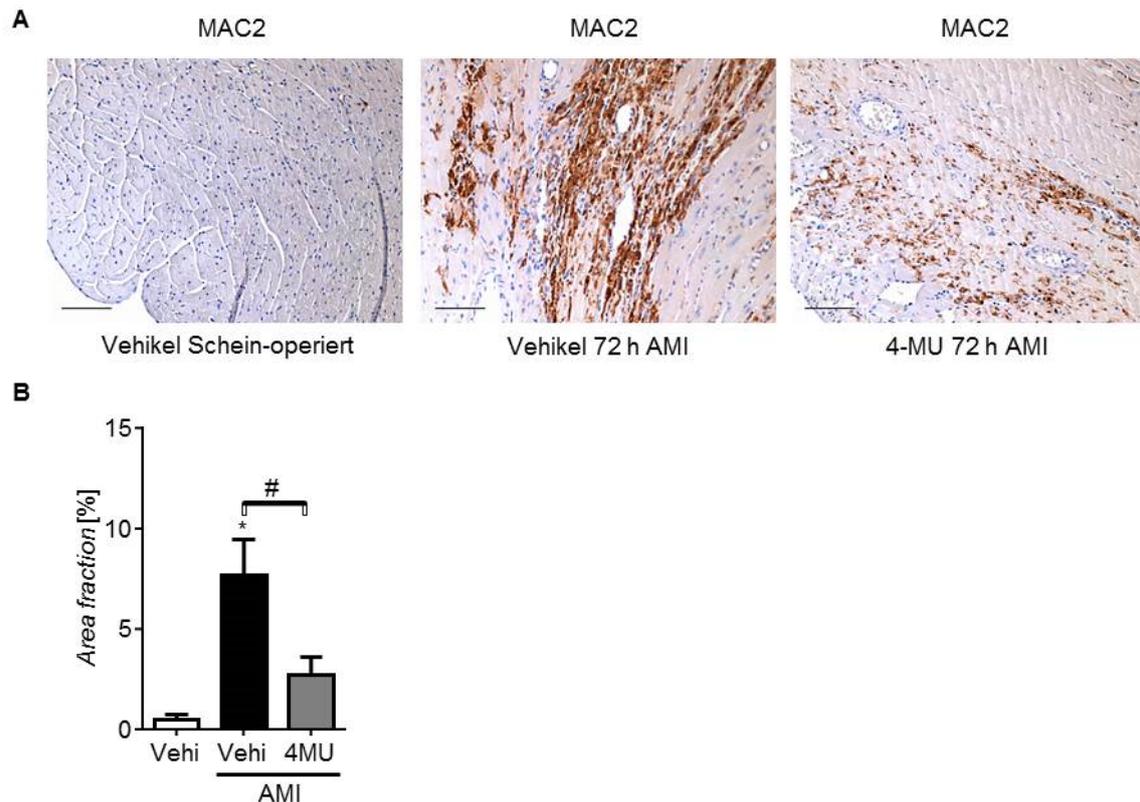


**Abbildung 39. HA/MAC2 Doppelfärbung 72 h post AMI im linken Ventrikel.**

In der Färbung sind HA (grün), MAC2 (rot) sowie die Zellkerne (DAPI, blau) dargestellt. Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel-behandelten AMI-Tieren. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Vergrößerung wie angegeben; Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.8.3 Makrophagen-Infiltration des infarzierten Herzens nach 4-MU Behandlung

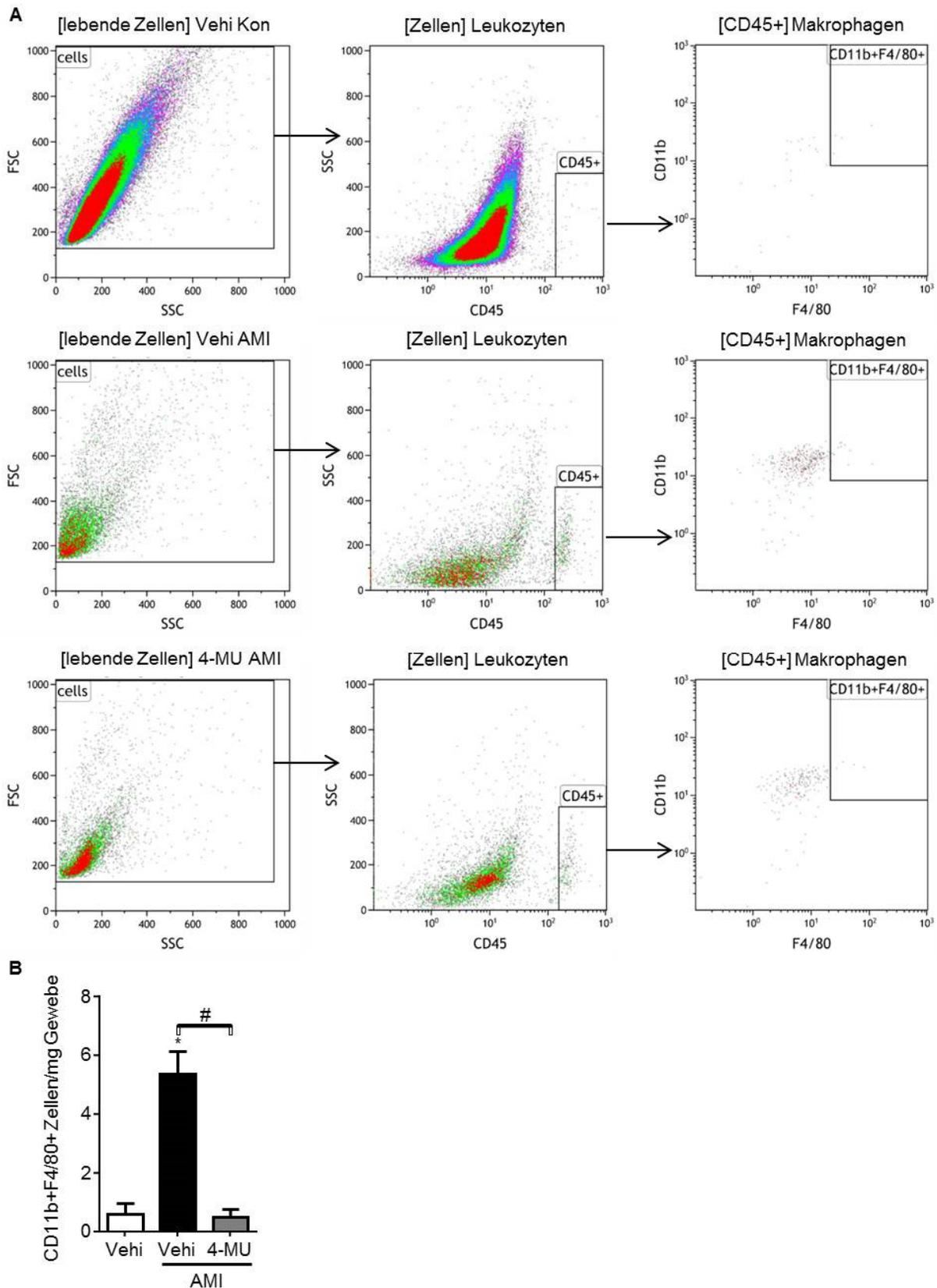
Um die HA-abhängige Infiltration der Makrophagen 72 h nach AMI zu untersuchen, wurde die Färbung von MAC2 über die positiv-angefärbten Areale prozentual quantifiziert (*Area fraction*) (Abb. 40 A und B), da die Zellen so dicht beieinander lagen, dass ein Zählen einzelner Zellen nicht möglich war. Die Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere wiesen keine positive MAC2-Färbung auf, wohingegen die Vehikel-behandelten AMI-Tiere eine sehr starke Infiltration mit MAC2-positiven Zellen aufwiesen. Tatsächlich war diese in den mit 4-MU-behandelten infarzierten Mäusen signifikant reduziert. Die Hemmung der HA ging mit einer signifikant reduzierten Makrophagen-Infiltration einher, welche die Ko-Lokalisierung aus Abbildung 39 weiter bekräftigt.



**Abbildung 40. MAC2 Färbung 72 h post AMI im linken Ventrikel.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. A, repräsentative Bilder und B, Quantifizierung sind gezeigt. 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100 µm; Mittelwert ± SEM; n=3-4; \* gegen Kontrolle,  $p < 0,05$ ; # gegen Vehikel-behandelte AMI Mäuse,  $p < 0,05$ .

Die deutlich erniedrigte Makrophagen-Infiltration konnte ebenfalls mit Hilfe einer FACS-Analyse quantifiziert und belegt werden (Abb. 41 A und B). So zeigte sich auch hier eine sehr deutliche und signifikante Inhibition der Makrophagen 72 h nach AMI wenn die Mäuse zuvor mit 4-MU behandelt wurden. Die FACS Analyse wurde aus dem dissoziierten Gewebe der (infarzierten) Herzspitze durchgeführt, daher war die Zellausbeute gering.

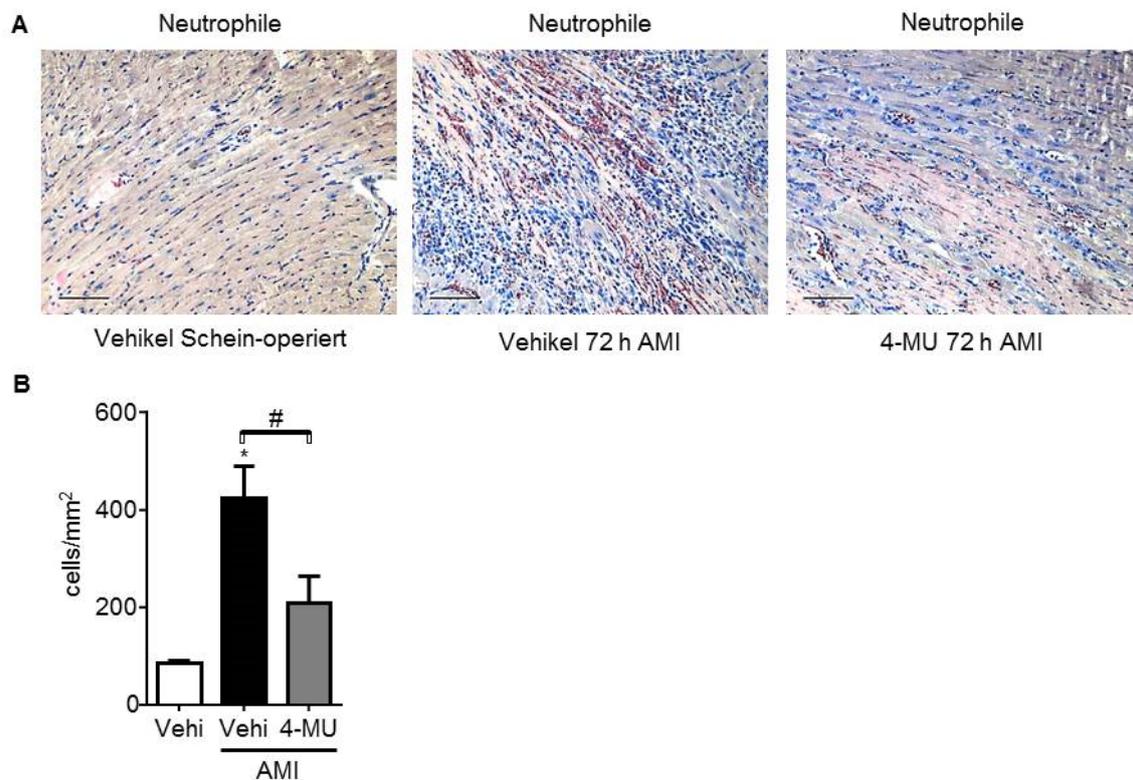


**Abbildung 41. FACS-Analyse der Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen) in der Herzspitze 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. A, repräsentative Durchfluss-Diagramme und B, Quantifizierung sind gezeigt. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-5; \* gegen Kontrolle, p<0,05; # gegen Vehikel-behandelte AMI Mäuse, p<0,05.

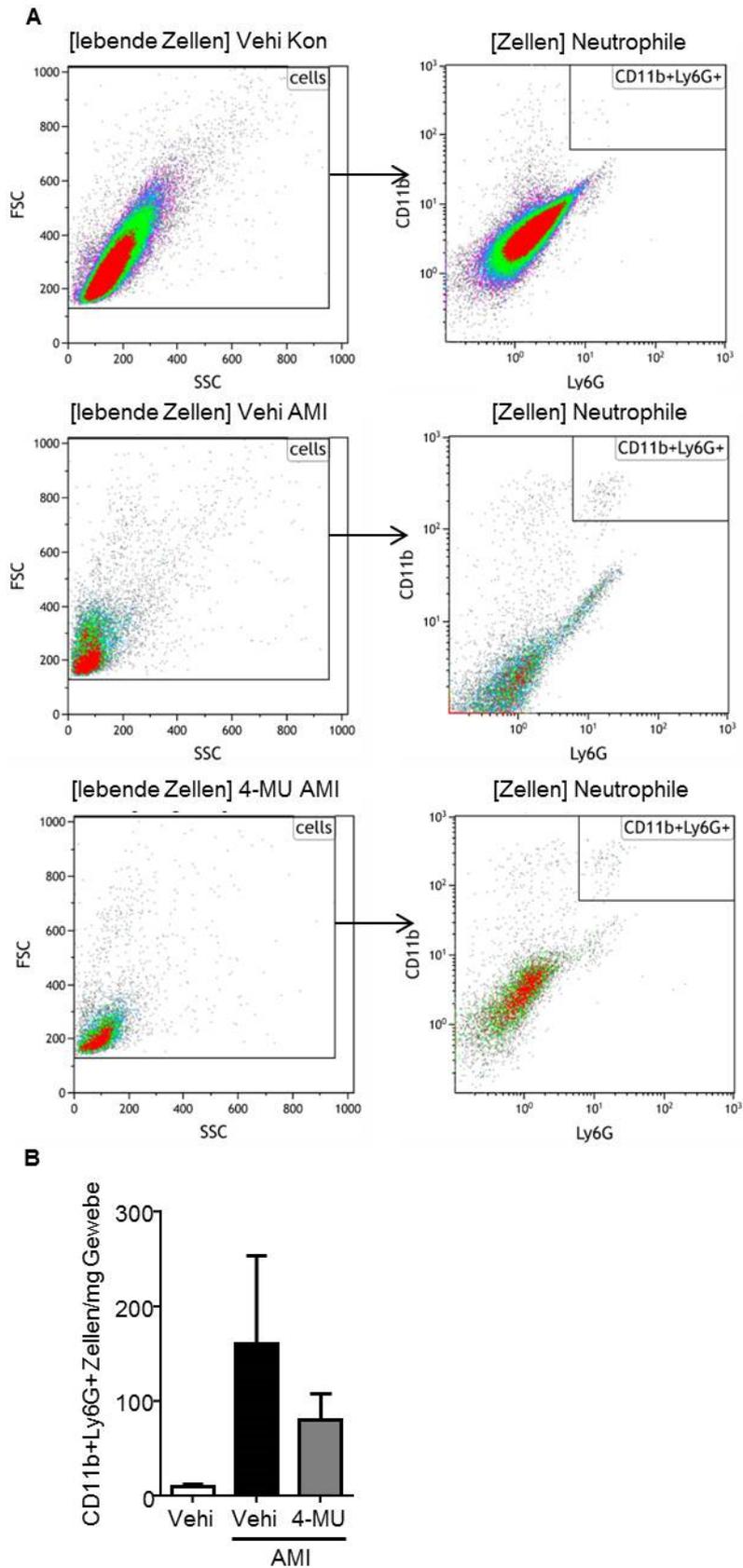
### 3.8.4 Neutrophilen-Infiltration im infarzierten Herz nach 4-MU Behandlung

Neben der Analyse der Makrophagen sollten auch weitere Immunzellen, die nach AMI einer starken Rekrutierung ins infarzierte Gewebe unterliegen, untersucht werden. Die Neutrophilen-Infiltration nach AMI geht zeitlich gesehen der Makrophagen-Einwanderung etwas voraus, beide sind jedoch zu dem Zeitpunkt 72 h nach AMI so zahlreich vertreten, dass für die Quantifizierung derselbe Zeitpunkt genutzt werden konnte [68]. Für die Färbung wurde sich die Neutrophilen-Esterase zu Nutze gemacht, welche mit einer Rot-Färbung auf die Einwirkung des Naphthol AS-D-Chloroacetat reagierte. Deutlich war auch hier zu erkennen, dass die Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere nur eine geringe Infiltration des Gewebes mit Neutrophilen zeigten, wohingegen die Vehikel-behandelten AMI-Tiere eine massive Gewebsinfiltration aufwiesen (Abb. 42 A). Ähnlich wie bereits bei den Makrophagen beobachtet werden konnte, führt die Hemmung der HA *in vivo* ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen im Herzen nach Infarkt. Ebenso konnte dieser Trend anhand der FACS-Analyse der Herzspitze gezeigt werden (Abb. 43 A und B). Hier wurden die CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>-positiven Zellen detektiert und quantifiziert.



**Abbildung 42. Neutrophilen Färbung 72 h post AMI im linken Ventrikel.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. Repräsentative Bilder und Quantifizierung sind gezeigt. 200-fache Vergrößerung; Maßstabbalken 100 µm; Mittelwert ± SEM; n=3; \* gegen Kontrolle, p<0,05; # gegen Vehikel-behandelte AMI Mäuse, p<0,05.



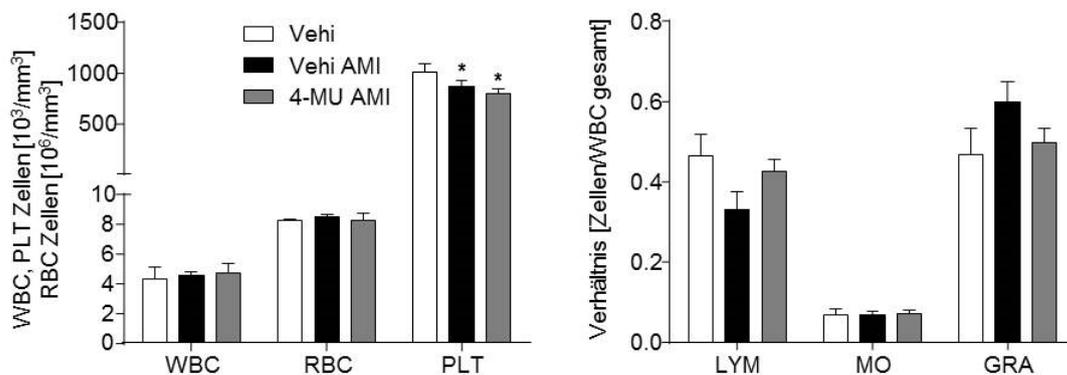
**Abbildung 43. FACS-Analyse der Neutrophilen (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>-Zellen) in der Herzspitze 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. A, repräsentative Durchfluss-Diagramme und B, Quantifizierung sind gezeigt. Mittelwert ± SEM; n=4.

Es konnte demnach belegt werden, dass die Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen in das Randgebiet sowie in das infarzierte Areal nach AMI in Mäusen HA-abhängig war.

### 3.8.5 Blutbildveränderungen nach 4-MU Behandlung

Neben der Analyse der Infiltration der Immunzellen im Herzgewebe wurde ebenfalls ein Differenzial-Blutbild erstellt in dem zu einem die Menge an Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten quantifiziert wurde und zum anderen die Leukozyten differenziert dargestellt wurden. In der Analyse der roten und weißen Blutkörperchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch war die Anzahl der Thrombozyten drei Tage nach Infarkt in den Vehikel- sowie den 4-MU-behandelten AMI-Tieren signifikant reduziert. In der Differenzial-Blutbild-Analyse der Lymphozyten, der Monozyten und der Granulozyten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch waren die Lymphozyten tendenziell in den Vehikel-behandelten AMI-Tieren reduziert und die Granulozyten zeigten eine leichte Induktion, wohingegen das Lymphozyten- und Granulozyten-Verhältnis der 4-MU-behandelten Tiere dem der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere entsprach (Abb. 44).



**Abbildung 44. Analyse des Differenzial-Blutbilds 72 h nach AMI.**

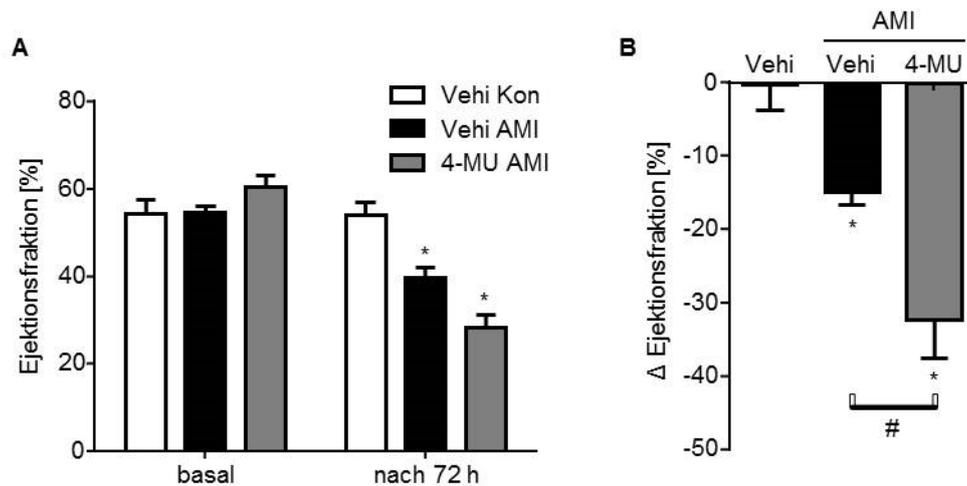
Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. Analyse der Anzahl der Leukozyten (WBC), der Erythrozyten (RBC) und der Thrombozyten (PLT) sowie Unterscheidung der Leukozyten in Lymphozyten (LYM), Monozyten (MO) und Granulozyten (GRA) jeweils bezogen auf gesamt Menge an Leukozyten. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4; \* gegen Vehikel-behandelte Schein-operierte Tiere,  $p < 0,05$ .

### **3.9 Analyse der Herzfunktion 72 h nach AMI**

Um ebenfalls die Funktionsauswirkungen der Hemmung der HA und der damit verbundenen verminderten Immunzellinfiltration zu analysieren wurde zunächst vor der Okklusion der linken Koronararterie bzw. Schein-OP und dann 72 h nach entsprechender OP mittels Echokardiographie die Herzfunktion untersucht.

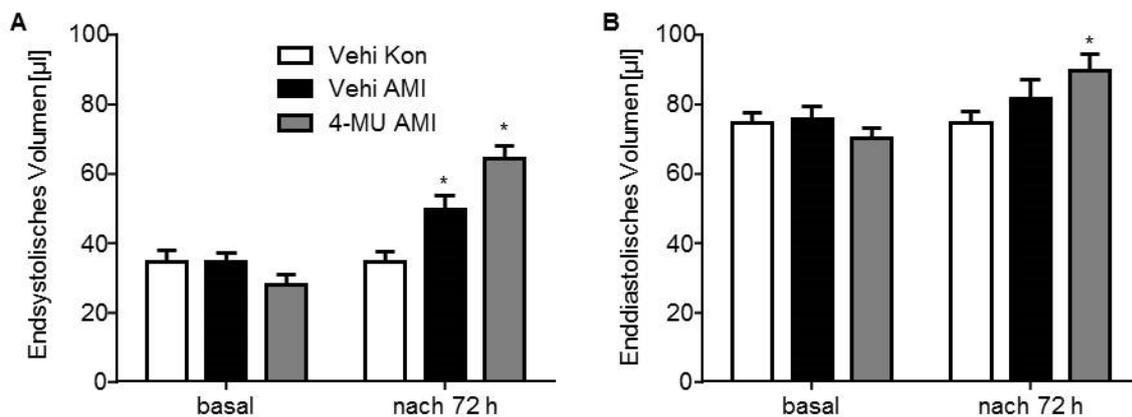
#### **3.9.1 Ejektionsfraktion**

Aus der Analyse mittels Ultraschall lassen sich viele verschiedene Parameter ableiten, von besonderem Interesse war hier die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), welche die prozentuale Auswurfmenge des linken Ventrikels angibt. So ist die LVEF indirekt auch ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens. Bei den Vehikel-behandelten scheinoperierten Tieren zeigte sich erwartungsgemäß im Vergleich zur Basalmessung 72 h nach der OP keine Veränderung der LVEF. In allen untersuchten AMI-Tieren konnte hingegen eine signifikante Verminderung der prozentualen LVEF nach 72h beobachtet werden (Abb. 45). Die LVEF der 4-MU-behandelten AMI-Tieren war zum Zeitpunkt 72 h nach AMI im Vergleich zu den Vehikel-behandelten AMI-Tieren hochgradiger reduziert. Demnach führte die Hemmung der HA und die damit verbundene verminderte Infiltration an Entzündungszellen zu einer zusätzlichen Reduktion der linksventrikulären Funktion nach AMI. Zusätzlich deutete das erhöhte enddiastolische linksventrikuläre Volumen der 4-MU-behandelten AMI-Tiere auf eine signifikante Dilatation des linken Ventrikels hin im Vergleich zu Vehikel-behandelten scheinoperierten und auch Vehikel-behandeltem AMI-Tieren (Abb. 46 B). Zudem zeigte das erhöhte endsystolische linksventrikuläre Volumen beider AMI-Gruppen, dass der linke Ventrikel vermutlich durch die Schädigung des Herzmuskelgewebes nicht mehr ausreichend kontrahieren konnte und dadurch ein erhöhtes Restblutvolumen (ESV) im Herzen verblieb (Abb. 46 A).



**Abbildung 45. Echokardiographische Analyse der EF vor und 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. **A**, Messung der EF basal und post-Infarkt. **B**, Delta der EF Vor/Nach-Infarkt. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=9; \* gegen basal, p<0,05; # gegen Vehikel-behandelte AMI Mäuse, p<0,05.



**Abbildung 46. Endsystolisches und enddiastolisches Kammervolumen vor und 72 h nach OP.**

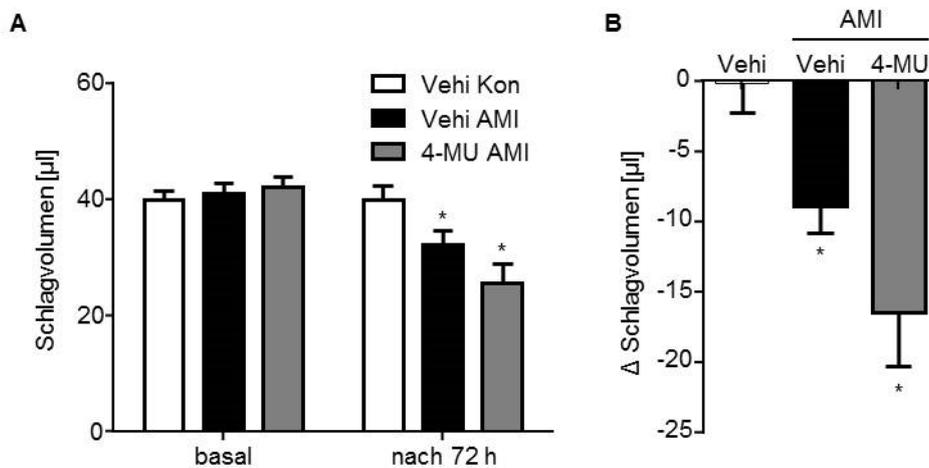
Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. **A**, maximales Kammervolumen zum Zeitpunkt der stärksten Kontraktion und **B**, maximales Volumen nach vollständiger Füllung der Kammern. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=9; \* gegen basal, p<0,05.

### 3.9.2 Schlagvolumen

Das Schlagvolumen (SV) gibt in der Regel ebenfalls an, wie gut die Kontraktionsfähigkeit des Herzens in der Systole ist und errechnet sich aus enddiastolischem und endsystolischem Volumen.

Einhergehend mit der bereits gezeigten verminderten linksventrikulären Herzfunktion in den beiden AMI-Gruppen war auch das SV signifikant reduziert verglichen zu den Vehikel-behandelten schein-operierten Tieren (Abb. 47). Es zeigte sich hierbei wie auch bereits

anhand der anderen Daten beschrieben ein deutlicher Trend eines weiter reduzierten Schlagvolumens in der 4-MU-behandelten AMI Gruppe.

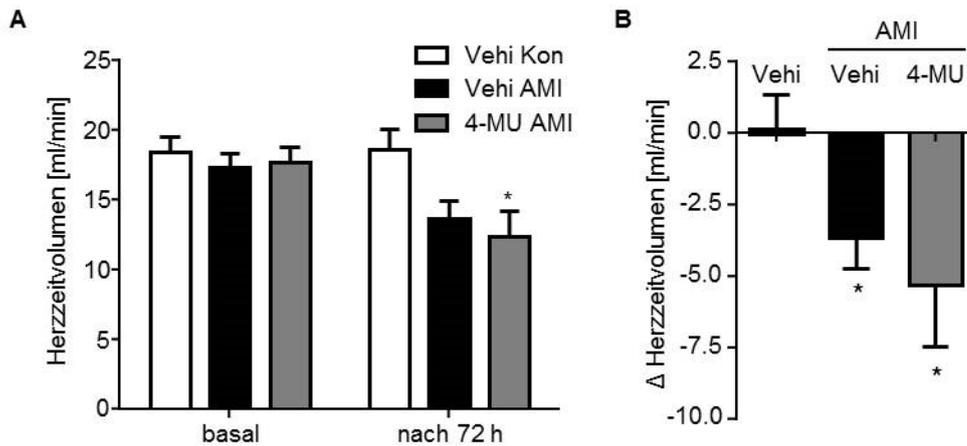


**Abbildung 47. Echokardiographische Analyse des SV vor und 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. **A**, Messung des basalen und post-Infarkt SV. **B**, Delta des SV Vor/Nach-Infarkt. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=9; \* gegen basal,  $p < 0,05$ .

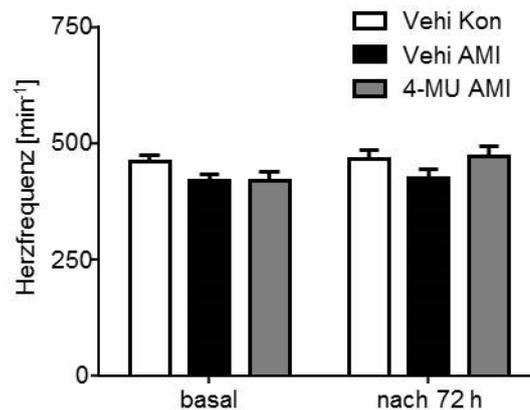
### 3.9.3 Herzzeitvolumen und Herzfrequenz

Ein weiterer Parameter der echokardiographischen Analyse ist das Herzzeitvolumen (HZV), welches sich aus dem SV und der Herzfrequenz errechnet. Anhand des HZV wird ersichtlich, ob ein vermindertes SV z.B. durch Erhöhung der Herzfrequenz kompensiert wird. In dieser Analyse zeigte sich, dass vergleichbar zu den Daten aus der Analyse des SV, beide AMI Gruppen eine deutliche Reduktion des HZV nach 72h zeigten (Abb. 48 A). Diese zeigte sich vor allem in der Darstellung des Deltawertes vor und 72 h nach OP (Abb. 48 B), ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden AMI Gruppen konnte nicht beobachtet werden. Das verminderte SV konnte nicht durch eine Erhöhung der Herzfrequenz bei den beiden AMI Gruppen kompensiert werden, denn die Herzfrequenz war gegenüber den Vehikel-behandelten schein-operierten Tieren nicht signifikant verändert (Abb. 49).



**Abbildung 48. Echokardiographische Analyse des HZV vor und 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. **A**, Messung des basalen und post-Infarkt HZV. **B**, Delta des HZV Vor/Nach-Infarkt. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=9; \* gegen basal bzw. Schein-operierte Kontrolle,  $p < 0,05$ .



**Abbildung 49. Echokardiographische Analyse der Herzfrequenz vor und 72 h nach AMI.**

Vergleich der Vehikel-behandelten Schein-operierten Tiere mit Vehikel- und 4-MU-behandelten AMI-Tieren. Messung der basalen und post-Infarkt Herzfrequenz. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=9.

Zusammenfassend lässt sich nach Analyse der echokardiographischen Daten sagen, dass die systemische Inhibition der HA Synthese zu einer deutlichen Verminderung der linksventrikulären Herzfunktion gegenüber den Vehikel-behandelten AMI-Tieren führte. Dies ergab sich aus einer signifikant verschlechterten Ejektionsfraktion, einem erhöhten endsystolischen und enddiastolischen linksventrikulärem Volumen sowie einem reduzierten Schlagvolumen.

## 4 Diskussion

### **4.1 Induktion HA-assoziiierter Gene nach AMI im Herzgewebe**

Die Funktion der HA während des myokardialen Umbaus nach akuter Ischämie ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass HA im Herzgewebe nach Infarkt vermehrt gebildet wird und hier z.B. für die Ödembildung mitverantwortlich ist oder aber an Zellmigration und –proliferation beteiligt sein könnte [20], [21]. Völlig unklar aber ist die Rolle der HA im inflammatorischen Geschehen, die im Folgenden anhand der hier beschriebenen Ergebnisse und der bekannten Literatur detailliert interpretiert und diskutiert werden soll.

Die Analyse der HA-assoziierten Gene nach AMI hat ergeben, dass neben einer sehr schnellen Induktion der Has1 mRNA 12 h nach Infarkt es zu einer verlängerten und ausgeprägten Induktion der Has2 mRNA nach 2, 3 und 7 d nach AMI kam. Die Has3 mRNA wurde durch das Ereignis des AMI nicht signifikant beeinflusst. Diese neu gewonnene Information über die unterschiedliche Regulation der Has Isoenzyme nach AMI ermöglicht neue Einblicke in das Post-Infarkt-Geschehen und bedeutet für die Has1 und -2 im strukturellen Umbau der EZM im Herzen eine besondere Rolle. War bislang in der Literatur nur beschrieben, dass es nach AMI zu einer vermehrten Synthese von HA im Herzgewebe kommt, so sind nun auch die potenziell synthetisierenden Enzyme bekannt. Darüber hinaus wurde die wichtige Rolle der HA im Umbau des ischämischen Herzgewebes dadurch belegt, dass die Expression der mRNA verschiedener HA-bindender Proteine ebenfalls signifikant induziert war. Darunter der Rezeptor CD44, welcher maßgeblich für die HA-vermittelte Signaltransduktion verantwortlich ist. CD44 war bereits nach 12 h und bis zu 7 Tagen nach Infarkt signifikant induziert. Weitere induzierte Proteine waren HARE, RHAMM und TSG6, die durch die Bindung der HA diese vor dem schnellen Abbau schützen darüber hinaus modulieren sie die Zell-Zell-Kontakte.

Von großer Bedeutung im Geschehen nach AMI war hier vor allem der Rezeptor CD44, da HA neben der Funktion als Matrixmolekül ebenfalls als Signaltransduktions-Molekül agiert. Die Induktion dieses Rezeptors nach Infarkt wurde bereits von Huebner *et al.* 2008 [22] beschrieben und als bedeutend für die Gewebeumstrukturierung interpretiert. In der Analyse zeigte sich jedoch eine deutlich geringere Regulation des Rezeptors nach Infarkt. Die unterschiedlich starke Ausprägung der Induktion der mRNA kann jedoch in verschiedenen Ursachen begründet liegen. Zum einen wurden verschiedene Mausstämme verwendet, zum anderen kann es auch auf Unterschiede in der Durchführung der Methode des AMI oder auch in der Aufarbeitung und Analyse der Gewebe zurückzuführen sein. Jedoch ist eine Induktion im Verlauf nach AMI in beiden Analysen deutlich zu erkennen.

Neben der induzierten Has mRNA war ebenfalls eine vermehrte Anhäufung der HA im Herzgewebe nach Infarkt zu detektieren. Die HA Expression zeigte sich bereits in geringem Ausmaß nach 12 h und verstärkte sich im Zeitverlauf nach AMI zunehmend, was sich mit bereits beschriebenen Erkenntnissen deckt [20]. So zeigten unter anderem Dobaczewski *et al.* 2006 [21], dass es im Herz der Maus sowie des Hundes nach Infarkt zu einer vermehrten Bildung von HA kam, welche bei der Maus an Tag 3 und beim Hund an Tag 14 ihr Maximum erreichte. Was jedoch in früheren Publikationen nicht diskutiert wurde, ist der Ursprung und die Regulation dieser vermehrten HA Produktion im Herzen nach Infarkt.

Über die vermehrte HA im Herzen hinaus konnten auch signifikant erhöhte HA-Plasmaspiegel in den infarzierten Mäuse nachgewiesen werden, welche ähnlich der Expression der Has Isoenzyme eine schnelle Induktion erfuhren und sich alsbald wieder normalisierte. Eine Erhöhung der HA im Plasma nach Infarkt ist bislang wenig beschrieben, allerdings konnte schon 1977 von Ohkawa *et al.* [69] nachgewiesen werden, dass es nach AMI zu einer Erhöhung der GAGs im Urin kommt, was durchaus mit einer erhöhten Plasma-HA nach AMI zusammenhängen könnte. Jedoch war die Induktion und auch der Ursprung der HA bzw. der Regulator der HA-Expression bisher auch hier weitgehend unbekannt.

Basierend auf der aktuellen Literatur wäre die Erforschung möglicher HA-Induktoren interessant, da in verschiedenen Publikationen positive Effekte einer Injektion von HA-haltigen Hydrogelen ins Herzgewebe nach Infarkt beschrieben werden. Im Detail zeigten diese Arbeiten, dass solche HA-Hydrogele die Regeneration u.a. durch Effekte auf die Neovaskularisierung verbessern, die Wanddicke erhöhen und die Infarktgröße und die Apoptoseneigung des Myokardgewebes verringern [23], [24], [70]. Zusätzlich wurden HA-Gele als Träger für kardiale Stammzellen (*cardiosphere-derived cells*) benutzt. In diesem Kontext wurde die Überlebensrate der Stammzellen im Herzgewebe erhöht und im Verlauf die Herzfunktion nach AMI verbessert [71]. Des Weiteren führte die Applikation von Knochenmark-Stammzellen in einer Kombination mit HA nach AMI zu einer verminderten Apoptose von Kardiomyozyten und verbesserte die Herzfunktion verglichen zur alleinigen Injektion der Zellen bzw. der HA [72]. Diese Effekte lassen zum einen vermuten, dass ein HA-reiches Mikromillieu nach AMI durch direkte HA-vermittelte Effekte oder durch Verbesserung der Stammzell-vermittelten Regeneration kardioprotektiv ist. Darin könnte auch die physiologische Funktion der starken HA-Induktion post AMI begründet liegen.

## **4.2 IL-6-Abhängigkeit der HA-Induktion nach AMI**

Um den Ursprung der so deutlich und massiv induzierten HA nach AMI zu identifizieren, wurden verschiedene inflammatorische Zytokine detaillierter betrachtet. Es war auffällig, dass es ähnlich wie bei der HA im Plasma zu einem massiven und signifikanten Anstieg der IL-6

Plasmaspiegel nach Infarkt kam. Die Verläufe der Plasmakurven von IL-6 und HA schienen lediglich etwas zeitversetzt, die Induktion des IL-6 ging der Induktion der HA voraus. Es wurden zunächst die IL-6 und IL-6R mRNA nach Infarkt untersucht, welche beide eine deutliche Induktion im infarzierten Herzen zeigten. Hierbei war IL-6 ebenfalls sehr stark und nur von kurzer Dauer induziert, wohingegen der IL-6R eine geringere aber über einen längeren Zeitraum signifikante Induktion zeigte. Dahingegen war der lösliche IL-6R im Plasma zu Beginn nach Infarkt leicht induziert und im Verlauf nach 2 und 3 Tagen signifikant reduziert. Die Konzentration stieg ab Tag 7 wieder auf Kontroll-Niveau. Die vorübergehende Reduktion der IL-6R Plasmaspiegel ist anhand des zuvor beschriebenen IL-6 *trans-signaling* zu erklären, wobei der Rezeptor aus dem Plasma sukzessive verbraucht und sich die Konzentration im Plasma erst durch erneute limitierte Proteolyse (*shedding*) des Rezeptors von exprimierenden Zellen wieder erhöht [73].

Die signifikante Induktion der IL-6 Plasmaspiegel nach Infarkt ist eine bereits bekannte Erkenntnis, die sogar bei stark erhöhten IL-6 Spiegeln mit einem negativen Ausgang, wie erhöhter Morbidität und Mortalität, nach AMI assoziiert wird [74], [75]. Es wurde darüber hinaus bereits in anderen Krankheitsbildern gezeigt, dass es eine mögliche Assoziation von IL-6 und HA im Plasma gibt. So zeigten Nelson *et al.* 2013, dass es im Krankheitsbild des septischen Schocks zu einer Assoziation von IL-6 und HA kommt [76]. Zuvor konnten Manicourt *et al.* 1993 eine Erhöhung von TNF- $\alpha$  im Plasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis und eine damit verbundenen Induktion von IL-6 und auch HA zeigen [77]. Des Weiteren wurden erhöhte Serumspiegel von HA und IL-6 als mögliche Marker, der ebenfalls oftmals mit einer Entzündung einhergehenden Erkrankung, des Karpaltunnelsyndroms von Takasus *et al.* 1994 beschrieben [78]. In weiteren IL-6-abhängigen entzündlichen Erkrankungen ist die Involvierung von HA bisweilen relativ wenig untersucht, jedoch nicht ausgeschlossen.

Die bereits beschriebenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass es ebenfalls im entzündlichen Geschehen nach AMI einen konkreten Zusammenhang der stark induzierten IL-6 und HA Plasmaspiegel gibt.

Um den Kausalzusammenhang von IL-6 und HA nach Infarkt zu bestätigen wurde 16 h vor AMI den Mäusen ein blockierender Antikörper gegen IL-6 intraperitoneal verabreicht. Dieser Antikörper führte interessanter Weise dazu, dass zum einen die Induktion der Has1 und -2 mRNA im linken Ventrikel 12 h nach Infarkt signifikant reduziert war gegenüber Kontroll-behandelten AMI-Mäusen, zum anderen konnte die starke Induktion der HA im Plasma vollständig mittels des blockierenden Antikörpers gehemmt werden. Die HA Plasmaspiegel dieser Tiere lagen auf dem Niveau der Schein-operierten Tiere.

Schlussfolgernd lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die starke Induktion der HA nach Infarkt tatsächlich IL-6 abhängig ist und dass der starke Anstieg der HA im Plasma zumindest zum Teil direkt vom infarzierten Myokard synthetisiert zu werden scheint. Interessant wäre eine Analyse der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf weitere Krankheitsbilder, in denen eine erhöhte Konzentration von IL-6 und HA im Plasma beobachtet werden kann und die Überprüfung ob hier ebenfalls die HA z.B. mittels eines blockierenden Antikörpers gegen IL-6 gehemmt werden könnte.

### **4.3 Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf das Zellkultur-Modell mit KF**

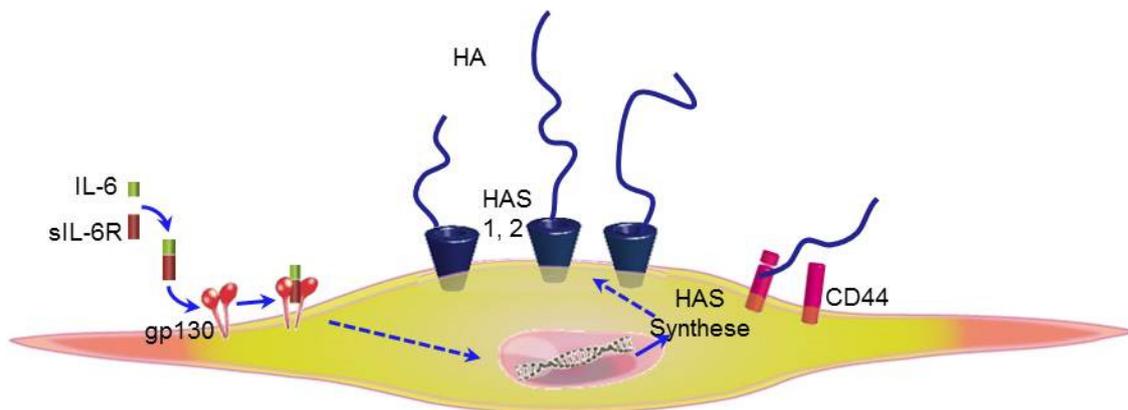
Um zu überprüfen ob die gewonnenen Erkenntnisse aus dem *in vivo* Modell auch auf ein *in vitro* Modell übertragbar sind, wurden primäre KF aus C57BL/6J Mäusen isoliert und unter verschiedenen Bedingungen die Synthese der HA bzw. die Expression der Has mRNA analysiert. Die Wahl des Zelltyps wurde dabei maßgeblich von früheren Publikationen beeinflusst, in denen KF bzw. Myofibroblasten als Hauptsynthesequelle für Matrixbestandteile beschrieben wurden [62], [79].

Die kultivierten KF wurden mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 für unterschiedliche Zeiten stimuliert, welches zunächst nur in einem Teil der Zellchargen zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Induktion der Has mRNA führte. Jedoch sprachen nicht alle Zellpräparationen auf die Stimulation mit IL-6 an. Ähnliche Erkenntnisse wurden bereits in anderen Publikationen diskutiert, so beschrieben Lafontant *et al.* 2006, dass murine KF nur auf einige wenige Vertreter der IL-6 Familie wie z.B. Onkostatin M (OSM) reagierten, jedoch nicht sensibel für die Stimulation mit IL-6 waren. Hier induzierte OSM die Synthese verschiedener inflammatorischer Zytokine. Ebenfalls wurden hier die Rezeptoren der IL-6 Familie angehörigen Zytokine analysiert und es zeigte sich keine Expression des IL-6 Rezeptors, jedoch eine deutliche Expression des OSM Rezeptors sowie von gp130. In der hier durchgeführten Analyse des IL-6R auf KF konnte allerdings gezeigt werden, dass das Expressionsmuster des IL-6R von Präparation zu Präparation unterschiedlich zu sein scheint. Einige wiesen keinen membranständigen Rezeptor auf, wogegen andere Chargen zumindest eine geringe Menge des Rezeptors exprimierten. Darin könnte auch das unterschiedliche Ansprechen der KF auf die Behandlung mit IL-6 begründet liegen. In der Studie von Lafontant *et al.* wurde jedoch die Möglichkeit des IL-6 *trans-signaling* gar nicht in Erwägung gezogen und so die Zellen schlicht als nicht responsiv für IL-6 deklariert. Da in den hier gefundenen Ergebnissen jedoch ein leichtes Ansprechen der KF auf IL-6 beobachtet werden konnte, wurde im Folgenden auch das IL-6 *trans-signaling* analysiert, welches ebenfalls einen physiologischen Mechanismus der Signaltransduktion mittels IL-6 darstellt

[80]. So konnte mittels Stimulation der Zellen mit IL-6 in Kombination mit dem löslichen IL-6R eine deutliche und signifikante Induktion der Has1 und -2 mRNA gezeigt werden. Die Has3 war hier, ebenso wie im Zeitverlauf nach Infarkt, nicht signifikant reguliert, was der IL-6-Abhängigkeit der Induktion der Has1 und -2 mRNA nach AMI weiter Gewicht verleiht.

Zusätzlich konnte in den Zellen eine vermehrte Synthese der HA, welche ins Medium der Zellen abgegeben wurde detektiert werden. Darüber hinaus kam es zu einer vermehrten Ausbildung von perizellulärer HA (siehe Abb. 50).

Anhand der gefundenen sowie der bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass KF nur in geringem Maße auf das IL-6 *classic signaling* ansprechen, was vermutlich in einer nicht ausreichende Expression des membranständigen Rezeptors begründet liegt. Die Zellen können jedoch durchaus Zielstruktur des ebenfalls beschriebenen *trans-signaling* sein.



**Abbildung 50. Aktivierung der Synthese der Has Isoenzyme in kardialen Fibroblasten mittels IL-6 *trans-signaling*.**

Aktivierung des Rezeptors gp130 durch IL-6 und sIL-6R führt zur vermehrten mRNA Expression der Has1 und -2 verbunden mit einer erhöhten HA-Syntheseleistung der Zellen.

#### 4.3.1 Signaltransduktionsweg in KF

Zur Analyse der an der induzierten Has mRNA Expression beteiligten Signalwege wurden die bereits bekannten intrazellulären Wege über Aktivierung des JAK/STAT-, des PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B- und des Ras/Raf/MEK/ERK-Weges näher untersucht [29], [40]). Analog zu bereits beschriebenen, durch Zytokine der IL-6 Familie-vermittelten Mechanismen in Primärzellen aus Herzgewebe, war auch hier der JAK/STAT-Signalweg der dominante [81] (Abb. 51). Die Signaltransduktion über den PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B- und den Ras/Raf/MEK/ERK-Weg schien nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Auswirkungen der Hemmung der beiden Wege durch unterschiedliche Inhibitoren nur einen geringen Effekt auf die Has

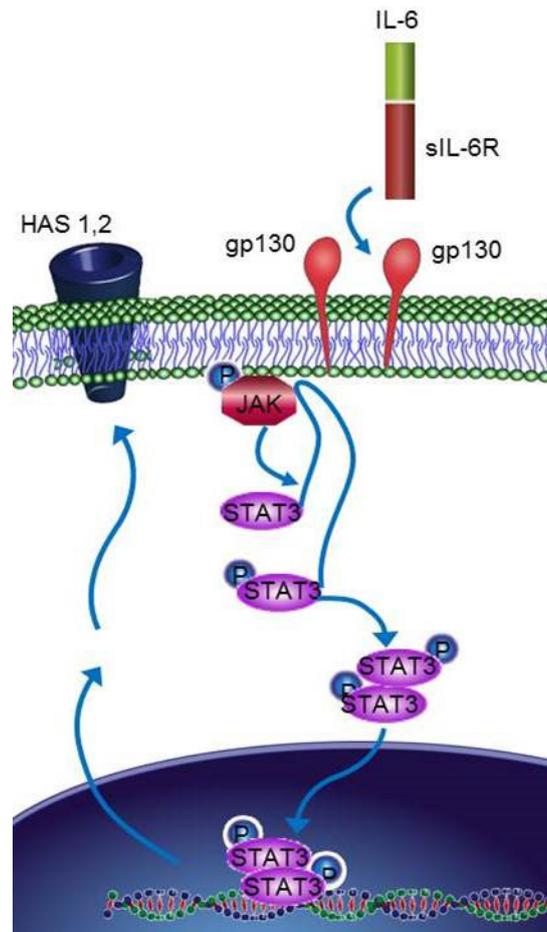
mRNA Expression hatte. Jedoch führte die Hemmung des JAK/STAT-Weges durch AG490 zu einer signifikanten, scheinbar kompletten Inhibition der Expression der Has Isoenzyme.

Die Promotorsequenzen der murinen Has Isoenzyme sind bislang nur zum Teil beschrieben [82], [10]. Analysiert man jedoch diese bzw. die putativen Promotorsequenz 1000 Basenpaare oberhalb des Start-Codons zur Gentranskription mit einem System zur Erkennung von Bindestellen für regulatorische Elemente [83], so stellt man fest, dass mögliche Bindestellen für STAT3 vorhanden sind. Vor allem die Has1 und -2 weisen hier jeweils potenzielle STAT3-Bindestellen auf, was die Vermutung der STAT3-vermittelten Induktion der Has Isoenzyme in den KF weiter stützt (Daten nicht gezeigt). Um diese möglichen Bindesequenzen weiter zu belegen Bedarf es hier einer Chromatin-Immunopräzipitationsanalyse (ChIP), die eine Bindung von Promotoren an die entsprechenden Genabschnitte nachweisen kann. Diese sollte in weiteren Experimenten durchgeführt werden.

Eine Publikation von Boengler *et al.* beschreibt eine kardioprotektive Rolle der STAT3-vermittelten intrazellulären Signale in der Prä- und Postkonditionierung des ischämischen Herzens. STAT3 bzw. der gp130 Rezeptor werden als mögliche Zielstrukturen für eine Verbesserung der Funktion des Herzens bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben, jedoch ist dies noch recht unstimmgig [84].

Hilfiker-Kleiner *et al.* beschrieben 2010, dass eine verlängerte Aktivierung der gp130-vermittelten STAT3-Phosphorylierung zu einer verstärkten Inflammation, einer erheblichen Verschlechterung der Herzfunktion sowie einer Erhöhung der Mortalitätsrate in Mäusen nach AMI führte. Zuvor konnte aber 2004 von derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein Kardiomyozyten-spezifischer *Knock out* von STAT3 nach Infarkt zu einer erhöhten Apoptoseneigung, einer erhöhten Infarktgröße sowie einer reduzierten Herzfunktion und auch einer verschlechterten Sterblichkeit der Tiere führte [49]. Beide Publikationen deuten darauf hin, dass die Aktivierung von STAT3 und die damit verbundene Signaltransduktion nach Infarkt von großer Bedeutung sind, jedoch nicht allein positive oder negative Auswirkungen auf das Herz haben. Eine ausgewogene Aktivierung von STAT3 ist hier von besonderer Wichtigkeit für die Vermittlung der inflammatorischen Antwort und damit verbundener Prozesse wie z.B. dem Umbau der Herzstruktur.

Dies macht deutlich welche wichtige Rolle STAT3 im Geschehen nach Infarkt einnimmt und auch die JAK/STAT-vermittelte Induktion der Has mRNA Expression sowie die vermehrte HA Synthese einnehmen könnten.



**Abbildung 51. Signaltransduktionsweg zur Induktion der Has mRNA in KF.**

Durch die Stimulation der Zellen mit IL-6 und sIL-6R kommt es zur Aktivierung von gp130 welches die Janus Kniase (JAK) stimuliert und diese führt wiederum zur Phosphorylierung von STAT Molekülen insbesondere STAT3. STAT3 bildet Dimere, welche in den Zellkern translozieren und zur Aktivierung der Gentranskription führen können.

Modifiziert nach [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6\\_Pathway](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway).

#### **4.4 Aktivierung eines Myofibroblasten-Phänotyps in KF durch IL-6 trans-signaling**

Neben der vermehrten Synthese von HA konnte nach 48-stündiger Stimulation der KF mit IL-6 und sIL-6R auch eine signifikant erhöhte Induktion der Acta2 mRNA detektiert werden und eine damit verbundenen vermehrten Bildung von  $\alpha$ SMA in den Zellen. Diese Beobachtung erzielten Meléndez *et al.* 2010 bereits bei der Stimulation von KF aus Ratten mit IL-6 und sIL-6R. Hier wurde IL-6 im Rahmen der Erkrankung der Herzhypertrophie untersucht und als Mediator des Wechsels von Fibroblasten- zu Myofibroblasten-Phänotyp identifiziert. Zudem wurde auch eine erhöhte Synthese von Kollagen in den KF beobachtet [85]. Die beschriebenen Erkenntnisse zeigen sich ebenfalls in den KF der adulten Mausherzen. Da hier jedoch ein konkreter Zusammenhang zwischen der vermehrten HA-Synthese und dem Wechsel zum Myofibroblasten-Phänotyp vermutet wurde, wurden die Zellen vor der IL-6-Stimulation mit 4-MU, einem Inhibitor der Has Isoenzyme, behandelt. Es konnte in der Tat

eine Reduktion der induzierten Acta2 mRNA sowie eine verminderte Expression von  $\alpha$ SMA in den Zellen beobachtet werden. Die Abhängigkeit des Myofibroblasten-Phänotyps von der Produktion von HA in Fibroblasten konnte bereits zuvor von Meran *et al.* 2007 [86] und auch Webber *et al.* 2009 [87] jeweils in Abhängigkeit von TGF $\beta$ -Stimulation gezeigt werden.

Neu an der hier gewonnenen Erkenntnis ist somit die Verbindung zwischen des IL-6-induzierten Myofibroblasten-Phänotyps und der erhöhten Synthese von HA in KF.

Des Weiteren wurden die migratorischen und proliferativen Eigenschaften der KF nach IL-6-Stimulation analysiert. Es zeigte sich, dass IL-6 zu einer Inhibition der Proliferation der KF führte, welche jedoch durch die Zugabe von Serum wieder aufgehoben werden konnte. Ebenfalls konnte kein positiver Effekt auf die Migration gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle durch IL-6 beobachtet werden. Diese Eigenschaften sind eher ungewöhnlich für eine vermehrte Expression von HA in den Zellen, da diese oftmals positive Effekte auf Migration und Proliferation hat [65], [66]. Es konnte jedoch von Moodley *et al.* 2003 bereits in Lungenfibroblasten gezeigt werden, dass die Stimulation mit IL-6 zu einer Inhibition der Proliferation der Zellen führte. In den hier analysierten aktivierten KF lag die Vermutung nahe, dass die HA andere Funktionen während des Umbaus des Myokards nach Infarkt übernimmt.

#### **4.5 IL-6- und HA-abhängige Synthese pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine *in vitro* und *in vivo***

IL-6 ist maßgeblich am inflammatorischen Geschehen nach Infarkt beteiligt und für HA ist ebenfalls eine pro-inflammatorische Funktion, abhängig vom Molekulargewicht, beschrieben [88], [89]. Aufgrund dessen wurden in dieser Studie verschiedener pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine, die von KF nach 24-stündiger IL-6 *trans-signaling* Stimulation synthetisiert wurden, mittels einer Multiplex Analyse untersucht. Tatsächlich konnte eine signifikante Induktion von CXCL1, CSF3 und MCP1 und des Weiteren ein deutlicher Trend der Induktion von TNF $\alpha$ , CCL5, CSF2, IL-13 und IL-5 detektiert werden. Die induzierten Zyto- und Chemokine wurden ebenfalls auf mRNA Ebene analysiert und es zeigte sich eine signifikante Induktion von Csf3, Csf2, Ccl5, Ccl2, Cxcl1 und Tnfa in den KF nach 6 oder 9 h. Die inflammatorischen Zyto- und Chemokine sind allesamt an der Rekrutierung von Neutrophilen sowie mononukleären Zellen zum Ort des inflammatorischen Geschehens beteiligt [90], [4], [91].

CSF2 und -3 führen zum einen zur Differenzierung von Knochenmarks-Vorläuferzellen in Granulozyten und Makrophagen, stimulieren deren Überleben und sind zugleich eine chemotaktische Hilfe für reife Neutrophile, um diese zum Inflammationsherd zu leiten [92], [93]. CCL5 und MCP1 spielen ebenfalls eine aktive Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten

sowie in der Aktivierung von Killerzellen [94]. TNF $\alpha$  bewirkt neben den rekrutierenden Eigenschaften unter anderem eine Adhäsion von Neutrophilen an Myozyten im Herzen nach Infarkt [95]. CXCL1 hat wiederum neben seiner Effekte auf Wundheilung, Tumorentstehung und Angiogenese ebenfalls vor allem chemotaktische Effekte auf Neutrophile [96].

Da hier vermutet wurde, dass die Sekretion der pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokine in direktem Zusammenhang mit der HA-Synthese in den KF nach Stimulation stehen, wurden ebenfalls KF von CD44<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert, mit IL-6 und sIL-6R stimuliert und analysiert. CD44 als Hauptrezeptor für die HA-vermittelte Signaltransduktion [13] sollte hier als Angriffsstruktur für HA in der Zytokin-Induktion in KF analysiert werden. Nach 6-stündiger Stimulation der CD44<sup>-/-</sup> KF im Vergleich zu den WT KF zeigte sich, dass die mRNA von Csf3, Ccl5, Ccl2 und Tnfa tatsächlich nicht mehr signifikant induziert bzw. signifikant reduziert gegenüber WT KF waren. Diese Ergebnisse belegen, dass die Induktion der für die Rekrutierung der Immunzellen notwendigen Zyto- und Chemokine *in vitro* zumindest zum Teil HA-abhängig ist und über den Rezeptor CD44 vermittelt wird. Die Rolle der HA war im Kontext der Zytokin-Induktion nach Infarkt bislang völlig unbekannt, so dass mit diesen Erkenntnissen eine neue Funktion der HA im inflammatorischen Geschehen nach Infarkt aufgedeckt wurde. Auch hier stellt die HA für die Beeinflussung der inflammatorischen Phase nach AMI eine denkbare Zielstruktur dar.

Um zu zeigen, dass die durch IL-6 und sIL-6R-Stimulation *in vitro* induzierten Zyto- und Chemokine auch im post-Infarkt Geschehen *in vivo* eine Abhängigkeit zum IL-6 aufweisen, wurden die sechs induzierten Kandidaten aus den Zellkultur-Versuchen ebenfalls in den infarzierten linken Ventrikeln der anti-IL-6 Antikörper- bzw. Kontroll-behandelten Mäuse 12 h nach Infarkt analysiert.

Es konnte auch hier gezeigt werden, dass die mRNA Induktion der Zytokine (abgesehen von Ccl2) entweder nicht mehr signifikant induziert oder aber signifikant reduziert gegenüber den Kontroll-behandelten AMI-Tieren war. Diese Erkenntnis belegt, dass die Induktion *in vivo* ebenfalls IL-6-abhängig ist. Jedoch bleibt offen, in welchem Zusammenhang diese Erkenntnisse zu HA stehen.

Da hier nicht nur die mRNA der KF analysiert wurde, sondern die des gesamten infarzierten linken Ventrikels, sind Abweichungen in der Expression der mRNA der Zytokine vor allem durch die Vielzahl an verschiedenen Zellen zu begründen, die im Herzen vorliegen. Vor allem Ccl2 wird nicht allein durch Fibroblasten oder Myozyten produziert, ein Großteil stammt auch aus infiltrierenden Immunzellen, wie z.B. frühen Makrophagen, die nach Infarkt einwandern [97]. So ist die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf das *in vivo* Modell des AMI nur begrenzt möglich. Umso interessanter ist es, dass die sehr starke mRNA Induktion von Csf3, Csf2 und Cxcl1 mittels des Antikörpers auf ein Drittel reduziert werden konnte. Die

Expression von Ccl5 war dahingegen nur sehr gering, was eventuell auch auf den Zeitpunkt der Analyse nach Infarkt zurückzuführen sein kann. In einer anderen Publikation konnte gezeigt werden, dass CCL5 zwar nach Infarkt im Serum von Patienten anstieg, jedoch nur gering im infarzierten Gewebe exprimiert wurde. Auch dieses könnte die geringe Expression an Ccl5 mRNA erklären [98].

Da das Hauptaugenmerk der Analyse aber auf der Abhängigkeit dieser Ergebnisse von HA und der damit verbundenen Infiltration von Immunzellen im Infarktgewebe liegt, war es notwendig, die Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt nach Infarkt zu analysieren, um den Punkt der stärksten Infiltration von Makrophagen und zeitgleich auch noch Neutrophile erfassen zu können [61]. So wurde ein Zeitpunkt von 72 h nach Infarkt für die Analyse der Immunzellen gewählt. Da jedoch keine Erfahrung zu der Halbwertszeit des anti-IL-6 Antikörpers oder aber einer mehrfachen Applikation des Antikörpers vorlagen und somit keine längerfristige Hemmung der HA mit der einmaligen Applikation des anti-IL-6 Antikörpers gewährleistet werden konnte, wurde sich zur weiteren Analyse eines anderen Tiermodells bedient. Um eine ausreichende Hemmung der HA zu erzielen, wurden C57BL/6J Mäuse bereits sieben Tage vor AMI und über die Gesamtdauer der Beobachtung hinaus oral mit 4-MU behandelt. Diese Behandlung war in der Literatur etabliert und zeigte zuvor eine ausreichende Hemmung der HA *in vivo* [99].

Neben der Analyse der infiltrierten Zellen wurde ebenfalls die mRNA Expression im infarzierten Ventrikel gemessen. Hier zeigten sich allerdings Unterschiede im Vergleich zu den 12 h nach Infarkt analysierten Ventrikeln. Allgemein war die Zyto- und Chemokin mRNA Expression viel geringer als zu dem früheren Zeitpunkt, mit Ausnahme von Ccl2. Csf3 zeigte keine signifikante Induktion mehr und Csf2, Cxcl1 und auch Tnf $\alpha$  zeigten zumindest zu diesem Zeitpunkt keine Abhängigkeit von HA. Anders war dies jedoch bei Ccl5 und auch Ccl2. Diese beiden Chemokine wurden durch die 4-MU Behandlung gegenüber den Vehikel-behandelten Tieren nach Infarkt reduziert, so dass zumindest diese beiden auch zu dem Zeitpunkt 72 h nach AMI abhängig von der HA Synthese waren. Die Interleukin-abhängige Regulation pro-inflammatorischer Zytokine und eine damit verbundene erhöhte Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen wird in der Literatur mehrfach beschrieben [100], [101]. Der Einfluss der HA auf dieses Geschehen und auch die Regulation der Zytokine ist in diesem Zusammenhang eine neue Erkenntnis.

Zuvor konnte 2012 von Montecucco *et al.* gezeigt werden, dass vor allem CCL5 eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Neutophilen und Makrophagen spielt und dass die Inhibition mittels eines neutralisierenden Antikörpers zugleich zu einer reduzierten Infarktgröße führte [102]. Dewald *et al.* beschrieben 2005, dass der *knock out* von CCL2 in Mäusen zu einer verzögerten Einwanderung von Makrophagen in das infarzierte Herzgewebe führte. Auch hier war die Zahl der Myofibroblasten im Infarktgewebe deutlich

reduziert. Dies bekräftigt ebenfalls die Vermutung, dass HA einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatorische Phase und ebenfalls die Aktivierung und Einwanderung der Myofibroblasten nach Infarkt hat.

Interessanterweise belegen zwei Publikationen von Proudfoot *et al.* 2003 [103] und Lau *et al.* 2004 [104], dass Glykosaminoglykane von großer Bedeutung für die *in vivo* Funktionalität der immunmodulierenden Chemokine Ccl2, Ccl4 und Ccl5 sind. Hier wurde unter anderem gezeigt, dass eine Mutation der GAG-Bindestellen der Chemokine, wodurch die Bindung dieser Chemokine an GAGs beeinträchtigt ist, die Rekrutierung von Leukozyten verhindert. *In vitro* waren die Zytokine dennoch in der Lage die entsprechenden Rezeptoren auf den Effektorzellen zu aktivieren. Die Frage ob die GAGs in diesem Fall auch an der Induktion der Chemokine beteiligt sein könnten wurde hier allerdings nicht adressiert.

Um die unterschiedlichen Behandlungsmethoden von anti-IL-6 Antikörper und 4-MU Behandlung tatsächlich miteinander vergleichen zu können, fehlt hier eine Gruppe von 4-MU behandelten AMI-Tieren zum Zeitpunkt 12 h nach AMI. Diese wäre dringend in einem weiteren Experiment zu analysieren.

Neben der signifikanten Reduktion der Ccl5 und Ccl2 mRNA Expression nach 4-MU Behandlung konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Acta2 mRNA Expression gezeigt werden. Diese Erkenntnis bekräftigt die bereits *in vitro* gezeigte verminderte Aktivierung des Myofibroblasten-Phänotyps nach Hemmung der Has Isoenzyme [105]. *In vivo* konnte dies allerdings zuvor noch nicht gezeigt werden.

#### **4.6 Auswirkung der Hemmung der HA auf die inflammatorische Reaktion *in vivo***

Die Hemmung der HA nach Infarkt durch vorherige 4-MU-Behandlung konnte *in vivo* anhand einer histochemischen HA-Färbung gezeigt werden. Hier war deutlich ersichtlich, dass durch 4-MU-Behandlung die HA-Akkumulation in der Infarkt-Randzone 72 h nach AMI reduziert war im Vergleich zu den Vehikel-behandelten AMI-Tieren. Die Induktion der HA im Gewebe wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben [20], [106], jedoch war die Funktion der frühen Induktion der HA weitgehend unbekannt und es wurde bislang kein Zusammenhang mit der Entzündungsantwort nach Infarkt beschrieben bzw. analysiert.

In Kontroll-behandelten AMI-Mäusen konnte neben der vermehrten Induktion der HA 72 h nach AMI beobachtet werden, dass in den Bereichen in denen die HA akkumulierte auch die Infiltration des Gewebes mit Makrophagen erhöht war. In der höheren Vergrößerung der Doppel-Färbung von HA und MAC2 wurde ersichtlich, dass hier vermutlich eine Ko-Lokalisierung der HA und der Makrophagen vorlag.

Wilkinson *et al.* [107] zeigten 2006, dass Überexpression von Has1 in glatten Muskelzellen zu einer vermehrten Anlagerung von Monozyten an die Zellen bzw. an die von den Zellen gebildeten HA-Stränge führte. Bei der Überexpression der Has2 konnte dies in abgeschwächter Form beobachtet werden, die Überexpression der Has3 hatte keinen Effekt. Eine ähnliche Erkenntnis konnte von Grandoch *et al.* 2013 [67] beobachtet werden. Hier wurden glatte Muskelzellen mit einem Adenosinrezeptor-Agonisten behandelt, was eine vermehrte Synthese der Has1 und eine erhöhte Bindung von Monozyten an die HA-Stränge dieser Zellen zur Folge hatte. Diese in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse lassen rückschließen, dass es auch im Falle der Aktivierung der Myofibroblasten nach Infarkt durch IL-6 und die vermehrte Synthese von HA im infarzierten Gewebe zur Anhaftung der Monozyten bzw. Makrophagen an HA-reiche Matrix kommt. Auch nach AMI sind vermutlich vor allem die Has1 und die Has2 an der vermehrten Synthese der HA beteiligt. Es fehlt hier ein *in vitro* Experiment, um den Zusammenhang konkret zu belegen. Nach Stimulation der Zellen mit IL-6 und sIL-6R könnte zum Beispiel mittels eines Monozyten-Adhäsions-Assays die Anlagerung der Monozyten an die gebildeten HA-Stränge untersucht werden.

Die Analyse der Makrophagen erfolgte zum einen anhand der Färbung für MAC2 und deren Quantifizierung und zum anderen mittels Durchflusszytometrie. In beiden Analysen konnte ein sehr ähnliches Ergebnis erzielt werden, welches zeigte, dass durch Behandlung der Tiere mit 4-MU deutlich weniger Makrophagen im Herzgewebe nachzuweisen waren als in den Kontroll-behandelten Tiere. Die Analyse des Apex mittels Durchflusszytometrie (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) war hierbei jedoch methodisch erschwert, bedingt durch die geringe Menge an verwendetem Gewebe. Hier wurde lediglich die Herspitze analysiert, welche komplett infarziert war und deshalb auch nur wenig lebende Zellen und auch entsprechend wenig Immunzellen nach Infarkt aufwies. Anhand der MAC2 Färbung konnten sich diese Ereignisse jedoch bestätigen lassen, da hier im Querschnitt des Herzens auch das Randgebiet des Infarktes gesondert analysiert werden konnte. Für weitere Analysen des Herzgewebes mit der Methode der Durchflusszytometrie sollte über die Verwendung ganzer infarzierter Herzen nachgedacht werden, um eine höhere Menge an Zellen in die Analyse einschließen und ebenfalls das stark infiltrierte Randgebiet des Infarkts in die Analyse miteinbeziehen zu können.

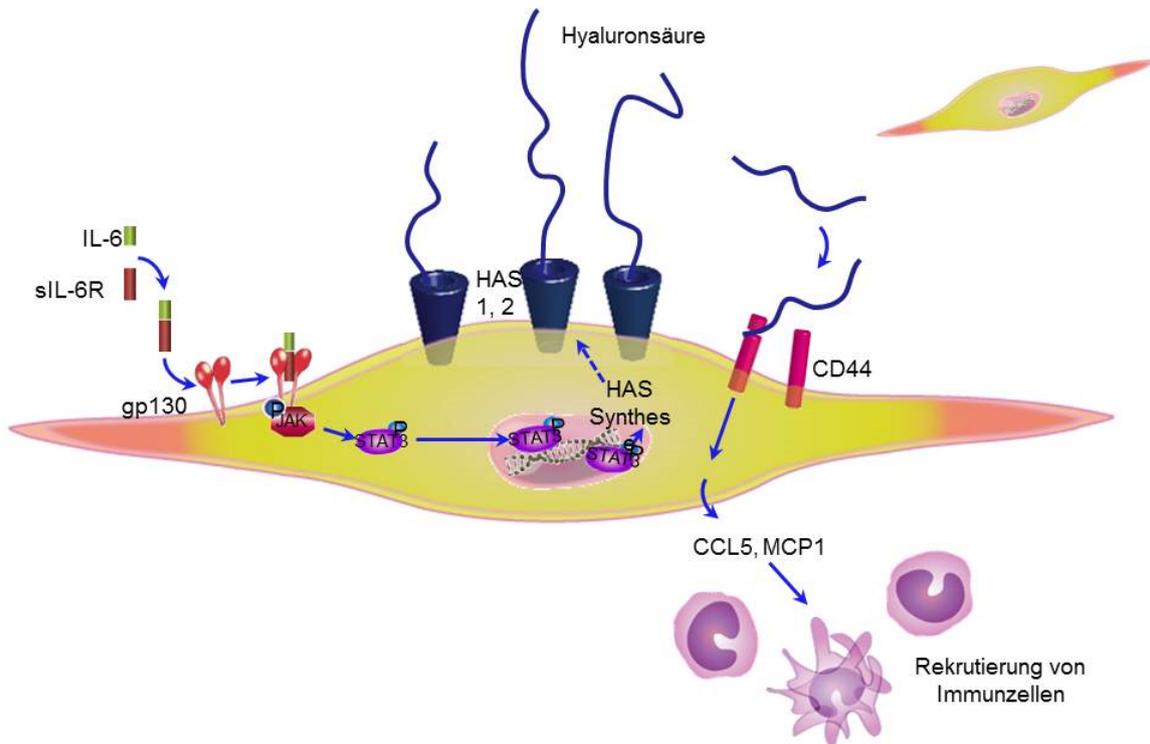
Neben der Makrophagen-Einwanderung nach Infarkt, die zum Zeitpunkt 72 h in etwa ihr Maximum erfährt, wurde zu diesem Zeitpunkt auch die Infiltration des Gewebes mit Neutrophilen analysiert. Die stärkste Einwanderung der Neutrophilen ist gewöhnlich bereits nach 24 h zu verzeichnen. Nichts desto trotz kann auch nach 72 h eine signifikante Zell-Einwanderung im infarzierten Herzen beobachtet werden, so dass sich dieser Zeitpunkt ebenfalls für diese Analyse eignete [61].

Bei den Neutrophilen wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei den Makrophagen beobachtet. Auch hier nahm die Infiltration des Gewebes mit Zellen nach 4-MU-Behandlung signifikant ab gegenüber Kontroll-behandelten AMI-Tieren. Die Färbung erfolgte mittels Aktivierung eines Naphthol-Diazoniumsalz Komplexes durch eine spezifische Esterase der Neutrophilen und konnte auch tendenziell anhand der Durchflußzytometrie-Analyse (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) der Herzspitze belegt werden. Hier gilt allerdings dieselbe Limitierung wie für die Analyse der Makrophagen.

Über die Infiltration des Herzgewebes mit Entzündungszellen hinaus wurde auch das Verhältnis an Entzündungszellen im Blut bestimmt um ausschließen zu können, dass 4-MU bereits einen Einfluss auf die zirkulierende Entzündungszellpopulationen hatte. Es zeigte sich nach Infarkt lediglich eine signifikante Reduktion der Anzahl der Plättchen in beiden Behandlungsgruppen was bereits 1985 von Fagher *et al.* gezeigt werden konnte [108]. Das Differenzialblutbild der Leukozyten wies zwar geringe Unterschiede in der Anzahl der Lymphozyten und der Granulozyten in den Behandlungsgruppen nach AMI auf, jedoch waren diese nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition der HA *in vivo* neben einer verminderten Expression der Chemokine Ccl2 und Ccl5 ebenfalls zu einer verminderten Infiltration des infarzierten Gewebes mit Neutrophilen und Makrophagen führt.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die oben beschriebenen Ergebnisse von Proudfoot *et al.* [103] und Lau *et al.* [104] wieder aufzunehmen und zu analysieren, ob in dem dort beschriebenen Modell eine Hemmung der GAGs insbesondere der HA ebenfalls zu einer verminderten Aktivität bzw. Synthese der Chemokine Ccl2, Ccl4 und Ccl5 geführt hätte. Darüber hinaus könnte man prüfen, ob die GAGs womöglich selbst zur Induktion der Chemokine geführt haben. Dadurch könnten sich die gewonnen Erkenntnisse zusammenfügen und HA in diesem Fall als wichtiges GAG identifiziert werden, welches für die Aktivierung der Expression von Ccl2 und Ccl5 verantwortlich ist und möglicherweise diese aktiv bindet und es dadurch zur Rekrutierung der Leukozyten kommt. Diese Theorie würde die Erkenntnisse aus den beiden Publikationen weiter stützen.



**Abbildung 52. Zusammenfassende schematische Darstellung der Immunzellrekrutierung in KF.** Die IL-6 und sIL-6 stimulierten KF zeigten vermittelt über die Aktivierung von STAT3 eine vermehrte Expression der Has1 und -2 und ebenfalls eine vermehrte Sekretion von HA. Diese kann wiederum direkt an CD44 binden und dort eine weitere Signalkaskade auslösen. Durch die Stimulation des CD44 Rezeptors kommt es zur Verstärkung der IL-6-vermittelten Induktion verschiedener pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine, deren Sekretion nötig ist um Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile zu rekrutieren.

#### 4.7 Bewertung der Funktionsanalyse mittels Echokardiographie

Um die Auswirkungen der verringerten inflammatorischen Reaktion durch die Behandlung mit 4-MU auf die Herzfunktion zu untersuchen, wurde zunächst basal vor der Ischämie und ebenfalls 72 h nach OP eine Echoanalyse durchgeführt. Als wichtigster Parameter wurde hier die Ejektionsfraktion gewertet, die ein Maß für die Auswurfleistung des Herzens ist und angibt, wie viel Blut prozentual aus dem Herzen ausgeworfen wird. Im Gegensatz zum reinen Schlagvolumen wird das Volumen des Herzens in der Enddiastole miteinbezogen, welches ein Maß für die Dilatation des Herzens darstellt.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Differenz der Ejektionsfraktion der 4-MU-behandelten Tiere deutlich stärker als die der Kontroll-behandelten Tiere war. Beide Gruppe wiesen eine verschlechterte Ejektionsfraktion gegenüber den Schein-operierten Tieren auf, die 4-MU-behandelten Mäuse waren jedoch im Vergleich zu den Vehikel-behandelten nochmals deutlich schlechter in der Funktion. Bestätigen ließ sich dies ebenfalls im deutlich erhöhten endsystolischen sowie enddiastolischen Volumen der Herzen der 4-MU-behandelten Tiere.

Folglich waren auch das Schlagvolumen sowie das Herzzeitvolumen in diesen Tieren gegenüber den Kontroll-behandelten Tieren reduziert.

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Studien in denen eine Hemmung von CCL5 [102] bzw. der genetische *knock out* von CCL2 [109] zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort nach Infarkt führte, konnte in den Publikationen jedoch im Gegensatz zu den hier gewonnen Erkenntnissen eine Verbesserung der Herzfunktion beobachtet werden.

Bei den mit CCL5-Antikörper behandelten Tieren konnte bereits einen Tag nach Ischämie ein Trend einer verbesserten Ejektionsfraktion gezeigt werden, der nach 21 Tagen signifikant war. Die CCL2-*knock out* Mäusen wiesen wiederum eine Woche nach Infarkt einen reduzierten linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser auf, der eine geringere Dilatation des Herzens widerspiegelte.

Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass es zwar durch die Hemmung der HA *in vivo* zu einer reduzierten Entzündungsreaktion nach Infarkt kommt, diese sich aber nicht positiv auf den Umbau und die Funktion des Herzens auswirkt. Die transiente Induktion der HA im post-Infarkt Geschehen scheint für verschiedene Prozesse unter anderem die inflammatorische Phase eine wichtige Rolle zu spielen.

Interessant wäre hier jedoch noch die Analyse der Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt nach Infarkt, an dem der Umbau des Gewebes abgeschlossen ist, um zu sehen welche Folgen die frühe Hemmung der HA und der Entzündungsreaktion für den chronischen Verlauf hätte.

#### **4.8 Ausblick**

Der hier gezeigte Einfluss von IL-6 auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix *in vitro* und *in vivo* bietet neue Einblicke in das post-Infarkt Geschehen und den Umbau des Herzgewebes. HA wird als wichtige Struktur bei der inflammatorischen Reaktion nach AMI beschrieben und gewinnt dadurch an Bedeutung.

Die Hemmung der HA *in vivo* mittels 4-MU zeigt keinen Erfolg das Geschehen nach Infarkt günstig zu beeinflussen. Diese Erkenntnis lässt im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Studien mit der HA-Hydrogel-Injektion vermuten, dass eine Induktion der endogenen HA nach Infarkt potentiell positive Auswirkungen haben könnte. Um letztlich sagen zu können, ob die endogene HA nach Infarkt gut oder schlecht für die Herzfunktion ist, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, die eventuell auch die Möglichkeit einer sequenziellen Hemmung der HA mit einbeziehen. Es könnte eventuell positive Effekte haben, die HA in der sehr frühen Phase nach AMI zu hemmen, da dies die Entzündungsreaktion limitieren könnte und im weiteren Verlauf nach Infarkt die HA Expression zu induzieren um den Gewebeumbau positiv zu beeinflussen. Wichtig wäre hier

vor allem die Identifizierung und Analyse potenzieller HA-Induktoren als Alternative zur Injektion von HA-Gelen ins infarzierte Herz.

Eine dauerhafte Hemmung der HA erscheint allgemein für das Herz als nicht sinnvoll, da in früheren Publikationen durch z.B. den HAS2 *knock out* gezeigt werden konnte, dass dieser aufgrund von Malformationen des Herzens embryonal letal ist. Darüber hinaus zeigen erste unveröffentlichte Versuche unserer Arbeitsgruppe an HAS2 *knock out* Mäusen, bei denen die genetische Deletion erst im adulten Stadium induziert wurde, dass die Tiere eine stark beeinträchtigte Herzfunktion im chronischen Verlauf nach Infarkt aufweisen, was auf eine protektive Rolle der transienten Induktion der HAS2 nach Infarkt hinweist.

Als klinische Perspektive könnte anhand von HA-Plasmapdaten im Zusammenhang mit IL-6 unter Umständen eine Prognose über die schwere und den möglichen Ausgang der Erkrankung gemacht werden.

#### **4.9 Limitierung**

Die hier gezeigten Experimente beschränken sich allein auf das Tiermodell des akuten Myokardinfarkts bzw. auf aus Tieren isolierte Zellen.

Generell gilt für ein Tiermodell, dass es nur eine artifizielle Darstellung des Krankheitsbildes wiedergibt und daher in seiner Aussagekraft begrenzt ist. Andererseits kann nur im Tiermodell ein solch erhebliches Krankheitsbild vorsätzlich erzeugt und reproduzierbar dargestellt werden. Hierbei muss der Nutzen der gewonnen Erkenntnisse stets gegen die Belastung und die Aussagekraft des Tiermodells abgewogen werden.

Ein nächster Schritt bestünde in der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an kardialen Fibroblasten aus humanem Gewebe. Des Weiteren könnte man die Plasmaspiegel von Patienten mit stattgehabtem AMI analysieren und hier eine direkte Korrelation der IL-6- und der HA-Konzentration untersuchen.

Zur vollständigen Analyse des Geschehen nach Infarkt an mit 4-MU behandelten Tieren müssen weitere Zeitpunkte analysiert werden, darunter ein früher Zeitpunkt von 12 - 24 h und vor allem die Langzeitauswirkungen 21 - 28 Tagen nach AMI. Nur dadurch lässt sich die Relevanz der HA im Umbau der extrazellulären Matrix zu den verschiedenen Zeitpunkten genau determinieren.

Da hier vermutet wird, dass HA in der frühen inflammatorischen Phase nach Infarkt eine protektive Rolle spielt wäre es ebenfalls sinnvoll, geeignete Induktoren der HA nach Infarkt zu analysieren oder aber auch gleichzeitig den Abbau der HA zu hemmen. Hier fehlt es allerdings noch an geeigneten Substanzen. IL-6 würde sich hierzu vermutlich nicht eignen, da bekannt ist, dass stark erhöhte IL-6 Plasmaspiegel mit einem negativen Ausgang nach Infarkt assoziiert sind.

## 5 Zusammenfassung

Akuter Myokardinfarkt (AMI) ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland und der westlichen Welt. Es fehlen Behandlungsmöglichkeiten, die ein frühes Eingreifen in die inflammatorische Reaktion sowie den Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) nach AMI ermöglichen, um dadurch Einfluss auf Dilatation, Hypertrophie und Funktionserhaltung nehmen zu können.

Es ist bekannt, dass es nach AMI zu einer starken Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) kommt, welches die Entzündungsantwort bestimmt. Hohe IL-6 Spiegel sind oftmals mit einem negativen Ausgang der Erkrankung verbunden.

In dem Zusammenhang wenig untersucht ist das EZM Molekül Hyaluronsäure (HA), welches nach Infarkt vermehrt im Herzen zu finden ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von HA bei dem Umbau des Herzens nach Infarkt näher zu analysieren und potenzielle Induktoren zu identifizieren.

Es konnte hier im Tiermodell gezeigt werden, dass es bereits früh nach AMI (12 h – 3 d) zu einem vermehrten Vorkommen von HA im Gewebe und im Plasma verbunden mit einer signifikanten Induktion der Has1 und -2 mRNA im infarzierten Myokard kam. Die Induktion von HA und der Has Isoenzyme konnte mittels eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-6 signifikant inhibiert werden. Weiter konnte in einem *in vitro* Modell an isolierten kardialen Fibroblasten (KF) gezeigt werden, dass diese vermittelt über die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges mit einer stark erhöhten Expression der Has1 und -2 mRNA sowie einer vermehrten Sekretion von HA auf die Stimulation mit IL-6 reagierten. Des Weiteren zeigten die KF eine IL-6/HA-abhängige Ausbildung eines Myofibroblasten-Phänotyps und es konnte eine vermehrte Synthese pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine wie Csf2, Csf3, Cxcl1, Ccl5, Mcp1 und Tnfa beobachtet werden, die im Falle von Csf3, Ccl5, Mcp1 und Tnfa abhängig von der Aktivierung des HA-Rezeptors CD44 war. Um diese Erkenntnis im *in vivo* Modell zu analysieren wurden Mäuse vor AMI mit dem Has Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelt und anschließend die Expression der Zytokine analysiert. Es zeigte sich ebenfalls im infarzierten Gewebe eine verminderte Induktion der Chemokine Ccl5 und Mcp1. Darüber hinaus konnte in den 4-MU behandelten Tieren eine verringerte Infiltration des infarzierten Myokards mit Neutrophilen und Makrophagen beobachtet werden, was mit einer verschlechterten Herzfunktion, bestimmt anhand der Ejektionsfraktion, einherging.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie zeigen, dass die Induktion von IL-6 nach Infarkt die Synthese der HA stimuliert, welche wiederum den Myofibroblasten-Phänotyp und die immunmodulierenden Eigenschaften der KF beeinflusst und die Immunzell-Infiltration fördert.

HA stellt im Geschehen nach AMI somit eine protektiv wirkende Zielstruktur zur transienten Stimulation der Inflammation und Aktivierung der Myofibroblasten-Antwort dar.

## 6 Summary

Acute myocardial infarction (AMI) is still the leading cause of death in Germany and the western world. Therapeutic targets which allow an early intervention in the inflammatory reaction post AMI are missing. Detrimental remodeling post infarction leads to dilatation, hypertrophy and an impaired cardiac function, which all need to be reduced.

It is already known that the pro-inflammatory cytokine Interleukin-6 (IL-6) is highly induced after AMI and mediates the inflammatory response. Very high IL-6 plasma concentrations are often associated with a negative outcome in patients with AMI.

In this context little is known about the ECM molecule hyaluronan (HA) which is also highly expressed in the infarcted myocardium. Aim of the present study was to investigate the role of the HA-rich microenvironment post AMI and the relevant inductors.

The present study indicates that there is an increased synthesis of HA in the infarcted myocardium as well as in plasma already in the early phase post AMI (12 h – 3 d). This induction is accompanied by a significant increase in Has1 and -2 mRNA in the left infarcted ventricle. The induction could be reduced by using a neutralizing antibody against IL-6. Further it is shown that there is a similar expression pattern of Has1 and -2 mRNA in isolated cardiac fibroblasts (CF) when cells are stimulated with IL-6 and the soluble IL-6 receptor (sIL-6R). These effects are mediated via activation of JAK/STAT-pathway and lead to increased HA synthesis and the induction of a myofibroblast phenotype in CF. The stimulated cells show further increased synthesis and secretion of pro-inflammatory cyto- and chemokines like Csf2, Csf3, Cxcl1, Ccl5, Mcp1 and Tnfa. In case of Csf3, Ccl5, Mcp1 and Tnfa the IL-6 response was dependent on the HA-receptor CD44 as evidenced in CF derived from CD44<sup>-/-</sup> CF.

To transfer these findings to an in vivo model, mice are pretreated with 4-methylumbelliferone (4-MU), a HAS inhibitor. In deed a reduced expression of the pro-inflammatory chemokines Ccl5 and Mcp1 could be detected in the left infarcted ventricles of 4-MU treated animals compared to vehicle treated AMI mice. Furthermore reduced infiltration of neutrophils and macrophages in the infarcted tissue as well as in the infarct border zone is observed after 4-MU treatment. This reduced inflammatory response is accompanied by an impaired cardiac function as determined by reduced fractional shortening.

In conclusion the present study shows that the induction of IL-6 post AMI is responsible the transient induction of an HA-rich microenvironment in the early inflammatory phase post AMI. Furthermore the differentiation of CF to myofibroblasts and also the synthesis of pro-inflammatory cytokines and the recruitment of inflammatory cells is enhanced by HA/CD44-mediated signals

HA may provide a transient cardioprotective program involving transient activation of the inflammatory response and the activation of immunomodulatory myofibroblasts after AMI.

## Literaturverzeichnis

1. Kannel, W.B., *New perspectives on cardiovascular risk factors*. Am Heart J, 1987. **114**(1 Pt 2): p. 213-9.
2. Steg, P.G., et al., *ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2569-619.
3. Firth, B.G. and P.M. Dunnmon, *Left ventricular dilatation and failure post-myocardial infarction: pathophysiology and possible pharmacologic interventions*. Cardiovasc Drugs Ther, 1990. **4**(5): p. 1363-74.
4. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.
5. Remme, W.J., *Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy*. Cardiovasc Drugs Ther, 2003. **17**(4): p. 349-60.
6. Stamboul, K., et al., *Incidence and prognostic significance of silent atrial fibrillation in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2014.
7. Zhang, Y., et al., *A new anti-fibrotic drug attenuates cardiac remodeling and systolic dysfunction following experimental myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **168**(2): p. 1174-85.
8. McDevitt, C.A., *Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 1973. **32**(4): p. 364-78.
9. Hubbard, C., et al., *The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan*. J Mol Biol, 2012. **418**(1-2): p. 21-31.
10. Monslow, J., et al., *The human hyaluronan synthase genes: genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1272-83.
11. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.
12. Volpi, N., et al., *Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan*. Curr Med Chem, 2009. **16**(14): p. 1718-45.
13. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.

14. Fischer, J.W. and K. Schror, *Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 287-95.
15. Goueffic, Y., et al., *Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(2): p. 339-48.
16. Liang, J., et al., *CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2469-75.
17. Niedworok, C., et al., *The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75681.
18. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
19. Hellman, U., et al., *Parallel up-regulation of FGF-2 and hyaluronan during development of cardiac hypertrophy in rat*. Cell Tissue Res, 2008. **332**(1): p. 49-56.
20. Waldenstrom, A., et al., *Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1622-8.
21. Dobaczewski, M., et al., *Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts*. Cell and tissue research, 2006. **324**(3): p. 475-88.
22. Huebener, P., et al., *CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response*. Journal of immunology, 2008. **180**(4): p. 2625-33.
23. Yoon, S.J., et al., *Regeneration of ischemic heart using hyaluronic acid-based injectable hydrogel*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(1): p. 163-71.
24. Abdalla, S., et al., *Hyaluronic acid-based hydrogel induces neovascularization and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2013. **17**(5): p. 767-72.
25. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative*

- response following myocardial infarction*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **48**(3): p. 504-11.
26. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2357-62.
  27. Bauer, J., *Interleukin-6 and its receptor during homeostasis, inflammation, and tumor growth*. Klin Wochenschr, 1989. **67**(14): p. 697-706.
  28. Poupart, P., et al., *B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF)*. Embo j, 1987. **6**(5): p. 1219-24.
  29. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** ( Pt 2): p. 297-314.
  30. Rincon, M., *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases*. Trends Immunol, 2012. **33**(11): p. 571-7.
  31. Munoz-Canoves, P., et al., *Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?* Febs j, 2013. **280**(17): p. 4131-48.
  32. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. Int Immunol, 2010. **22**(5): p. 347-52.
  33. Alonzi, T., et al., *Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 461-8.
  34. Emery, P., et al., *IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(11): p. 1516-23.
  35. Streetz, K.L., et al., *Mediators of inflammation and acute phase response in the liver*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001. **47**(4): p. 661-73.
  36. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(2): p. 227-36.
  37. Scheller, J., et al., *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 380-7.
  38. Jones, S.A., et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. Faseb j, 2001. **15**(1): p. 43-58.
  39. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1237-47.

40. Chou, C.H., et al., *IL-6 regulates Mcl-1L expression through the JAK/PI3K/Akt/CREB signaling pathway in hepatocytes: implication of an anti-apoptotic role during liver regeneration*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66268.
41. Miyao, Y., et al., *Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1993. **126**(6): p. 1299-304.
42. Ueda, K., et al., *Decreased soluble interleukin-6 receptor in patients with acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 1): p. 908-15.
43. Lindmark, E., et al., *Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy*. Jama, 2001. **286**(17): p. 2107-13.
44. Gwechenberger, M., et al., *Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 546-51.
45. Sawa, Y., et al., *Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **116**(3): p. 511-7.
46. Kobara, M., et al., *Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 424-30.
47. Matsushita, K., et al., *Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis*. Lab Invest, 2005. **85**(10): p. 1210-23.
48. Fuchs, M., et al., *Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction*. Faseb j, 2003. **17**(14): p. 2118-20.
49. Hilfiker-Kleiner, D., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury*. Circ Res, 2004. **95**(2): p. 187-95.
50. Hilfiker-Kleiner, D., et al., *Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction*. Circulation, 2010. **122**(2): p. 145-55.
51. Bauer, S., B.J. Kerr, and P.H. Patterson, *The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 221-32.

52. Liehn, E.A., et al., *Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2415-23.
53. Wu, G., et al., *Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(2): p. H389-95.
54. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
55. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
56. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
57. Boyden, S., *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med, 1962. **115**: p. 453-66.
58. Blenkinsopp, W.K., *Effect of tritiated thymidine on cell proliferation*. J Cell Sci, 1967. **2**(3): p. 305-8.
59. Scheler, M., et al., *Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(8): p. C877-86.
60. Kong, P., et al., *Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(9): p. H1363-72.
61. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
62. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 504-11.
63. Lajiness, J.D. and S.J. Conway, *Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **70c**: p. 2-8.

64. Midgley, A.C., et al., *Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts*. J Biol Chem, 2013. **288**(21): p. 14824-38.
65. Papakonstantinou, E., et al., *A 340 kDa hyaluronic acid secreted by human vascular smooth muscle cells regulates their proliferation and migration*. Glycobiology, 1998. **8**(8): p. 821-30.
66. Andreutti, D., A. Geinoz, and G. Gabbiani, *Effect of hyaluronic acid on migration, proliferation and alpha-smooth muscle actin expression by cultured rat and human fibroblasts*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1999. **31**(2): p. 173-7.
67. Grandoch, M., et al., *Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis*. Basic Res Cardiol, 2013. **108**(2): p. 340.
68. Yang, F., et al., *Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice*. Exp Physiol, 2002. **87**(5): p. 547-55.
69. Ohkawa, S.I., et al., *Acidic glycosaminoglycans in urine, serum and myocardium of aged patients with myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1977. **9**(7): p. 541-50.
70. Fiumana, E., et al., *Localization of mesenchymal stem cells grafted with a hyaluronan-based scaffold in the infarcted heart*. J Surg Res, 2013. **179**(1): p. e21-9.
71. Chang, C.Y., et al., *Hyaluronic acid-human blood hydrogels for stem cell transplantation*. Biomaterials, 2012. **33**(32): p. 8026-33.
72. Chen, C.H., et al., *Hyaluronan enhances bone marrow cell therapy for myocardial repair after infarction*. Mol Ther, 2013. **21**(3): p. 670-9.
73. Peters, M., A.M. Muller, and S. Rose-John, *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3495-504.
74. Rattazzi, M., et al., *C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders?* J Hypertens, 2003. **21**(10): p. 1787-803.
75. Tsutamoto, T., et al., *Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of*

- interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure.* J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 391-8.
76. Nelson, A., I. Berkestedt, and M. Bodelsson, *Circulating glycosaminoglycan species in septic shock.* Acta Anaesthesiol Scand, 2014. **58**(1): p. 36-43.
77. Manicourt, D.H., et al., *Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluronan and antigenic keratan sulfate.* Arthritis Rheum, 1993. **36**(4): p. 490-9.
78. Takasu, S., et al., *Serum hyaluronic acid and interleukin-6 as possible markers of carpal tunnel syndrome in chronic hemodialysis patients.* Artif Organs, 1994. **18**(6): p. 420-4.
79. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis.* J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 631-7.
80. Chalaris, A., et al., *The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer.* Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 484-94.
81. Kunisada, K., et al., *Activation of JAK-STAT and MAP kinases by leukemia inhibitory factor through gp130 in cardiac myocytes.* Circulation, 1996. **94**(10): p. 2626-32.
82. Yamada, Y., et al., *The gene structure and promoter sequence of mouse hyaluronan synthase 1.* Biochem J, 1998. **330** ( Pt 3): p. 1223-7.
83. Deyneko, I.V., et al., *MatrixCatch--a novel tool for the recognition of composite regulatory elements in promoters.* BMC Bioinformatics, 2013. **14**: p. 241.
84. Boengler, K., et al., *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.* Pharmacol Ther, 2008. **120**(2): p. 172-85.
85. Melendez, G.C., et al., *Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats.* Hypertension, 2010. **56**(2): p. 225-31.
86. Meran, S., et al., *Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype.* J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25687-97.
87. Webber, J., et al., *Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan.* Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 148-60.
88. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling.* Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.

89. Siegelman, M.H., H.C. DeGrendele, and P. Estess, *Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(2): p. 315-21.
90. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
91. Amanzada, A., et al., *Induction of chemokines and cytokines before neutrophils and macrophage recruitment in different regions of rat liver after TAA administration*. Lab Invest, 2014. **94**(2): p. 235-47.
92. Metcalf, D., *The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors*. Science, 1985. **229**(4708): p. 16-22.
93. Hamilton, J.A. and G.P. Anderson, *GM-CSF Biology*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 225-31.
94. Maghazachi, A.A., A. Al-Aoukaty, and T.J. Schall, *CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 315-9.
95. Ikeda, U., et al., *Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines*. J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **23**(4): p. 647-52.
96. Moser, B., et al., *Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1797-802.
97. Kakio, T., et al., *Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart*. Lab Invest, 2000. **80**(7): p. 1127-36.
98. Frangogiannis, N.G., *Chemokines in ischemia and reperfusion*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 738-47.
99. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. Circulation, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
100. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
101. Turner, N.A., et al., *Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(10): p. 1450-8.

102. Montecucco, F., et al., *CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice*. Eur Heart J, 2012. **33**(15): p. 1964-74.
103. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
104. Lau, E.K., et al., *Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22294-305.
105. Webber, J., et al., *Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-beta1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype*. J Biol Chem, 2009. **284**(14): p. 9083-92.
106. Dobaczewski, M., et al., *Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts*. Cell Tissue Res, 2006. **324**(3): p. 475-88.
107. Wilkinson, T.S., et al., *Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 378-85.
108. Fagher, B., A. Sjogren, and U. Sjogren, *Platelet counts in myocardial infarction, angina pectoris and peripheral artery disease*. Acta Med Scand, 1985. **217**(1): p. 21-6.
109. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. Circ Res, 2005. **96**(8): p. 881-9.

## Originalarbeiten

Tanja Schönberger, Tobias Jürgens, Nicole Armbruster, Julia Müller, Christina Niermann, Jan Sommer, Huasong Tian, Gilbert di Paolo, Jürgen Scheller, Jens W. Fischer, Meinrad Gawaz, Margitta Elvers. Pivotal role of Phospholipase D1 in TNF- $\alpha$  mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice [*Am J Pathol, in Revision*]

Julia Müller, Simone Gorressen, Maria Grandoch, Kathrin Feldmann, Inga Kretschmer, Zhaoping Ding, Stefan Lehr, Joachim Schmitt, Jürgen Schrader, Christoph Garbers, Malte Kelm, Jürgen Scheller, Jens W. Fischer. Hyaluronan mediates interleukin-6 dependent protection after acute myocardial infarction [*eingereicht*]

## Kongressbeiträge

Müller J., Kretschmer I., Garbers C., Rose-John S., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6 trans-signaling induces hyaluronan matrix remodeling in cardiac fibroblasts. Mar 2012 *Volume 385 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Müller J., Garbers C., Ding Z., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6-dependent hyaluronan synthesis during ischemic remodeling in the heart. Feb 2013 *Volume 386 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Grandoch M., von Glinski A., Heinisch N., Müller J., Fischer J.W. Deletion of Hyaluronan synthase 3 protects from inflammatory bowel disease. Feb 2013 *Volume 386 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Müller J., Garbers C., Ding Z., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6 induces hyaluronan synthesis in the acute phase after myocardial infarction. April 2013 *Clin Res Cardiol 102, Suppl 1, V1318*

Grandoch M., von Glinski, A., Heinisch N., Müller J., Fischer J.W. Role of hyaluronan synthase 3 in inflammatory bowel disease. June 2013 *Book of Abstracts, 9<sup>th</sup> international conference on hyaluronan, Oklahoma City*

Müller J., Garbers C., Ding Z., Schrader J., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6 promotes formation of provisional hyaluronan matrix post myocardial infarction. Aug 2013 *Eur Heart J (2013) 34 (suppl 1)*

Müller J., Grandoch M., Feldmann K., Gorressen S., Kretschmer I., Lehr S., Ding Z., Schrader J., Garbers C., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6 rapidly induces hyaluronan-rich microenvironment after myocardial infarction: Implications for the immunomodulatory function of myofibroblasts. *Hyaluronan Symposium, Schloss Mickeln, 25<sup>th</sup> of January 2014, Düsseldorf*

Müller J., Grandoch M., Gorressen S., Garbers C., Ding Z., Scheller J., Schrader J., Fischer J. W. Interleukin-6 increases hyaluronan synthesis in cardiac fibroblasts which leads to an immunomodulatory myofibroblast phenotype. Feb 2014 *Volume 387 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Dick L.S., Müller J., Fischer J.W. Lack of hylauronan-synthase 3 attenuates neointimal hyperplasia after carotid artery ligation. Feb 2014 *Volume 387 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Müller J., Grandoch M., Gorressen S., Ding Z., Garbers C., Rose-John J., Schrader J., Scheller J., Fischer J.W. Interleukin-6-induced hyaluronan synthesis leads to increased secretion of proinflammatory cytokines in cardiac fibroblasts. April 2014 *Clin Res Cardiol 103, Suppl 1, P401*

## Lebenslauf

### Person

Name	Julia Müller
Geburtsdatum	16. Februar 1985
Geburtsort	Rinteln
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Promotion

01/2011 – 05/2014	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer
02/2010 – 12/2010	Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer
Thema	„Untersuchung der Effekte von Interleukin-6 auf den Umbau der kardialen extrazellulären Matrix nach akutem Myokardinfarkt“

### Studium

01/2010	Approbation als Apothekerin
12/2009	3. Staatsexamen
05/2009 – 10/2009	Pharmaziepraktikantin in der Markus Apotheke, Düsseldorf
11/2008 – 04/2009	Pharmaziepraktikantin bei der Firma Janssen-Cilag GmbH in Neuss in der Abteilung „Medical Education“
09/2008	2. Staatsexamen
08/2006	1. Staatsexamen
10/2004 – 08/2008	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Schule

1997 – 2004	Gymnasium Ernestinum Rinteln, Abschluss mit dem Abitur
1995 – 1997	Orientierungsstufe II Rinteln
1991 – 1995	Grundschule Rinteln Nord

Düsseldorf, den 20.05.2014

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz recht herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer bedanken. Ich bin sehr glücklich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seinem Institut zu verfassen. Ich bin dankbar für die vielen konstruktiven und anregenden Gespräche und Gedankengänge und auch das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an die Kooperationspartner, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, darunter Prof. Dr. Jürgen Scheller und Dr. Christoph Garbers für die Hilfestellung bei den unzähligen Fragen zum Thema ‚Interleukin-6‘ und das zur Verfügung stellen des hyper-IL-6 sowie des IL-6-Antikörpers, Dr. Zhaoping Ding für die Durchführung der Infarkte, Dr. Simone Gorressen und Stefanie Becher für die Expertise im Echo und ebenfalls bei den Infarkten, Dr. Maria Grandoch und Kathrin Feldmann für die FACS-Analysen sowie Dr. Stefan Lehr für die Hilfe bei der Multiplex-Analyse.

Meine Promotionszeit war natürlich, wie dies bei fast jeder Promotion der Fall ist, eine kleine Berg- und Talfahrt, die rückblickend mit die beste Zeit meines Lebens war!

Einen Großteil dazu beigetragen haben natürlich auch all die lieben Kolleginnen und Kollegen, die einfach auch den schlimmsten Labortag (oder auch die längste Labornacht) erträglich gemacht haben.

Ein besonderer Dank geht hier an Inga Kretschmer mit der ich die meiste Zeit meines Doktoranden-Dasein geteilt habe und die einfach für fast jedes Problem (ob versuchstechnisch oder privat) eine adäquate Lösung wusste.

Bei Nina Heinisch möchte ich mich für all die zusammen geköpften Sektflaschen und die gemeinsamen Übernachtungen auf der ein oder anderen Kongressreise bedanken.

Vielen Dank auch an Dr. Katharina Röck für das herzliche Aufnehmen als Neu-Doktorandin und die vielen darauf folgenden tollen Erlebnisse die wir teilen durften.

Dr. Till Freudenberger danke ich für die angenehme Zeit als Büronachbar und das immer offene Ohr für die kleinen Problemchen des Lebens.

Christina Klatt, Kathrin Feldmann und Alexandra Schütze danke ich ganz herzlich für die unzähligen gemeinsam gelaufenen Kilometer und den Ansporn die Hürde des Halbmarathons zusammen zu meistern und natürlich für all die vielen Gespräche ‚unterwegs‘.

Ebenfalls ein riesiger Dank geht an Frau Erika Lohmann, die für mich die Mutter aller Doktoranden ist, und die für alle Wehwechen ein Pflaster parat hatte (meist aus Schokolade). Außerdem auch ein Dankeschön an Karin Montag für die Geduld bei der Bedienung des Fax-Gerätes und den unzähligen Bestellungen. Und an Regina Flahs für die stets große Hilfe bei der graphischen Gestaltung der Abbildungen.

Danke auch an die lieben technischen Assistentinnen, die mir so manche Arbeit abgenommen haben und nicht nur dadurch, sondern auch durch die vielen lieben Worte den Laboralltag erleichtert haben. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle noch Annika Zimmermann, die mir durch ihre (manchmal etwas versteckte) herzliche Art unfassbar ans Herz gewachsen ist. Danke, Miststück!

*Last but not least* möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mich stets aufopfernd unterstütz und in meinem Tun bekräftigt hat! Ihr wart immer für mich da und habt mir einen unfassbaren großen Rückhalt gegeben. Ohne euch wäre ich wahrscheinlich nie so weit gekommen. Danke!

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

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

Düsseldorf, den 20.05.2014

Julia Müller