

Bedeutung der Hyaluronsäure-Synthase 3 für die Angiogenese und Arteriogenese

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Rebekka Schneckmann (geb. Schmetter)

aus Kamp-Lintfort

Düsseldorf, Juni 2018

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. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Angiogenese	3
1.3 Ablauf der Angiogenese	4
1.3.1 Initiation der Angiogenese	5
1.3.2 Migration und Proliferation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen	6
1.3.3 Reifung der Gefäße	8
1.4 Mechanismen zur Induktion von Angiogenese	9
1.5 Die post-ischämische Inflammationsreaktion	10
1.5.1 Bedeutung von Immunzellen für die Angiogenese	11
1.6 Arteriogenese	12
1.6.1 Bedeutung nativer Kollateralen	12
1.7 Ablauf der Arteriogenese	13
1.7.1 Aktivierung des Endothels durch erhöhten Scherstress	13
1.7.2 Rekrutierung von Leukozyten	14
1.7.3 Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen	15
1.7.4 Reifungsphase der Arteriogenese	16
1.8 Hyaluronsäure	17
1.8.1 Struktur	17
1.8.2 Synthese	17
1.8.3 Abbau der Hyaluronsäure	18
1.8.4 Hyaluronsäure-Rezeptoren und -Bindeproteine	18
1.8.5 Rolle von Hyaluronsäure in der Angiogenese	19
1.8.6 Rolle von Hyaluronsäure in der Arteriogenese	20
1.8.6.1 Einfluss von Hyaluronsäure auf die endotheliale Glykokalyx	20
1.8.6.2 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Rekrutierung von Immunzellen	20

Inhaltsverzeichnis

1.8.6.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Proliferation und Migration von vaskulären Zellen.....	21
1.8.6.4 Hyaluronsäure im Kontext ischämischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	21
1.9 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Tierversuche	23
2.1.1 Verwendete Tiere.....	23
2.1.1.1 Ubiquitäre <i>Has3</i> -defiziente Maus	23
2.1.1.2 Endothelzell-spezifische <i>Has3</i> -defiziente Maus.....	24
2.1.2 Kritisches Hinterlaufischämie-Modell	25
2.1.3 Mildes Hinterlaufischämie-Modell.....	26
2.1.4 Laser-Doppler-Perfusionsmessung.....	27
2.1.5 <i>Time-of-Flight</i> -Magnetresonanztangiographie	27
2.1.6 Untersuchung der vaskulären Reagibilität	28
2.1.7 Probenentnahme und -aufarbeitung.....	28
2.1.7.1 Blutentnahmen zur Generierung von EDTA-Plasma	28
2.1.7.2 Entnahme der Retinae	28
2.1.7.3 Perfusionsfixation der Muskeln.....	29
2.1.7.4 Entnahme der Muskeln für histologische Untersuchungen	29
2.1.7.5 Entnahme der Unterschenkelmuskeln für Genexpressionsanalysen	30
2.2 Histologie und Immunhistochemie	31
2.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen.....	31
2.2.2 In der Immunhistochemie verwendete Antikörper und Bindeproteine.....	32
2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	33
2.2.4 Färbungen.....	33
2.2.5 Anfärbung von Gefäßstrukturen in Unterschenkelmuskeln	33
2.2.6 Anfärbung von Leukozyten in ischämischen Unterschenkelmuskeln.....	34
2.2.7 Untersuchung der Retina-Vaskularisierung	34
2.3 Durchflusszytometrie	35
2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen.....	36
2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung von Muskeln	37
2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut	39
2.3.3.1 Analyse von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut	39
2.3.3.2 Analyse von Lymphozyten im Blut.....	40
2.3.4 Verwendete Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie	42

Inhaltsverzeichnis

2.4	Zellkulturversuche	43
2.4.1	Verwendete Substanzen in der Zellkultur	43
2.4.2	Verwendete Zellen	43
2.4.2.1	Humane koronararterielle Endothelzellen (HCAEC)	43
2.4.2.2	Humane embryonale Nierenzellen	44
2.4.3	Lentivirale Transduktion von HCAEC	44
2.4.3.1	Produktion lentiviraler Vektoren	44
2.4.3.2	Lentivirale Transduktion	45
2.4.3.3	HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay	46
2.4.3.4	<i>Matrigel-Tube-Formation Assay</i>	46
2.5	Genexpressionsanalysen	47
2.5.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen und Unterschenkelmuskeln	47
2.5.2	Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA	47
2.5.3	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Real-Time</i> PCR (qPCR)	48
2.5.4	Genexpressionsanalyse mittels <i>Microarray</i> -Technik	48
2.6	Proteinanalytik	49
2.6.1	Bestimmung zirkulierender Zytokine und Chemokine	49
2.7	Statistik	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Einfluss der HAS3 auf die Angiogenese im Modell der HLI	50
3.1.1	Wiederherstellung der Perfusion nach kritischer Hinterlaufischämie	50
3.1.2	Kapillardichte in ischämischen Unterschenkelmuskeln	51
3.1.3	Charakterisierung der Retina-Vaskularisierung	52
3.1.4	Rolle der endothelialen HAS3 für Angiogenese <i>in vitro</i>	53
3.1.4.1	Validierung der <i>HAS3</i> -Überexpression in HCAEC	53
3.1.4.2	Analyse von tubulären Strukturen	54
3.1.5	Analyse zirkulierender Zyto- und Chemokine	55
3.1.6	Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen	56
3.1.6.1	Analyse der Leukozyten und Lymphozyten	56
3.1.6.2	Analyse der zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten	58
3.1.7	Analyse der Genexpression in ischämischen Unterschenkelmuskeln	59
3.1.8	Leukozyteninfiltration in Unterschenkelmuskeln	60
3.1.8.1	Immunhistochemische Färbung von Leukozyten	60
3.1.8.2	Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellpopulationen	61
3.2	Einfluss der HAS3 auf die Arteriogenese im Modell der HLI	63

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Wiederherstellung der Perfusion nach milder Hinterlaufischämie	63
3.2.1	Untersuchung von Kollateralen mithilfe der Magnetresonanztangiographie	65
3.2.2	Durchflusszytometrische Analyse von Oberschenkelmuskeln	66
3.2.3	Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellpopulationen.....	69
3.2.3.1	Analyse der zirkulierenden Leukozyten und Lymphozyten.....	69
3.2.3.2	Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten	71
3.2.4	Untersuchung der vaskulären Reagibilität	72
3.2.5	Untersuchung von Endothelzell-spezifischen <i>Has3</i> -defizienten Mäusen.....	73
4.	Diskussion	74
4.1	Bedeutung der HAS3 nach kritischer Hinterlaufischämie.....	76
4.1.1	Modell der kritischen Hinterlaufischämie als Angiogenese-Modell.....	76
4.1.2	Einfluss der HAS3 auf pathophysiologische Angiogenese	76
4.1.3	Kein Einfluss der HAS3 auf die basale Gefäßmorphologie	77
4.1.4	Unveränderte systemische Inflammation	78
4.1.5	Verminderte Expression pro-inflammatorischer Gene	79
4.1.6	Verminderte post-ischämische Inflammationsantwort	80
4.2	Einfluss der HAS3 auf Arteriogenese	82
4.2.1	Modell der milden Hinterlaufischämie als Arteriogenese-Modell.....	82
4.2.2	Unveränderte Leukozyten-Infiltration nach 72 Stunden.....	83
4.2.3	Bedeutung der HAS3 für die fluss-vermittelte Vasodilatation	84
4.2.4	Ausblick und Limitierung.....	86
5.	Zusammenfassung	87
6.	Summary	89
7.	Literaturverzeichnis	91
8.	Originalarbeiten.....	99
9.	Posterpräsentationen	100
10.	Lebenslauf	101
11.	Danksagung.....	102
	Eidesstattliche Versicherung.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolute Verteilung der kardiovaskulären Todesfälle weltweit (2015), (modifiziert nach [1]).	1
Abbildung 2: Initiation der Angiogenese (modifiziert nach [20]).	5
Abbildung 3: Migration und Proliferation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen (modifiziert nach [19]).	7
Abbildung 4: Reifungsphase der Angiogenese (modifiziert nach [20]).	8
Abbildung 5: Initiation der Arteriogenese durch erhöhten Scherstress.	13
Abbildung 6: Rekrutierung von Immunzellen.	14
Abbildung 7: Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen.	15
Abbildung 8: Reifungsphase der Arteriogenese.	16
Abbildung 9: Struktur der Hyaluronsäure (modifiziert nach [83]).	17
Abbildung 10: Schema zur Ligatur und Exzision der <i>Arteria femoralis</i> .	25
Abbildung 11: Schema zur Elektrokoagulation der <i>Arteria femoralis</i> .	26
Abbildung 12: Bildbearbeitung zur Analyse der Retina-Vaskularisierung.	35
Abbildung 13: <i>Gating</i> -Schema für Leukozyten im Unterschenkelmuskel.	38
Abbildung 14: <i>Gating</i> -Schema für Leukozyten im Oberschenkelmuskel.	38
Abbildung 15: <i>Gating</i> -Schema für Monozyten und neutrophile Granulozyten im Blut.	40
Abbildung 16: <i>Gating</i> -Schema für Lymphozyten im Blut nach kritischer HLI.	41
Abbildung 17: <i>Gating</i> -Schema für Lymphozyten im Blut nach milder HLI.	41
Abbildung 18: Wiederherstellung der Perfusion nach kritischer HLI.	51
Abbildung 19: Analyse der Kapillardichte in ischämischen Unterschenkeln.	52
Abbildung 20: Retina-Vaskularisierung in adulten Mäusen.	53
Abbildung 21: Validierung der HAS3-Überexpression in HCAEC.	54
Abbildung 22: Analyse von tubulären Strukturen.	55
Abbildung 23: Messung von Zyto- und Chemokinen im Blutplasma.	56
Abbildung 24: Analyse der zirkulierenden Leukozyten.	57
Abbildung 25: Analyse der zirkulierenden Lymphozyten.	57
Abbildung 26: Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten.	58
Abbildung 27: Leukozyteninfiltration in ischämischen Unterschenkelmuskeln.	60
Abbildung 28: Analyse der Immunzellpopulationen in Unterschenkelmuskeln.	62
Abbildung 29: Wiederherstellung der Perfusion nach milder HLI.	64
Abbildung 30: <i>Time-of-Flight</i> -Magnetresonanztangiographie der Kollateralen im Hinterlauf.	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Analyse der Immunzellpopulationen in Oberschenkelmuskeln.	67
Abbildung 32: Analyse von Makrophagen in Oberschenkelmuskeln.	68
Abbildung 33: Analyse der zirkulierenden Leukozyten.....	69
Abbildung 34: Analyse der zirkulierenden Lymphozyten.....	70
Abbildung 35: Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten.	71
Abbildung 36: Analyse der vaskulären Reagibilität.	72
Abbildung 37: Untersuchung von Endothelzell-spezifischen <i>Has3</i> -defizienten Mäusen.	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Puffer und Lösungen in der Immunhistochemie	31
Tabelle 2: Eingesetzte Antikörper und Bindeproteine in der Immunhistochemie	32
Tabelle 3: Puffer und Lösungen in der Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 4: Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie	42
Tabelle 5: Verwendete Substanzen in der Zellkultur	43
Tabelle 6: verwendete Primer-Sequenzen	48
Tabelle 7: Auswahl unterschiedlich regulierter Gene in Unterschenkelmuskeln.	59

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
Ang	Angiopoetin
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i> , Gefahren-assoziierte molekulare Muster
DAPI	4'6-Diamin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FMD	<i>Flow-mediated dilation</i> , Fluss-vermittelte Dilatation
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GlcA	<i>Glucuronic acid</i> , Glucuronsäure
GlcNac	<i>N-acetyl-glucosamine</i> , N-Acetylglucosamin
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HA	Hyaluronsäure
HABP	<i>Hyaluronic acid binding protein</i> , Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i> , Hypoxie-induzierter Faktor
HLI	Hinterlaufischämie
I	Ischämisch
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1 (Mac1)</i>
IL	Interleukin
Isoton	Coulter® Isoton II Diluent

Abkürzungsverzeichnis

KO	<i>Knockout</i>
LCN	Lipocalin
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL-2)</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloprotease</i>
NfκB	<i>Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NI	Nicht ischämisch
NO	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Nährmedium
SEM	<i>Standard error of the mean</i> ; Standardfehler
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMA	<i>Smooth muscle cell actin α</i> , glattes Muskelzell-Aktin α
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
SNAP	<i>S-nitroso-N-acetylpenicillamine</i>
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i> , Transformierender Wachstumsfaktor β
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TSG-6	<i>Tumor necrosis factor-stimulated gene-6</i> , Tumornekrosefaktor-induzierbares Gen 6
UDP	Uridindiphosphat
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Einführung

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge waren kardiovaskuläre Erkrankungen im Jahr 2015 für 31,3 % aller weltweit registrierten Todesfälle verantwortlich [1]. Diese Statistik zeigt, dass Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems nach wie vor mit einer überdurchschnittlich hohen Mortalität assoziiert sind und sogar die Haupttodesursache weltweit darstellen.

Unter dem Begriff „kardiovaskuläre Erkrankung“ werden sowohl die ischämische bzw. koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankungen (wie beispielsweise der Schlaganfall), peripher-arterielle Gefäßerkrankungen, rheumatische und kongenitale Herzerkrankungen sowie venöse Thromboembolien zusammengefasst [2].

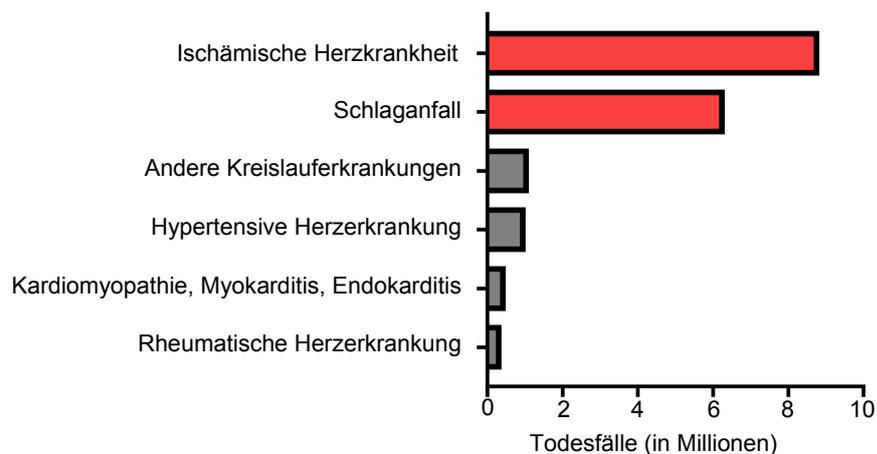


Abbildung 1: Absolute Verteilung der kardiovaskulären Todesfälle weltweit (2015), (modifiziert nach [1]).

Einleitung

Bis zu 80 % aller kardiovaskulären Todesfälle gehen auf ischämische Gefäßpathologien wie die ischämische Herzkrankheit oder den ischämischen Schlaganfall zurück (rot hervorgehoben in Abbildung 1). Häufig liegt diesen Erkrankungen eine atherosklerotische Veränderung der Koronararterien bzw. hirnversorgenden Arterien zu Grunde, die zu einer Verengung (Stenose) und einem teilweisen oder vollständigen Verschluss (Okklusion) des betroffenen Gefäßes führt.

Da sich die atherosklerotischen Veränderungen jedoch nicht nur lokal, sondern im gesamten, arteriellen Gefäßbett manifestieren können, sind häufig auch periphere Arterien betroffen. Beispielsweise kann eine fortgeschrittene Atherosklerose der Arterien, welche die Extremitäten versorgen, zu dem Krankheitsbild der peripher-arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) führen. Obwohl pAVK-Patienten vor allem unter Durchblutungsstörungen der Extremitäten leiden, besitzen sie darüber hinaus auch ein überdurchschnittlich hohes Risiko für Stenosen in weiteren Organen wie dem Herzen oder Gehirn: So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass Patienten mit pAVK unabhängig von der Symptomausprägung ein deutlich erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse wie dem Myokardinfarkt und Schlaganfall aufweisen [3, 4]

Im Allgemeinen führt die akute Okklusion eines arteriellen Gefäßes zu einer eingeschränkten Perfusion des Gewebes, was eine Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Ischämie) zur Folge hat und im schlimmsten Falle zum nekrotischen Untergang des Gewebes führen kann. Um die Perfusion des distal der Okklusion befindlichen Gewebes wiederherzustellen, werden im Körper zwei wichtige Prozesse zur Revaskularisierung induziert, nämlich die Angiogenese und die Arteriogenese [5].

1.2 Angiogenese

Angiogenese beschreibt eine Form des Blutgefäßwachstums, die sowohl während der Entwicklung, als auch im adulten Organismus beobachtet wird. Im Gegensatz zu der Vaskulogenese, eine Form der Blutgefäßbildung aus Vorläuferzellen, beschreibt Angiogenese die Ausbildung neuer Blutgefäße durch die Aussprossung oder Teilung (Intussuszeption) bereits bestehender Gefäße [6].

Angiogenese wird im adulten Organismus während einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen induziert [7-12]. Als wichtiger Bestandteil der Wundheilung trägt sie beispielsweise zur Reparatur von Gewebeschäden bei [8] und ist in die Physiologie des weiblichen Reproduktionstrakts involviert [9].

Im Rahmen pathophysiologischer Prozesse kann Angiogenese jedoch auch in Form eines unzureichenden oder exzessiven Gefäßwachstums auftreten. Bei Patienten mit ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der KHK ist die Angiogenese beispielsweise häufig gestört, so dass die metabolischen Ansprüche des Myokards nicht erfüllt werden können. Weitere Krankheitsbilder, die mit einer insuffizienten Form der Angiogenese einhergehen sind z.B. die Präeklampsie [13], Osteoporose [14] oder gastrointestinale Ulkus-Erkrankungen [15].

Ein exzessives und unkontrolliertes Gefäßwachstum wird hingegen bei Tumorerkrankungen [16], chronischen Entzündungen (beispielsweise bei Arthritis) [12] oder Retinopathien [17] beobachtet, und kann zu einer Progression der Grunderkrankung führen. Bereits 1971 wurde erkannt, dass Tumoren ab einer Größe von 1-2 mm³ auf die Nährstoffversorgung durch Angiogenese angewiesen sind [16]. Nichtsdestotrotz dauerte es mehr als 30 Jahre bis Bevacizumab (Avastin®) als erster Angiogenese-Inhibitor Einzug in die Tumorthherapie fand.

Während das Konzept der Angiogenese-Hemmung bereits in der Onkologie und Augenheilkunde Anwendung findet, stellt die gezielte Stimulation von Angiogenese zur Behandlung von Durchblutungsstörungen nach wie vor eine Herausforderung dar. Insbesondere Patienten mit ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen könnten jedoch von einer Revaskularisierung des ischämischen Gewebes profitieren.

1.3 Ablauf der Angiogenese

Angiogenese ist eine Form des adaptiven Gefäßwachstums, die mit der Ausbildung von neuen Kapillaren einhergeht und zur Perfusion des ischämischen Gewebes beiträgt. Damit es unter normalen Umständen nicht zu einem spontanen oder übermäßigen Gefäßwachstum kommt, gibt es verschiedene Kontrollmechanismen im Körper. Neben einem ausgewogenen Gleichgewicht von pro- und anti-angiogenen Faktoren, beruht einer dieser Mechanismen auf den besonderen Eigenschaften des Endothels: Unter normalen Bedingungen verweilen Endothelzellen in einer Art Ruhezustand, der durch eine geringe Migrations- und Proliferationsaktivität gekennzeichnet ist.

Kommt es jedoch in der näheren Umgebung der Endothelzelle zu einer Akkumulation pro-angiogener Faktoren, so kann dies zu einer massiven Veränderung des Endothelzell-Phänotyps führen. Dieser häufig als „*angiogene Switch*“ bezeichnete Zustand ermöglicht eine Migration und Proliferation der Endothelzellen in das umliegende Gewebe und kennzeichnet die Initiation der „aussprossenden Angiogenese“ [18]. Diese Phase ist durch eine erhöhte Vaso-Permeabilität, eine Destabilisierung der Kapillarstruktur und einen Abbau der Basalmembran gekennzeichnet: (siehe Abbildung 2).

1.3.1 Initiation der Angiogenese

Eine hypoxische oder inflammatorisch veränderte Umgebung kann parenchymale Zellen (z.B. Myozyten oder Kardiomyozyten) sowie Stromazellen zur Ausschüttung von pro-angiogenen Faktoren veranlassen [19]. Über die Sekretion von pro-angiogenen Molekülen wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Angiopoetin-2 (ANG-2) oder diversen Chemokinen kommt es zu einer ausgeprägten Aktivierung des Endothels [20].

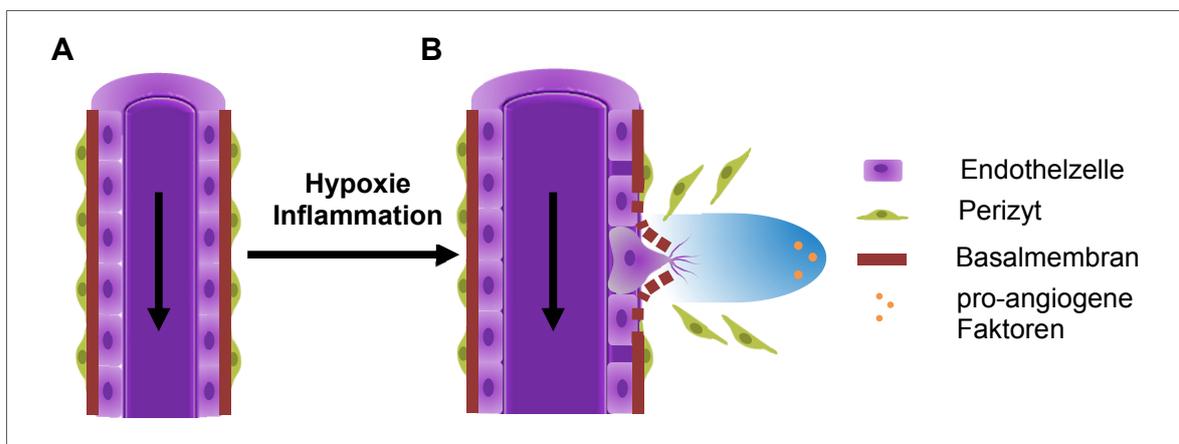


Abbildung 2: Initiation der Angiogenese (modifiziert nach [20]).

A, Aufbau einer Blutkapillare im Ruhezustand. Die einzellige Endothelzellschicht steht über die Basalmembran in einem engen Kontakt mit Perizyten. Unter hypoxischen oder inflammatorischen Bedingungen kann es zu der Akkumulation von pro-angiogenen Faktoren kommen, was einen angiogenen *Switch* hervorrufen kann. **B**, die Aktivierung von Endothelzellen führt zu einem Ablösen der Perizyten, einem Verdau der Basalmembran und Auflockerung der (Endothel-)Zell-Zell-Kontakte.

Das Endothelzell-Verhalten wird in dieser Phase vor allem durch VEGF bestimmt [21]. Es ist beschrieben, dass die Bindung von VEGF an den endothelialen VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2) zu einer Phosphorylierung und Internalisierung des Adhäsionsproteins VE-Cadherin führt [22]. Dadurch wird eine Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte induziert, was in einer erhöhten Vaso-Permeabilität resultiert.

Die Bindung von ANG-2 an den TIE-2-Rezeptor auf Endothelzellen und zu einem geringeren Umfang auch auf Perizyten, stellt wiederum ein wichtiges Signal für ein Ablösen der Perizyten von der Basalmembran dar [23]. Dadurch wird eine zusätzliche Auflockerung der Kapillarstruktur erreicht. Ein Verdau der Basalmembran mithilfe von endothelialen Proteasen wie z.B. der membrangebundenen Matrix-Metalloproteinase 1 [*membrane-type* (MT)-MMP1] ebnet schließlich den Weg für die Migration ausgewählter Endothelzellen (so genannter *Tip*-Zellen) in das umliegende Gewebe [24], [25].

Einleitung

Tip-Zellen sind spezialisierte Endothelzellen, die sich durch eine überdurchschnittlich hohe VEGFR-2-Expression, einen hoch-migratorischen Phänotyp und der Möglichkeit zur Erkennung von VEGF-Konzentrationen mithilfe von Filopodia auszeichnen [26]. Dabei führen sie den wachsenden Kapillarspross in Richtung eines steigenden VEGF-Gradienten an.

Ebenso wichtig sind die *Stalk*-Zellen, die hingegen durch eine erhöhte Proliferationsaktivität gekennzeichnet sind und eine Verlängerung des Kapillarsprosses bewirken. Die Selektion des *Tip*- bzw. *Stalk*-Zell-Phänotyps wird unter anderem durch VEGF-VEGFR-2-Interaktionen und den *Delta like 4* (Dll4)-Notch-Signalweg vermittelt [27].

Die initiale Durchlässigkeit der Gefäße fördert die anschließende Phase der Migration und Proliferation der Endothelzellen auf vielfältige Weise: Zum einen gelangen Chemokine, Zytokine und Immunzellen auf diese Weise einfacher in das Gewebe. Zum anderen führt der Austritt von Plasmabestandteilen wie Fibrinogen und Fibronectin zu der Ausbildung einer Fibrin-reichen Matrix.

1.3.2 Migration und Proliferation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen

Die zweite Phase der Angiogenese wird maßgeblich durch die Migration und Proliferation der Endothelzellen bestimmt. Das Zusammenspiel zwischen der EZM, löslichen Faktoren und inflammatorischen Zellen bietet dabei ein optimales Milieu für die Ausbildung von tubulären Strukturen (siehe Abbildung 3):

Einleitung

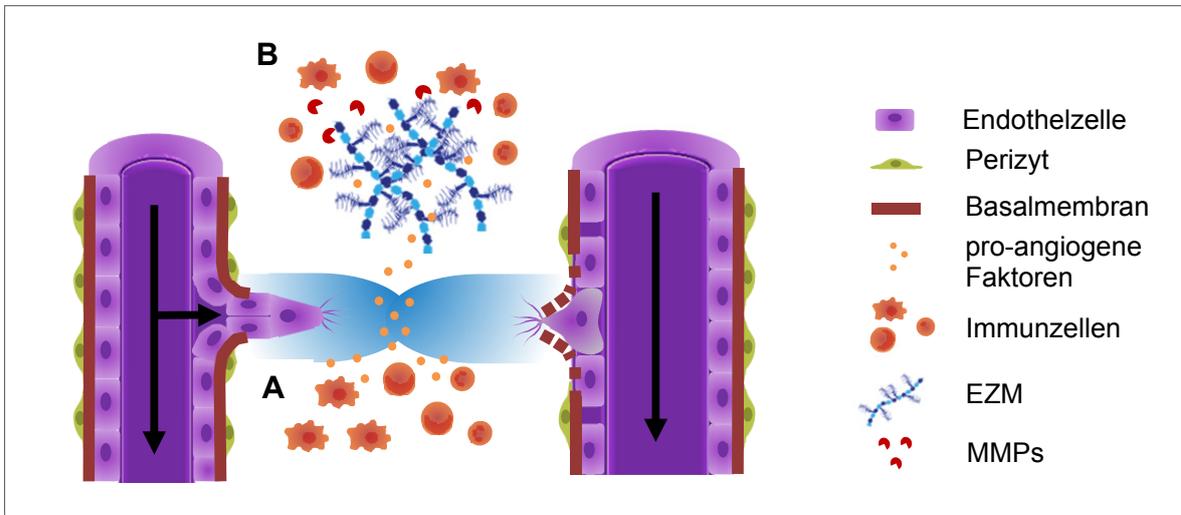


Abbildung 3: Migration und Proliferation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen (modifiziert nach [19]).

Immunzellen tragen zum Kapillarwachstum bei, indem sie die Migration und Proliferation von Endothelzellen **A**, direkt über die aktive Sekretion von pro-angiogenen Faktoren oder **B**, indirekt durch den Verdau der Extrazellulären Matrix (EZM) mithilfe von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) anregen.

Während der Migration nutzen *Tip*-Zellen die vorläufige Matrix aus Plasmabestandteilen wie Fibrin und Fibronectin zur vereinfachten (oft Integrin-vermittelten) Migration in das umliegende Gewebe [28-30]. Auch die Anwesenheit von Immunzellen ist in diesem Zusammenhang unterstützend. Über eine aktive Sekretion von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF können sie zu einer direkten Stimulation der *Tip*-Zellen beitragen [31], [32]. Zum anderen produzieren sie hohe Mengen an proteolytischen Enzymen wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) [33]. Der Verdau der EZM durch MMPs begünstigt dabei die Freisetzung von weiteren pro-angiogenen Faktoren, die in der Matrix inkorporiert sind. Schließlich können Matrix-Bestandteile auch selbst als pro-angiogene Faktoren fungieren [34],[35],[36].

Immunzell-Matrix-Interaktionen können die Migration von Endothelzellen jedoch auch über indirekte Mechanismen unterstützen: So ist beschrieben, dass der Verdau der EZM durch Makrophagen zu einer Art Tunnelbildung führen soll. Es wird vermutet, dass Endothelzellen diese Tunnel zur aktiven Migration nutzen können [37]. Der Kapillarspross wird währenddessen durch proliferierende *Stalk*-Zellen unter der Ausbildung eines Gefäßlumens verlängert.

1.3.3 Reifung der Gefäße

Während der Reifungsphase erfolgt eine Stabilisierung der Gefäße durch die Rekrutierung von Perizyten, der Ausbildung einer neuen Basalmembran und Stärkung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte (siehe Abbildung 4).

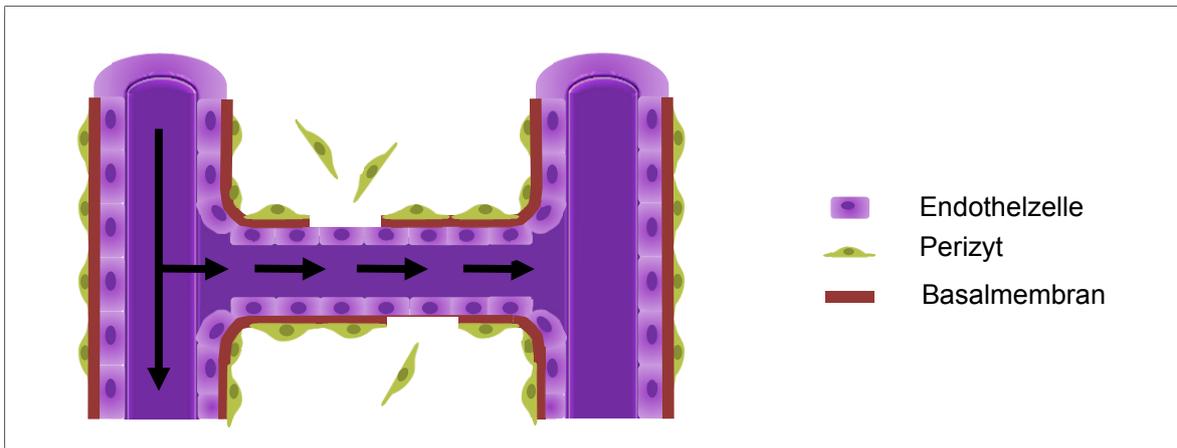


Abbildung 4: Reifungsphase der Angiogenese (modifiziert nach [20]).

Die Neubildung der Basalmembran und Rekrutierung von Perizyten bewirkt eine Reifung der Gefäße.

Die Rekrutierung von Perizyten zu den unreifen Gefäßen wird vor allem über den Blutplättchen-Wachstumsfaktor-B (PDGF-B) vermittelt, der von Endothelzellen ausgeschüttet wird. Über die Bindung an PDGF-Rezeptor- β (PGFR- β) werden Perizyten zur Migration und Proliferation angeregt. Ein weiterer Faktor, der die Reifung der Gefäße beeinflusst, ist der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)-beta [38]. Mit der Wiederherstellung der Perfusion gehen die Endothelzellen wieder in einen Ruhezustand über. In dieser Phase kann es auch zu einer Regression von Gefäßen kommen, die zuvor nicht ausreichend stabilisiert wurden.

1.4 Mechanismen zur Induktion von Angiogenese

Zwei wichtige Mechanismen, die einen „angiogenen *Switch*“ hervorrufen können, sind Hypoxie und Inflammation. Obwohl beide Mechanismen unabhängig voneinander zum Gefäßwachstum beitragen können, sind sie eng miteinander verschaltet [39].

Bei der Hypoxie-induzierten Angiogenese spielt der Transkriptionskomplex Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) eine entscheidende Rolle. HIF-1 ist ein Protein-Komplex, der sich aus einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit und einer Sauerstoff-regulierten α -Untereinheit zusammensetzt [40, 41]. Die HIF-1 α -Untereinheit besitzt eine Sauerstoff-abhängige Domäne, die unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert vorliegt. Die Hydroxylierung spezifischer Prolin-Reste generiert dabei eine Bindungsstelle für den Ubiquitin-Ligase-Komplex, der die Markierung des Proteins mit Ubiquitin-Resten katalysiert. Dies begünstigt die Proteolyse der HIF-1 α -Untereinheit durch das Proteasom [42], [43], [44]. Darüber hinaus wurde eine Ubiquitin-unabhängige Degradation durch das Proteasom beschrieben [45].

Unter hypoxischen Bedingungen wird die α -Untereinheit stabilisiert und akkumuliert im Zytosol. Dies führt zu einer Dimerisierung der α - und β -Untereinheit und einer Translokation des HIF-Komplexes in den Nukleus. Durch die Bindung von HIF-1 an die Promotoren Hypoxie-induzierter Gene, wird die Expression einer Reihe von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF [46], MMPs [47], Angiopoeitinen (ANG) [48], der Cyclooxygenase-2 (COX-2), von Stickstoffmonoxid-Synthasen (iNOS und eNOS) [49] oder dem *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (Nf κ B) [50] induziert.

Da Nf κ B ein wichtiger Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Genen ist, regt Hypoxie nicht nur das Wachstum von Blutgefäßen an, sondern führt auch zu einer inflammatorischen Reaktion im Gewebe. Diese Regulation erklärt, warum Angiogenese und Inflammation häufig parallel beobachtet werden.

1.5 Die post-ischämische Inflammationsreaktion

Arterielle Okklusionen, wie sie im Rahmen von ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen auftreten, gehen mit einer unmittelbaren Aktivierung des Immunsystems einher. Diese so genannte „post-ischämische Inflammationsreaktion“ hat einen wesentlichen Einfluss auf die Neubildung von Blutgefäßen und der damit verbundenen Reparatur des betroffenen Gewebes. Unabhängig davon, ob eine arterielle Okklusion im Herzen, Muskel oder dem Gehirn auftritt, verläuft die Aktivierung des Immunsystems über ein analoges Prinzip:

Durch die Verletzung des Gewebes werden molekulare Muster erzeugt, die von residenten Immunzellen als Gefahrensignale wahrgenommen werden. Diese so genannten Gefahren-assoziierten, molekularen Muster (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) stellen entweder intrazelluläre Strukturen wie RNA, DNA oder Zellorganellen [51], oder degradierte EZM-Bestandteile wie fragmentierte Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) dar [52]. Nach der Bindung dieser Strukturen an Musterkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), wie beispielsweise den *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs), kommt es zu einer ausgeprägten Aktivierung des Immunsystems. Gewebeschäden am Herzen werden auf diese Weise unter anderem durch residente Mastzellen erkannt, die durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin 1 β (IL1 β) und Histamin wesentlich zur Aktivierung des Endothels beitragen können [53], [54].

Eine Folge der erhöhten Endothelzell-Aktivierung ist die verstärkte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin und dem interzellulären Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) [55]. Insbesondere neutrophile Granulozyten werden auf diese Weise rasch in das Gewebe rekrutiert [56].

1.5.1 Bedeutung von Immunzellen für die Angiogenese

Neutrophile Granulozyten tragen nicht nur zu einer Befreiung des Gewebes von Zelltrümmern und der Rekrutierung weiterer Immunzellpopulationen (v.a. von pro-inflammatorischen Monozyten) bei [57], sondern können darüber hinaus die Blutgefäß-Neubildung durch direkte und indirekte Mechanismen unterstützen. Zum einen sezernieren sie pro-angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF-A, TNF- α oder IL8 [31]. Zum anderen setzen sie große Mengen der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) frei [32, 33, 58]. Diese kann die EZM verdauen und in der Matrix kooperierte Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF-2 freisetzen.

Unter allen Immunzellpopulationen wurden Monozyten und Makrophagen am häufigsten im Zusammenhang mit Angiogenese untersucht. Bei Betrachtung der Literatur wird deutlich, dass sie sowohl während der Entwicklung, als auch im adulten Organismus von essentieller Bedeutung für die Angiogenese sind [59, 60].

Die Neubildung von Blutgefäßen wird dabei auf vielfältige Weise beeinflusst: Zum einen produzieren Makrophagen Matrix-Metalloproteasen wie MMP-1, -2 und -9 oder Metalloelastasen [61]. Ähnlich wie bei den neutrophilen Granulozyten kann der Verdau der EZM zu einer Freisetzung von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren führen.

Zum anderen werden tunnelartige Strukturen durch den Verdau der EZM gebildet, in denen Endothelzellen migrieren und proliferieren können. Moldovan *et al.* konnten diesen Mechanismus in einem Modell der ischämischen Kardiomyopathie nachweisen [37].

Über die Ausschüttung von pro-angiogenen Faktoren wie FGF, PDGF und VEGF besitzen Makrophagen einen direkten Einfluss auf die Neubildung von Blutgefäßen [62]. Für das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis wurde zudem beschrieben, dass Makrophagen nach Stimulation von *Toll-like*-Rezeptoren pro-angiogene Zytokine wie TNF- α , IL6, IL8, oder IL15 sezernieren, wodurch die Vaskularisierung des entzündeten Gewebes gefördert wurde [63]. Interessanterweise wurde darüber hinaus eine Sekretion der CXC-Chemokine CXCL5 und CXCL1 beschrieben [64]. CXCL5 und CXCL1 besitzen das so genannte ELR-Motif, das eine charakteristische Aminosäuresequenz aus Glutaminsäure (E), Leucin (L) und Arginin (R) darstellt. CXC-Chemokine mit ELR-Motif werden häufig als pro-angiogen beschrieben [65].

1.6 Arteriogenese

Arteriogenese beschreibt zum einen das Wachstum von funktionellen Kollateralarterien aus bereits bestehenden, arteriellen Anastomosen (nativen Kollateralen) [66]. Zum anderen wird Arteriogenese als ein auf die Angiogenese folgender Prozess der Neubildung arterieller Gefäße aus Kapillaren definiert [67], der durch die Rekrutierung von glatten Gefäßmuskelzellen charakterisiert ist [68]. Aufgrund der Erweiterung auf ein Vielfaches ihres Durchmessers im Verlauf von Tagen bis Wochen, können die gebildeten Kollateralarterien größere Blutmengen zum ischämischen Gewebe transportieren. Infolgedessen entsteht eine Art physiologischer *Bypass*, der hinsichtlich der Kompensation von Perfusionsdefiziten nach arterieller Okklusion als sehr effektiv beschrieben wird [66].

1.6.1 Bedeutung nativer Kollateralen

Es ist bekannt, dass es große interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung von nativen Kollateralgefäßen gibt [69], [70], die im Rahmen der Arteriogenese zu funktionellen Arterien umgebaut werden können. Im Modell der unilateralen Hinterlaufischämie (HLI) zeigen Mausstämmen mit einem suffizienten Kollateralgefäßsystem, wie beispielsweise C57BL/6J-Mäuse, eine signifikant verbesserte Wiederherstellung der Perfusion im Vergleich zu anderen Mausspezies mit weniger nativen Kollateralen. So ist beschrieben, dass sich C57BL/6J-Mäuse äußerst schnell und fast vollständig von einer operativ-induzierten HLI erholen, während Balb/C-Mäuse sehr viel länger für die Wiederherstellung der Perfusion brauchen. Aufgrund der ausbleibenden Kompensation wird in Balb/C-Mäusen sogar häufig ein Absterben der betroffenen Extremität beobachtet [71, 72]. Auch beim Menschen gibt es starke Variationen hinsichtlich der Ausprägung und Funktionalität von Kollateralgefäßen. Während diese Unterschiede in einem gesunden Menschen eventuell nicht zum Tragen kommen, können sie im Kontext ischämischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen Prognosebestimmend sein. In einer Meta-Analyse von 2012 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patienten mit stabiler KHK langfristig von einem gut ausgeprägten Koronarkollateralsystem profitieren können: gut vaskularisierte Patienten zeigten ein bis zu 36 % erniedrigtes Sterberisiko [73]. Andere Studien weisen darauf hin, dass gut vaskularisierte KHK-Patienten eine verbesserte Prognose nach Myokardinfarkt besitzen, da sie kleinere Infarktgrößen und eine verbesserte ventrikuläre Funktion entwickeln [74].

1.7 Ablauf der Arteriogenese

Die Arteriogenese ist ein komplexer Prozess, der im Gegensatz zur Angiogenese nicht durch Hypoxie, sondern vielmehr durch die Einwirkung von erhöhten Scherkräften auf kollaterale Endothelzellen induziert wird.

1.7.1 Aktivierung des Endothels durch erhöhten Scherstress

Normalerweise werden native Kollateralgefäße nur schwach durchblutet, da der Hauptteil der Blutversorgung von arteriellen Leitgefäßen übernommen wird. Kommt es jedoch zu einer Unterbrechung des Blutflusses durch die Okklusion dieser Leitgefäße, so resultiert die vermehrte Umleitung des arteriellen Blutflusses in Kollateralen zu einem unmittelbaren Anstieg des intravaskulären Scherstress (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Initiation der Arteriogenese durch erhöhten Scherstress.

Die Okklusion eines arteriellen Leitgefäßes führt zu der Umleitung des Blutflusses in nativ-angelegte Kollateralen. Dadurch wird eine Aktivierung der kollateralen Endothelzellen hervorgerufen. Dargestellt sind die Wandschichten eines kollateralen Gefäßes.

Dieser bewirkt eine Aktivierung des Endothels, welche sich in einem kurzfristigen Anschwellen und einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Genen äußert.

1.7.2 Rekrutierung von Leukozyten

Als Antwort auf die Aktivierung des Endothels kommt es zu einer gesteigerten eNOS-Aktivität, einer verstärkten Sekretion von Zytokinen (z.B. MCP-1, GM-CSF und TNF- α) und der Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) [75, 76]. Dadurch wird die Rekrutierung von Leukozyten (v.a. Monozyten und Lymphozyten) zum aktivierten Endothel begünstigt [77].

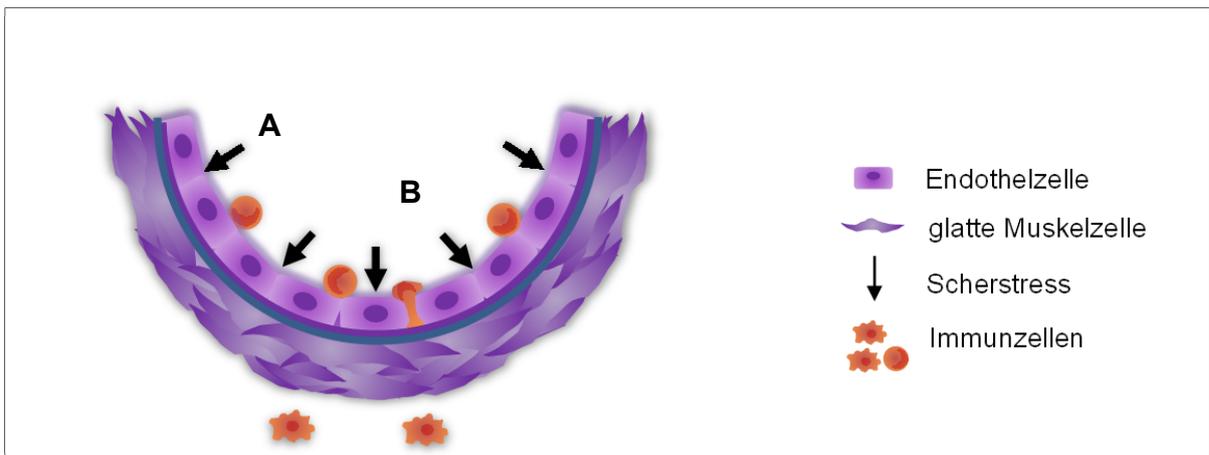


Abbildung 6: Rekrutierung von Immunzellen.

Die Aktivierung des Endothels führt zu einer gesteigerten Expression und Präsentation von Adhäsionsmolekülen. Rekrutierte Immunzellen können auf diese Weise **A**, am Endothel haften bleiben und **B**, in tiefer gelegene Gefäßwand-Schichten transmigrieren.

In dieser Phase wird bereits nach 12 Stunden eine vermehrte Adhäsion von Monozyten am Endothel beobachtet [78]. Diese Immunzellen können dann Integrin-vermittelt von der intraluminalen Seite des Gefäßes in tiefer gelegene Gefäßwandschichten transmigrieren. Es wird vermutet, dass Monozyten MMPs nutzen, um sich nach Degradation der EZM einfacher durch die einzelnen Gefäßwandschichten fortzubewegen. Obwohl Monozyten und Makrophagen eine primäre Rolle in dem Prozess der Arteriogenese spielen, wurden andere Immunzellen wie Mastzellen oder Lymphozyten ebenfalls in wachsenden Kollateralen nachgewiesen.

1.7.3 Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Immunzellen und aus der EZM werden Endothelzellen und glatte Muskelzellen zur Proliferation angeregt, was zu einer Expansion des Gefäßdurchmessers führt. Diese Phase setzt im Kaninchen bereits nach 24 Stunden ein und erreicht nach 3-7 Tagen ein Maximum [78]. Man geht davon aus, dass die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen von besonderer Bedeutung für die Expansion des Gefäßes ist.

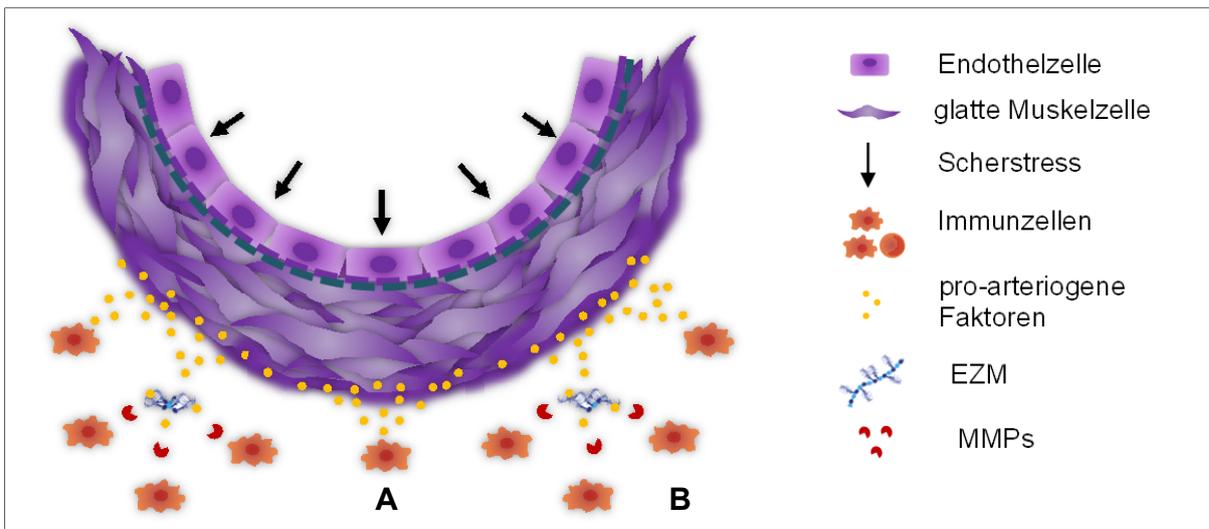


Abbildung 7: Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen.

Immunzellen tragen zum Wachstum von Kollateralen bei, indem sie die Migration und Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen **A**, direkt über die aktive Sekretion von pro-arteriogenen Faktoren oder **B**, indirekt durch den Verdau der Extrazellulären Matrix (EZM) mithilfe von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) anregen.

1.7.4 Reifungsphase der Arteriogenese

Arteriogenese ist ein selbstlimitierender Prozess. Sobald sich die Durchblutung im betroffenen Gewebe wieder normalisiert hat und die Scherkräfte abnehmen, wird die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen stark reduziert. Durch die Ausbildung einer neuen Basalmembran wird die Reifungsphase des Gefäßes abgeschlossen.

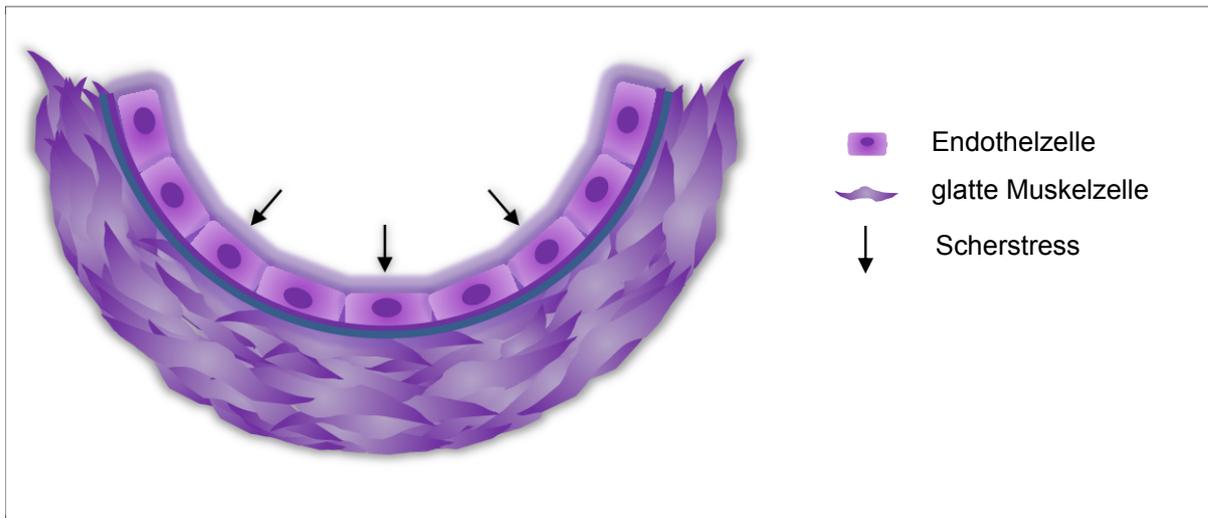


Abbildung 8: Reifungsphase der Arteriogenese.

Die Reifungsphase der Arteriogenese ist durch eine abnehmende Proliferationsaktivität der kollateralen Endothelzellen und glatten Muskelzellen charakterisiert. Durch die Ausbildung einer neuen Basalmembran wird die Reifungsphase des Gefäßes abgeschlossen.

1.8 Hyaluronsäure

1.8.1 Struktur

HA ist ein lineares, nicht-sulfatiertes Glykosaminoglykan, das aus alternierend verknüpften D-Glucuronsäure (*glucuronic acid*, GlcA)- und N-Acetyl-Glukosamin (*N-acetylglucosamine*, GlcNAc)-Bausteinen zusammengesetzt ist [79]. Als wichtige Komponente der EZM kommt HA in fast allen Geweben vor und ist an der Regulation zahlreicher Prozesse wie der Embryogenese [80], Angiogenese [81] oder Inflammation [82] beteiligt. HA trägt dabei nicht nur zu einer Strukturierung des Gewebes bei, sondern stellt ein aktives Signalmolekül im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation dar.

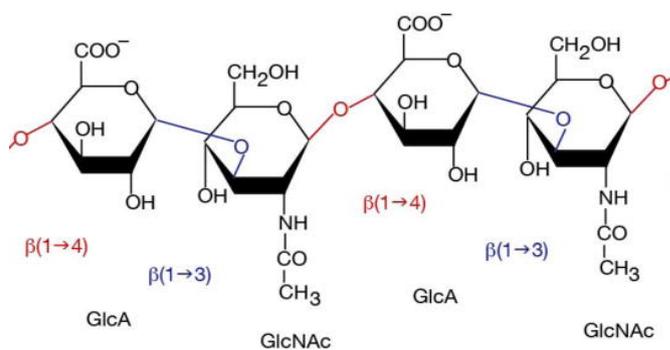


Abbildung 9: Struktur der Hyaluronsäure (modifiziert nach [83]).

1.8.2 Synthese

HA wird im Körper mithilfe von drei membranständigen HA-Synthase (HAS)-Isoenzymen (HAS1, HAS2, HAS3) synthetisiert und in Form wachsender HA-Ketten in den extrazellulären Raum extrudiert [84]. Als Substrate werden dabei Uridindiphosphat (UDP)-GlcNAc und UDP-GlcA genutzt.

Die Struktur des HAS-Proteins ist hoch konserviert. Aus diesem Grund weisen die HA-Synthasen verschiedener Spezies eine hohe Homologie ihrer Proteinsequenz auf. Obwohl die HA-Synthasen auch untereinander eine ähnliche Struktur aufweisen, befinden sich die für HAS1-3 kodierenden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen [85]. Während der Entwicklung zeigen HAS1-3 in Abhängigkeit des Gewebes und der Embryonalphase unterschiedliche Expressionsmuster auf. So besitzt die HAS2 eine besondere Bedeutung bei

Einleitung

der Herz- und Blutgefäßentwicklung, was zu einem frühzeitigen Versterben *Has2*-defizienter Embryonen führt. Die zu Grunde liegende Fehlentwicklung des Herz-Kreislauf-Systems wird in *Has1*- und *Has3*-defizienten Embryonen nicht beobachtet.

1.8.3 Abbau der Hyaluronsäure

Der enzymatische Verdau von HA wird im Körper über spezifische Hyaluronidasen (HYALs) katalysiert. Durch die Hydrolyse der β 1-4-glykosidischen Bindungen zwischen GlcNac und GlcA entstehen dabei HA-Fragmente verschiedener Kettenlängen. Im Säugetierorganismus wurden bisher sechs verschiedene HYALs entdeckt: HYAL I-IV, PH-20 und HYALP1 [86, 87]. Unter den Hyaluronidasen sind HYAL I und II am besten charakterisiert: HYAL I ist ein lysosomales Enzym, das überwiegend in der Leber, Milz, Herz und Niere exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird HYAL II, mit Ausnahme des Gehirns, ubiquitär exprimiert. Eine Gemeinsamkeit der beiden Enzyme ist, dass sie ein pH-Optimum im sauren Bereich besitzen. Im Gegensatz zur HYAL I spaltet HYAL II jedoch nur hochmolekulare HA auf, wobei Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 20 kDA entstehen [88].

1.8.4 Hyaluronsäure-Rezeptoren und -Bindeproteine

HA kann mit einer Vielzahl so genannter HA-Bindeproteine interagieren. Dazu zählen unter anderem CD44 [89] und *Receptor For Hyaluronan Mediated Motility* (RHAMM bzw. HMMR) [90], die Proteoglykane Aggrecan, Brevican, Neurocan und Versican [91], sowie TLR-2 und -4 [92], *Serum-derived Hyaluronan-Associated Protein* (SHAP) [93], *Hyaluronan Receptor For Endocytosis* (HARE) [94], *TNF-Stimulated Gene 6 Protein* (TSG-6) [95] und *Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor* (LYVE-1) [96].

1.8.5 Rolle von Hyaluronsäure in der Angiogenese

In Abhängigkeit der untersuchten Konzentration sowie Molekülgröße kann HA sowohl stimulierend, als auch inhibierend auf den Prozess der Angiogenese einwirken.

Die exogene Applikation von HA-Degradationsprodukten, die aus 3-10 Disaccharid-Einheiten bestehen (oligomere HA), kann zu einer Stimulation der Proliferation [97], [98, 99] und Migration [100] von Endothelzellen, der Ausbildung endothelialer Verzweigungen [101] und Angiogenese *in vivo* führen [100], [102]. Diese Effekte werden über eine Interaktion mit den Rezeptoren CD44 und RHAMM vermittelt. Demgegenüber steht eine anti-proliferative, anti-migratorische und anti-angiogene Wirkung hochmolekularer HA [103].

Obwohl die pro-angiogenen Eigenschaften von oligomerer HA durch mehrere Studien belegt wurden, sind diese Versuche fast ausschließlich mit exogen-applizierter HA durchgeführt worden. Über die Bedeutung des endogenen HA-Systems im Kontext der Angiogenese ist hingegen weitaus weniger bekannt.

In einem experimentellen Modell der Tumor-Angiogenese konnte eine signifikant verminderte Gefäßdichte in Tumoren von *CD44*-defizienten Mäusen festgestellt werden, was mit einer Inhibition des Tumorwachstums einherging [81]. Mithilfe von Knochenmarktransfer-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp in erster Linie durch eine verminderte Migration und Proliferation des Endothels vermittelt wurde. Interessanterweise konnte jedoch kein Unterschied in der Wundheilung zwischen *CD44*-defizienten und Wildtyp (WT) Mäusen festgestellt werden.

1.8.6 Rolle von Hyaluronsäure in der Arteriogenese

1.8.6.1 Einfluss von Hyaluronsäure auf die endotheliale Glykokalyx

Es kann angenommen werden, dass HA als eine wichtige Komponente der EZM in mehrere Schritte des Arteriogenese-Prozesses involviert ist. Unter normalen Flussbedingungen ist das Gefäßendothel von einer kohlenhydrathaltigen Schicht, der Glykokalyx bedeckt, welche HA als wichtigen Bestandteil enthält. Wird im Rahmen von Gefäßverschlüssen ein erhöhter Scherstress auf kollaterale Endothelzellen ausgeübt, so wird die Glykokalyx abgestoßen. Infolgedessen werden endotheliale Aktivierungsmarker freigelegt, die eine erleichterte Adhäsion von Immunzellen am Endothel ermöglichen.

In einer Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass es nach Ischämie/Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Glykokalyx kommt, was einen Gefäßschaden induzierte. Durch die intravenöse Applikation von HA konnte dieser Schaden signifikant reduziert werden [104], [105].

1.8.6.2 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Rekrutierung von Immunzellen

Auch die Rekrutierung von Immunzellen im Rahmen der Angiogenese und Arteriogenese könnte durch das HA-System beeinflusst werden. Niedermolekulare HA kann entzündliche Prozesse unterstützen, indem sie Monozyten über die Bindung an TLR4 aktiviert [106], [107]. Zudem kann HA als Adhäsionsmolekül fungieren und somit die Anreicherung von Immunzellen, wie Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten in Entzündungsherden begünstigen [108], [109], [110].

1.8.6.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Proliferation und Migration von vaskulären Zellen

Die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen ist für die Erweiterung des Durchmessers von Arteriolen zu funktionellen Kollateralarterien von entscheidender Bedeutung. Die Behandlung von aortalen, glatten Muskelzellen mit 4-Methylumbelliferon (4-MU), einem Inhibitor der HA-Synthese, führte zur Hemmung der Migration und Proliferation *in vitro* [111]. Die Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen kann ebenfalls durch eine reduzierte siRNA vermittelte mRNA-Expression der HAS2 erzielt werden [112]. Dass auch die HAS3 einen Einfluss auf das Verhalten von glatten Muskelzellen hat, konnte von Kiene *et al.* gezeigt werden: In einem experimentellen Modell der Karotisstenose bildeten *Has3*-defiziente Mäuse eine im Vergleich zu WT Mäusen signifikant verminderte Neointima-Hyperplasie aus [113]. Dieser Phänotyp wurde durch eine reduzierte PDGF-BB-vermittelte Migration der glatten Gefäßmuskelzellen erklärt.

1.8.6.4 Hyaluronsäure im Kontext ischämischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen

In einer Untersuchung von Xi *et al.* wurde der Zusammenhang zwischen HA-Plasmaspiegeln und dem Ausmaß der koronaren Kollateralen bei Patienten mit KHK untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass erhöhte HA-Plasmaspiegel mit einer signifikant verbesserten Versorgung mit koronaren Kollateralen korrelieren [114].

Nach unilateraler HLI wurde überdies eine erhöhte Expression des membranständigen HA-Rezeptors CD44 in wachsenden Kollateralen des ischämischen Hinterlaufs festgestellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *CD44*-defiziente Mäuse 7 Tage nach unilateraler HLI eine signifikant verschlechterte Wiederherstellung der Perfusion im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten [115].

1.9 Zielsetzung

Trotz intensiver Bemühungen auf dem Gebiet der Prävention und Therapie von ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, ist eine unzureichende Vaskularisierung des Patienten nach wie vor Therapie-limitierend. Eine funktionelle Revaskularisierung im Sinne der Angiogenese oder Arteriogenese könnte insbesondere im Kontext ischämischer Ereignisse zu einer schnellen Re-Oxygenierung des Gewebes beitragen und somit langfristige Folgeschäden vermeiden.

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, in wie weit das endogene HA-System zu einer Modulation von Angiogenese bzw. Arteriogenese beiträgt.

In diesem Zusammenhang könnte die HAS3 ein interessantes *Target* darstellen, da bereits im Kontext verschiedener Gefäßpathologien funktionelle Relevanz nachgewiesen wurde. In einem Mausmodell der Atherosklerose wurde beispielsweise festgestellt, dass die HAS3 wesentlich zu der Entstehung atherosklerotischer Läsionen beiträgt, indem sie die Plaque-Inflammation moduliert [116]. Interessanterweise wurde in einem Modell der arteriellen Gefäßstenose darüber hinaus gezeigt, dass die HAS3 auch einen Einfluss auf die Migration glatter Muskelzellen hat [113]. Da sowohl Angiogenese als auch Arteriogenese durch Entzündungsprozesse *getriggert* werden, und die Migration von glatten Muskelzellen insbesondere für die Expansion von Kollateralen entscheidend ist, ist eine Beeinflussung dieser Prozesse durch die HAS3 naheliegend.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher spezifisch der Einfluss der HAS3 auf Blutgefäßneubildung durch Angiogenese und die Erweiterung bereits bestehender Kollateralgefäße durch Arteriogenese untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *Has3*-defiziente Mäuse und entsprechende WT in zwei unterschiedlichen Modellen der operativ-induzierten HLI untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die beschriebenen Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen unter den Aktenzeichen Az.84-02.04.2012.A292/ Az.84-02.04.2016.A006 genehmigt und unter Berücksichtigung tierschutzgesetzlicher Vorgaben durchgeführt. Die Haltung sowie Zucht der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Versuchstiere wurden in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und erhielten entkeimtes Wasser und Futter *ad libitum*.

2.1.1 Verwendete Tiere

Alle beschriebenen Experimente wurden an 16 - 20 Wochen alten männlichen Mäusen durchgeführt.

2.1.1.1 Ubiquitäre *Has3*-defiziente Maus

Die ubiquitäre *Has3*-defiziente Maus (*Has3 Knockout* (KO)) wurde von der Firma genOway (Lyon Cedex, Frankreich) generiert [113] und für mehr als 6 Generationen auf C57BL/6J-Hintergrund (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) zurück gekreuzt. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Wurfgeschwister oder C57BL/6J-Mäuse von Janvier (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) eingesetzt.

2.1.1.2 Endothelzell-spezifische *Has3*-defiziente Maus

Die Endothelzell-spezifische *Has3*-defiziente Maus (end-SCL-*Has3* KO) wurde mithilfe von (end)-SCL-Cre-ER^T-Mäusen generiert, die freundlicherweise von Herrn Professor J. Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt wurden [117]. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines endothelialen Transkriptionsverstärkers für den Stammzell-Leukämie-Lokus (*5' endothelial enhancer of the stem cell leukemia locus*). Durch die Verpaarung der end-SCL-CreER^T-Maus mit einer geflochtenen *HAS3*-knockin Maus wurde eine end-SCL-Cre^{+/-} / *HAS3*^{flox/flox}-Maus generiert. Die Cre-Rekombinase ist in diesen Mäusen mit einer mutierten Östrogenbindungsdomäne fusioniert. Erst die Applikation von Tamoxifen induziert eine auf Endothelzellen beschränkte, zielgenaue Translokation der Cre-Rekombinase in den Nukleus, wo die geflochtenen Gensequenzen (das geflochte *HAS3*-Gen) erkannt und selektiv herausgeschnitten werden. Für die beschriebenen Versuche wurde der *Knockdown* durch die intraperitoneale Applikation von Tamoxifen induziert: über einen Zeitraum von 14 Tagen erhielten sowohl end-SCL-Cre^{+/-}- als auch end-SCL-Cre^{+/-} / *Has3*^{flox/flox} Mäuse alle zwei Tage eine Dosis von 2 mg Tamoxifen. Zur Vermeidung von unspezifischen Tamoxifen-Effekten wurden die Mäuse einer dreiwöchigen Auswaschphase unterzogen, bevor sie für weitere Experimente eingesetzt wurden.

2.1.2 Kritisches Hinterlaufschämie-Modell

Um die Effekte einer *Has3*-Deletion auf den Prozess der Angiogenese zu untersuchen wurde das HLI-Modell nach Driesen *et al.* angewendet [118]. Die Mäuse wurden vor dem Eingriff gewogen und durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus (S)-Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Karlsruhe) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht, Bayer HealthCare, Leverkusen) narkotisiert. Nach Enthaarung des Operationsbereichs vom Becken bis zum Knöchel wurden die Mäuse auf einen 37 °C warmen Operationstisch fixiert und die Narkose über die Beatmung mit 1,5 % Isofluran (Actavis, München) aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde über den gesamten Zeitraum mithilfe einer Rektalsonde kontrolliert. Nach Desinfektion des linken Hinterlaufs mit Povidon-Iod-Lösung (Mundipharma, Limburg) wurde das Operationsgebiet über eine Inzision vom Kniegelenk bis zum Leistenbereich eröffnet. Die *Arteria femoralis* wurde von der *Vena femoralis* an insgesamt 4 Stellen separiert und von umliegenden Faszien freigelegt. Dann wurden die Ligaturfäden vorsichtig unter der Arterie durchgezogen und mit einem Doppelknoten fest verschlossen. Die genaue Lokalisation der Ligaturen kann Abbildung 10 entnommen werden. Die erste Ligatur wurde unmittelbar proximal zum Abgang der *Arteria tibialis anterior* positioniert. Die zweite Ligatur wurde etwa 1 cm distal und die 3. Ligatur 1 cm proximal zum Abgang der *Arteria epigastrica superficialis* gesetzt. Etwa 1 mm proximal zur 3. Ligatur wurde eine 4. Ligatur platziert. Zur vollständigen Induktion der HLI wurde die Arterie anschließend zwischen der 3. und 4. Ligatur durchtrennt und zwischen der 1. und 2. Ligatur komplett exzidiert. Abschließend wurde der Hautschnitt mit einem chirurgischen 7-0 PROLENE®-Faden (Ethicon, Norderstedt) vernäht. Die postoperative Analgesie erfolgte über die subkutane Injektion von Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht, Rimadyl®, Pfizer, Karlsruhe).

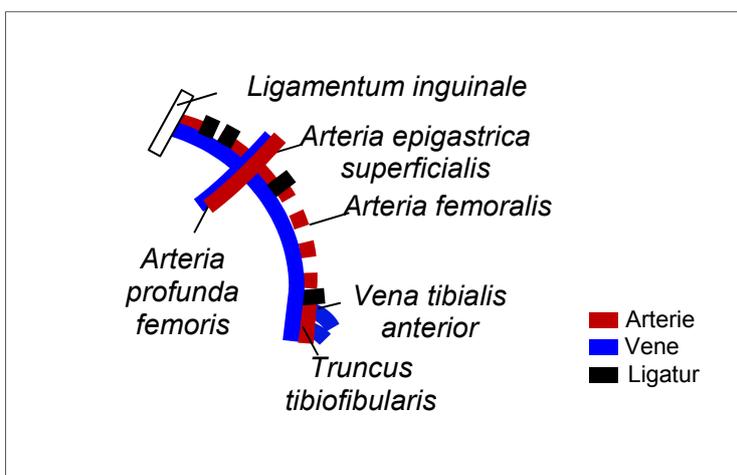


Abbildung 10: Schema zur Ligatur und Exzision der *Arteria femoralis*.

2.1.3 Mildes Hinterlaufschämie-Modell

Zur Induktion einer mildereren HLI wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hellingman *et al.* angewendet [119]. Die Mäuse wurden zunächst mit einer Dreifachkombination aus Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht, Actavis, München), Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht, Domitor®, Orion Pharma, Hamburg) und Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht, Ratiopharm, Ulm) narkotisiert. Nach Enthaarung des Operationsbereichs vom Becken bis zum Knöchel wurden die Mäuse auf einen 37 °C warmen Operationstisch platziert. Darüber hinaus wurde die Körpertemperatur der Mäuse über den gesamten Zeitraum mithilfe einer Rektalsonde kontrolliert. Nach Desinfektion des linken Hinterlaufs mit Povidon-Iod-Lösung (Mundipharma, Limburg) wurden zwei kleine Hautschnitte (etwa 0,5-1 cm) im Leistenbereich und unterhalb des Kniegelenks gesetzt. Im Leistenbereich wurden *Arteria femoralis* und *Vena femoralis* vorsichtig von umliegenden Faszien befreit und mithilfe zweier Mikropinzetten voneinander separiert. Die *Arteria femoralis* wurde dann mithilfe einer Mikropinzette angehoben und mit einem Hochtemperatur-Kauter der Firma Faromed (Berlin) elektrokoaguliert. Nach demselben Prinzip wurde daraufhin eine zweite Okklusion proximal zum Abgang der *Arteria tibialis anterior* gesetzt. Die genaue Lokalisation der Okklusionspunkte kann Abbildung 11 entnommen werden. Der Wundbereich wurde anschließend mit einem chirurgischen 7-0 PROLENE®-Faden (Ethicon, Norderstedt) vernäht. Die Antagonisierung der Narkose bzw. postoperative Analgesie erfolgte mit einer Kombination aus Flumazenil (0,7 mg/kg Körpergewicht, Ratiopharm, Ulm), Atipamezol (3,3 mg/kg Körpergewicht, Antisedan®, Orion Pharma) und Buprenorphin (0,2 mg/kg Körpergewicht, Temgesic®, Indivior UK Ltd., Slough, Großbritannien). Die Mäuse wurden bis zur vollständigen Wiederherstellung der Vigilanz auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte positioniert.

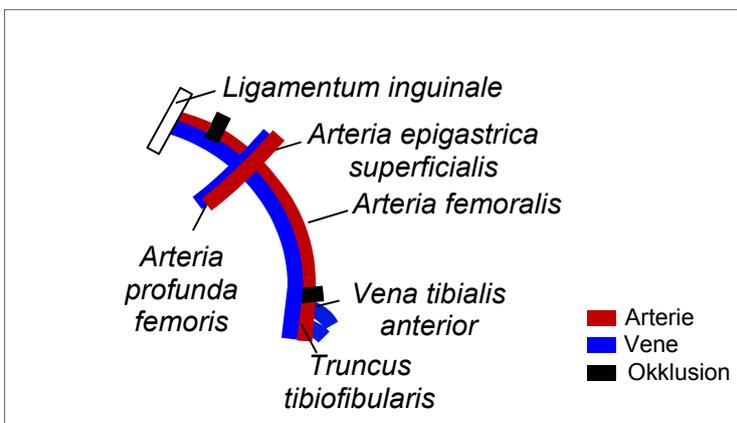


Abbildung 11: Schema zur Elektrokoagulation der *Arteria femoralis*.

2.1.4 Laser-Doppler-Perfusionsmessung

Die Laser-Doppler-Perfusionsmessung (LDPI) ist ein bildgebendes Verfahren zur nicht-invasiven Untersuchung der Mikrozirkulation. Diese Messtechnik wurde zur Untersuchung des Blutflusses vor bzw. nach operativ-induzierter HLI angewendet. Die Messungen erfolgten dabei mit dem *PeriCam PSI System* der Firma Perimed. Die Tiere wurden in Abhängigkeit von der angewandten Operationstechnik (wie unter 2.1.2. oder 2.1.3. beschrieben) narkotisiert und auf einer 37° C warmen Wärmeplatte positioniert. Da Haare die Messung der Mikrozirkulation stören, wurde das Fell im Bereich des unteren Abdomens und der Hinterläufe mit Enthaarungscreme entfernt. Der Laser-Doppler-Messkopf wurde anschließend in einem Abstand von 20 cm zur Wärmeplatte über dem Beckenbereich der Maus positioniert und der zu vermessende Bereich markiert. Es wurden vier Messungen pro Versuchstier durchgeführt. Für die Auswertung der Perfusion wurden die distalen Bereiche des ischämischen (linkes Bein) und nicht ischämischen Hinterlaufs (rechtes Bein) analysiert. Dazu wurden die Bereiche mit der *Software PimSoft* (Perimed, Barsinghausen) definiert und die Perfusion als prozentuales Verhältnis der *Perfusion Units* von ischämischem zu nicht-ischämischem Hinterlauf dargestellt.

2.1.5 Time-of-Flight-Magnetresonanzangiographie

Die *Time-of-Flight* (TOF)-Magnetresonanzangiographie ist ein diagnostisches Verfahren zur Darstellung der Gefäßmorphologie *in vivo*. Diese Methode wurde in einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Kardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf angewendet und für die Bestimmung des kollateralen Blutvolumens nach operativ-induzierter HLI herangezogen. Alle Messungen sowie deren Auswertungen erfolgten durch Prof. Dr. Ulrich Flögel nach einem Protokoll von Bohring *et al.* [120].

2.1.6 Untersuchung der vaskulären Reagibilität

Die Messung der Flussvermittelten Dilatation (*flow-mediated dilation*, FMD) wurde in Kooperation mit der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf nach einem Protokoll von Schuler *et al.* durchgeführt [121]. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert und der rechte Hinterlauf einschließlich der Leistengegend enthaart. Daraufhin wurden die Tiere auf einem Wärmetisch positioniert und eine Druckmanschette am Hinterlauf angelegt. Nach 15-minütiger Äquilibrationszeit und Darstellung der *Arteria femoralis* mittels Ultraschallsonde, wurde eine 5-minütige Okklusion und temporäre Ischämie des distalen Hinterlaufs induziert. Im Anschluss an die Deflation der Manschette erfolgte die sequentielle Messung des Gefäßdurchmessers sowie der arteriellen Flussgeschwindigkeit über einen Zeitraum von 3 Minuten. Alle Messungen sowie deren Auswertung wurden von Herrn Dr. Dominik Schuler durchgeführt.

2.1.7 Probenentnahme und -aufarbeitung

2.1.7.1 Blutentnahmen zur Generierung von EDTA-Plasma

Die Blutproben wurden durch Punktion des rechten Ventrikels gewonnen und mit einer 100 mMolaren EDTA-Lösung antikoaguliert. Nach Zentrifugation bei 3000 *rpm* für 15 min und 4 °C wurden die Überstände in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei 13.000 *rpm* für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.1.7.2 Entnahme der Retinae

Zur Analyse der Retina-Vaskularisierung wurden die Augen von 17 - 18 Wochen alten *Has3-defizienten* und WT Mäusen verwendet. Nach Entnahme der Augen wurden diese zunächst für 2 Stunden in Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Retinae nach einem Protokoll von Pitulescu *et al.* frei präpariert [122] und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelagert.

2.1.7.3 Perfusionsfixation der Muskeln

Die Perfusionsfixation der Unterschenkel- und Oberschenkelmuskeln wurde nach einem modifizierten Protokoll von Limbourg *et al.* durchgeführt [123]. Alle verwendeten Lösungen wurden vor dem Versuch auf 37 °C erwärmt, um eine Vasokonstriktion des Gefäßsystems während der Perfusion zu verhindern. Zudem wurden die Tiere vor Eröffnung des Thorax mit 500 I.E. Heparin (Ratiopharm, Ulm) antikoaguliert und mit (S)-Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Der Thorax wurde eröffnet, der linke Ventrikel mit einem *Butterfly* kanüliert und das Tier über Eröffnung der *Vena cava* entblutet. Die Perfusionslösungen wurden dann mithilfe einer Schlauchpumpe der Firma ISMATEC und einer Flussrate von 14 ml/min über den linken Ventrikel in den Blutkreislauf eingeleitet. Die Tiere wurden mit 15 ml einer Antikoagulationslösung (Heparin in isotonischer NaCl-Lösung) gefolgt von 15 ml einer 0,3 %-igen Adenosinlösung (Adrekar® in isotonischer NaCl-Lösung) perfundiert. Nachdem das Blut restlos aus dem Gefäßsystem ausgewaschen war, erfolgte die eigentliche Fixierung der Gewebe durch die Perfusion mit 15 ml Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe).

2.1.7.4 Entnahme der Muskeln für histologische Untersuchungen

Nach der Perfusionsfixation der Mäuse wurden sowohl Oberschenkel- als auch Unterschenkelmuskeln nach einem Protokoll von Limbourg *et al.* für histologische Untersuchungen entnommen [123]. Die Hinterläufe wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Haut ausgehend vom Sprunggelenk bis zur Leiste entfernt. Dann wurden die medialen Oberschenkelmuskeln und die Unterschenkelmuskeln bestehend aus *Musculus gastrocnemius*, *Musculus plantaris* und *Musculus soleus* entnommen. Zur Vermeidung von Gefrierartefakten wurden die entnommenen Muskeln über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 4 °C entwässert. Dafür wurden die Muskelgruppen zunächst für 24 Stunden in einer 15 %-igen Saccharose-Lösung gelagert und anschließend für weitere 24 Stunden in eine 30 %-ige Saccharose-Lösung überführt. Daraufhin wurden die Muskeln in Einbett-Zylindern der Firma Oehmen Labortechnik mit KP-CryoCompound Frozen Tissue Medium® bedeckt und schließlich in vorgekühltem Isopentan eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C.

2.1.7.5 Entnahme der Unterschenkelmuskeln für Genexpressionsanalysen

Zur Analyse der Genexpression wurden die Unterschenkelmuskeln bestehend aus *Musculus gastrocnemius*, *Musculus plantaris* und *Musculus soleus* mit RNase-freiem Besteck entnommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2 Histologie und Immunhistochemie

2.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Puffer und Lösungen in der Immunhistochemie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Firma
0,1 % Tween-PBS-Lösung	0,1% Tween in PBS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blockierlösung	20 mM Tris 137 mM NaCl 10 % fetales bovines Serum (FBS) 1 % bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O pH 7,4	
Tris-Puffer (TB)	50 mM Tris pH 7,6	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2.2 In der Immunhistochemie verwendete Antikörper und Bindeproteine

Tabelle 2: Eingesetzte Antikörper und Bindeproteine in der Immunhistochemie

angefärbte Strukturen	Antikörper/ Bindeprotein	Verdünnung*	Katalog- nummer	Firma
Gefäße Unterschenkelmuskeln	Rat anti-mouse CD31	1:100	ab7388	Abcam, Cambridge, Großbritannien
	Goat anti-rat Rhodamine Red X	1:100	112-295- 167	Dianova, Hamburg, Deutschland
	Rabbit anti-mouse α - smooth muscle actin	1:100	ab5694	Abcam, Cambridge, Großbritannien
	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:100	ab150077	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Leukozyten Unterschenkel- muskeln	Rabbit anti-mouse CD45	1:200	ab10558	Abcam, Cambridge, Großbritannien
	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:200	ab150077	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Retinagefäße	Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 488 Conjugate	1:200	I21411	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

* Primär-Antikörper wurden mit BSA-Lösung verdünnt

* Sekundär-Antikörper wurden mit PBS verdünnt

2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung von 10 μM dicken Gefrierschnitten erfolgte an einem Leica CM1850-Kryostaten (Leica Biosystems Nussloch GmbH). Zur Definition der Schnittebenen wurde dabei auf ein Protokoll von Driesen *et al.* zurückgegriffen [118]. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.4 Färbungen

Die Inkubation von Gefrierschnitten mit Antikörper- oder Blockierlösungen erfolgte in einem feuchten Kammersystem. Zwischen den Inkubations-Schritten wurden die Schnitte dreimalig für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

2.2.5 Anfärbung von Gefäßstrukturen in Unterschenkelmuskeln

Zur Darstellung von Gefäßstrukturen wurde eine Doppelfärbung für die Marker CD31 (Endothelzellen) und glattes Muskelzell-Aktin ($\alpha\text{-SMA}$, glatte Muskelzellen) durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Antikörper und eingesetzten Konzentrationen kann Tabelle 2 entnommen werden.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 20 min in Aceton (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte anschließend für eine Stunde mit Blockierlösung (siehe Tabelle 1) behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper *Rat anti-mouse* CD31 über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Negativkontrolle wurde 1 % BSA in PBS eingesetzt. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper *Goat anti-rat* Rhodamine Red X für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung von glatten Muskelzellen erfolgte durch die Inkubation mit *anti-mouse/rabbit α -smooth muscle actin* für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundär-Antikörper *Goat Anti-Rabbit* IgG H&L Alexa Fluor® 488. Eine Kernfärbung wurde mit dem Eindeckmedium Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) durchgeführt.

2.2.6 Anfärbung von Leukozyten in ischämischen Unterschenkelmuskeln

Zur Analyse der Leukozytenzahl in ischämischen Unterschenkelmuskeln wurde eine immunhistochemische Anfärbung des Markers CD45 durchgeführt. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 10 min in Roti®-Histofix 10 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) bei 4 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung des fixierten Gewebes mit 0,1 % Tween in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte anschließend für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper *anti-mouse/rabbit* CD45 (siehe Tabelle 2) behandelt. Als Negativkontrolle wurde 1 % BSA in PBS eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1 % Tween-PBS-Lösung wurden die Schnitte daraufhin mit dem Sekundärantikörper *anti-rabbit* Alexa Fluor 488 (siehe Tabelle 2) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich mit dem Medium Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt.

2.2.7 Untersuchung der Retina-Vaskularisierung

Zur Analyse der Retina-Vaskularisierung wurden die Retinae zunächst für 30 min mit einer 1 %-igen BSA-Lösung, der 0,2 % Triton-X100 zugesetzt wurde, permeabilisiert und mit Isolectin Alexa Fluor® 488 *Conjugate* (GS-IB4 *From Griffonia simplicifolia*, ThermoFisher) über Nacht bei 4 °C gefärbt. Danach wurden die Retinae 3-mal gewaschen und radial eingeschnitten. Die Präparate wurden schließlich auf Objektträgern mit VECTASHIELD *Mounting Medium for fluorescence* (Vector laboratories) eingedeckt. Um die gesamte Retina mikroskopisch zu erfassen, wurden Mosaikaufnahmen mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) angefertigt. Für die weiteren Bildanalysen wurden zirkuläre Bereiche jeder Retina mit dem Programm *ImageJ* definiert, welche im Anschluss mit dem Programm *AngioTool* ausgewertet wurden [124]. Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Bildanalyse einer WT Retina. Ausgehend von den zirkulären Bereichen wurde für die entsprechenden Parameter ein Mittelwert pro Retina ermittelt. Insgesamt wurde die Vaskularisierung von jeweils 6 *Has3*-defizienten und 6 WT Retinae miteinander verglichen.

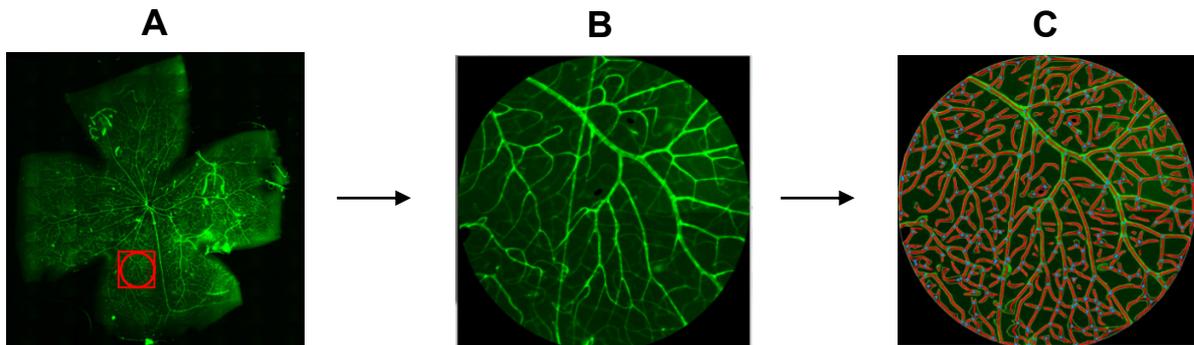


Abbildung 12: Bildbearbeitung zur Analyse der Retina-Vaskularisierung.

A, Mosaikaufnahme einer Isolectin-B4-gefärbten Maus-Retina. **B**, mit dem Programm *ImageJ* definierter zirkulärer Bereich. **C**, Markierung der Gefäßstrukturen mit dem Programm *Angio-Tool*.

2.3 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Analysen erfolgten entweder am Gallios™ Durchflusszytometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) oder an einem BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen in der Durchflusszytometrie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Firma
<i>CO₂-independent medium</i>		Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
1 % Glutaminlösung in <i>CO₂-independent medium</i>	Glutamin (200mM)	1% Glutamin (200mM) Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Heparin-PBS-Lösung	Heparin (0,4% 5000 I.E./ml) in PBS	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Hypotone Lösung	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	
Isotonischer FACS-Puffer	Coulter® Isoton II Diluent	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
1 % PFA-Lösung	10 % Roti®-Histofix 10 % in PEB-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase-Dispase-Lösung	2 mg/ml Kollagenase II (= 600 U) 2,4 U/ml Dispase II 250mM CaCl ₂ 1% Glutamin (200mM) In <i>CO₂-independent medium</i>	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
PEB-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % BSA in PBS	
RPMI-Medium	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien

2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung von Muskeln

Die durchflusszytometrische Analyse von Immunzellpopulationen in stark vaskularisierten Kompartimenten wie dem Unterschenkel- bzw. Oberschenkelmuskel erfordert eine ausreichende Befreiung des Gewebes von Blutresten. Zu diesem Zweck wurde der Blutkreislauf der Mäuse direkt nach der Tötung mit einer Heparin-PBS-Lösung durchspült. Daraufhin wurden die kompletten Unterschenkel- oder Oberschenkelmuskeln entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung in *CO₂-independent medium* (Gibco) mit 1 % Glutamin (siehe Tabelle 3) gelagert. Die Muskeln wurden anschließend in einer Kollagenase-Dispase-Lösung (siehe Tabelle 3) für zwei Mal 30 min unter ständiger Rotation (MACs Rotator®) verdaut. Nach 30-minütigem Verdau wurden die Muskeln mit einer Schere und Pinzette in mehrere Gewebestücke zerteilt. Zur Entfernung großer Muskelzellen und unverdauter Gewebereste wurde die Zellsuspension anschließend mit PEB-Lösung (siehe Tabelle 3) durch einen 100 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Solingen) filtriert. Das Filtrat wurde ein weiteres Mal durch einen 40 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One) gepresst. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurden die Zellen in RPMI-Medium (siehe Tabelle 3) aufgenommen und für 30 min unter ständiger Rotation durchmischt. Schließlich wurde das Zellpellet in isotonischem FACS-Puffer (siehe Tabelle 3) aufgenommen und für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt (siehe Tabelle 4). Zur Berechnung der absoluten Zellzahl wurden Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit der Kaluza® Flow Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Zunächst wurden Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen und die einzelnen Zellen zur weiteren Analyse ausgewählt. Mithilfe der Isotyp-Kontrollen erfolgte die Abgrenzung der entsprechenden *Gates*. Ein repräsentatives *Gating*-Schema für die Analyse der Unterschenkelmuskeln kann Abbildung 13 entnommen werden. Analysiert wurde die absolute Zellzahl pro mg Muskelgewebe der Leukozyten (CD45⁺), neutrophilen Granulozyten (CD45⁺Ly6G⁺) und Makrophagen (CD45⁺Ly6G⁻F4/80⁺).

Die Analyse der Oberschenkelmuskeln erfolgte nach einem leicht modifizierten Schema (siehe Abbildung 14). Analysiert wurde die absolute Zellzahl pro mg Muskelgewebe der Leukozyten (CD45⁺), myeloiden Leukozyten (CD45⁺CD11b⁺), neutrophilen Granulozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺) und Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻F4/80⁺).

Material und Methoden

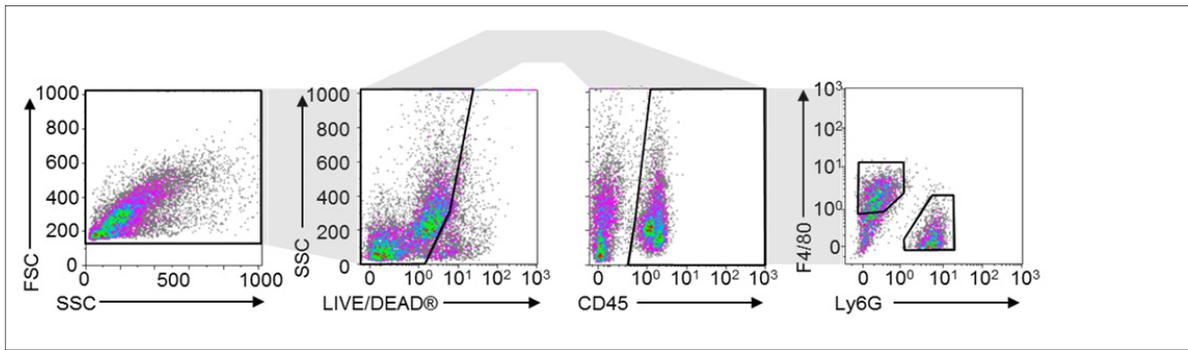


Abbildung 13: *Gating*-Schema für Leukozyten im Unterschenkelmuskel.

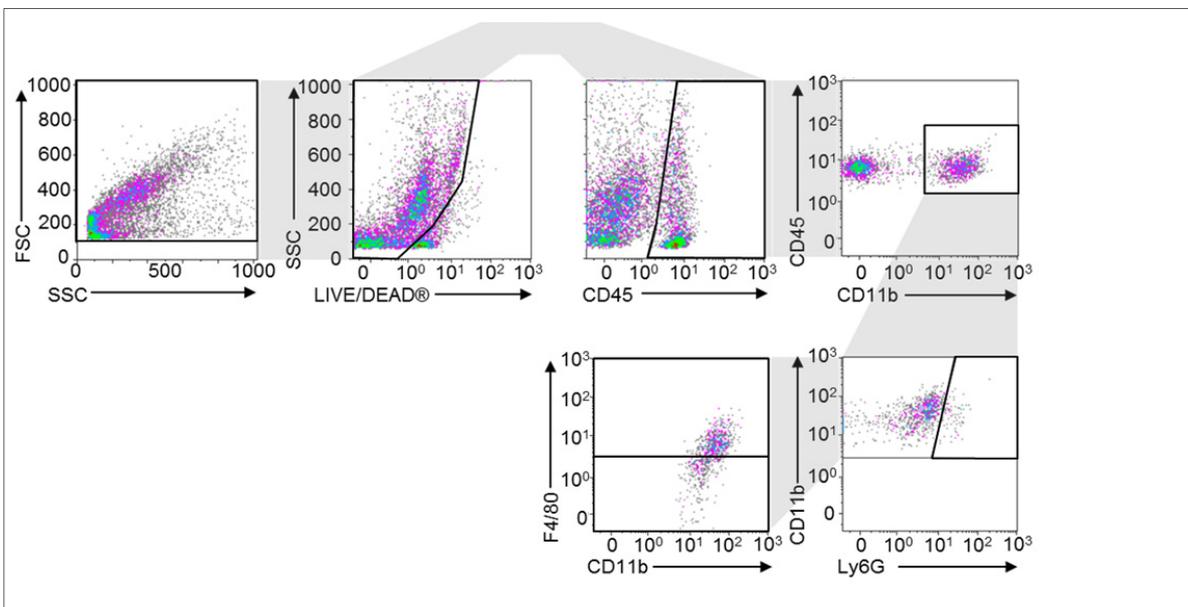


Abbildung 14: *Gating*-Schema für Leukozyten im Oberschenkelmuskel.

2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut

Das für die durchflusszytometrische Analyse verwendete Blut wurde durch kardiale Punktion gewonnen und mit EDTA antikoaguliert. Die Aufbereitung der Proben erfolgte in Abhängigkeit der untersuchten Immunzellpopulationen (siehe 2.3.3.1 und 2.3.3.2).

2.3.3.1 Analyse von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut

Zur Analyse der zirkulierenden, neutrophilen Granulozyten und Monozyten wurde das Blut zunächst mit PEB-Puffer verdünnt und auf zwei Fraktionen aufgeteilt. Um unspezifische Antikörperbindungen zwischen den FC γ -Rezeptoren (CD16 und CD32) auf den untersuchten Zellen mit der FC-Domäne der verwendeten IgG-Antikörper zu vermeiden, wurden die Proben vor der eigentlichen Färbung mit einem CD32/16-Antikörper für 10 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde bei der ersten Fraktion die eigentliche Antikörper-Färbung durchgeführt (siehe Tabelle 4). Im Anschluss an die Färbung wurden Erythrozyten in beiden Fraktionen durch Zusatz einer eisgekühlten, hypotonen Lösung (siehe Tabelle 3) für 7 min osmotisch lysiert.

Die Zellsuspensionen wurden daraufhin für 10 min bei 750 g und 4 °C zentrifugiert. Zur Fixierung der Oberflächenproteine wurden die Proben anschließend mit PEB-Puffer und 1 % PFA-Lösung (siehe Tabelle 3) für 25 min bei Raumtemperatur versetzt. Nach Zentrifugation bei 750 g und einer Temperatur von 4 °C für 10 min wurden die Zellpellets in PEB-Lösung aufgenommen. Unmittelbar vor der Messung wurde das Probenvolumen mit 200 μ l isotonischem FACS-Puffer ergänzt. Eine ungefärbte Probe wurde mit Flow-Count™ Fluorospheres versetzt.

Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Analysiert wurde die absolute Zellzahl pro μ l Blut der myeloiden Leukozyten (CD11b⁺), neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺Ly6G⁺) und Monozyten (CD11b⁺CD115⁺). Ein repräsentatives *Gating*-Schema kann Abbildung 15 entnommen werden.

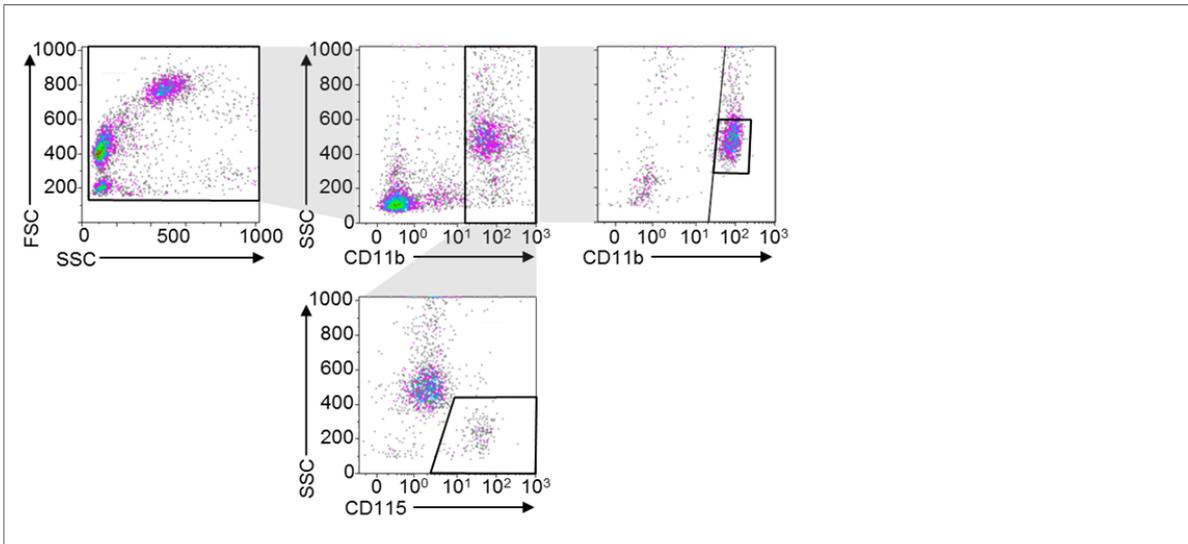


Abbildung 15: Gating-Schema für Monozyten und neutrophile Granulozyten im Blut.

2.3.3.2 Analyse von Lymphozyten im Blut

Zur Untersuchung der zirkulierenden Lymphozyten wurde das Blut zunächst durch osmotische Lyse von Erythrozyten befreit. Zu diesem Zweck wurde das Blut für 7 min unter Eiskühlung mit einer hypertonen Lösung versetzt. Nach Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten wurde die Zellsuspension mit PEB-Puffer verdünnt und auf zwei Fraktionen aufgeteilt. Nach Behandlung der Proben mit einem CD32/16-Antikörper für 10 min bei 4 °C, wurde eine Färbung der ersten Fraktion mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper-Kombinationen durchgeführt. Unmittelbar vor der Messung wurde das Probenvolumen mit 200 µl isotonischem FACS-Puffer ergänzt. Zur Berechnung der genauen Zellzahl wurde der zweiten Fraktion unmittelbar vor der Messung Flow-Count™ Fluorospheres hinzugefügt.

Die Auswertung erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Analysiert wurde die absolute Zellzahl pro µl Blut der Leukozyten (CD45⁺), B-Lymphozyten (CD45⁺CD19⁺), T-Lymphozyten (CD45⁺CD3⁺), T-Helferzellen (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD45⁺CD3⁺CD8a⁺). Repräsentative *Gating*-Schemata können Abbildung 16 (Analyse nach kritischer HLI) und Abbildung 17 (Analyse nach milder HLI) entnommen werden.

Material und Methoden

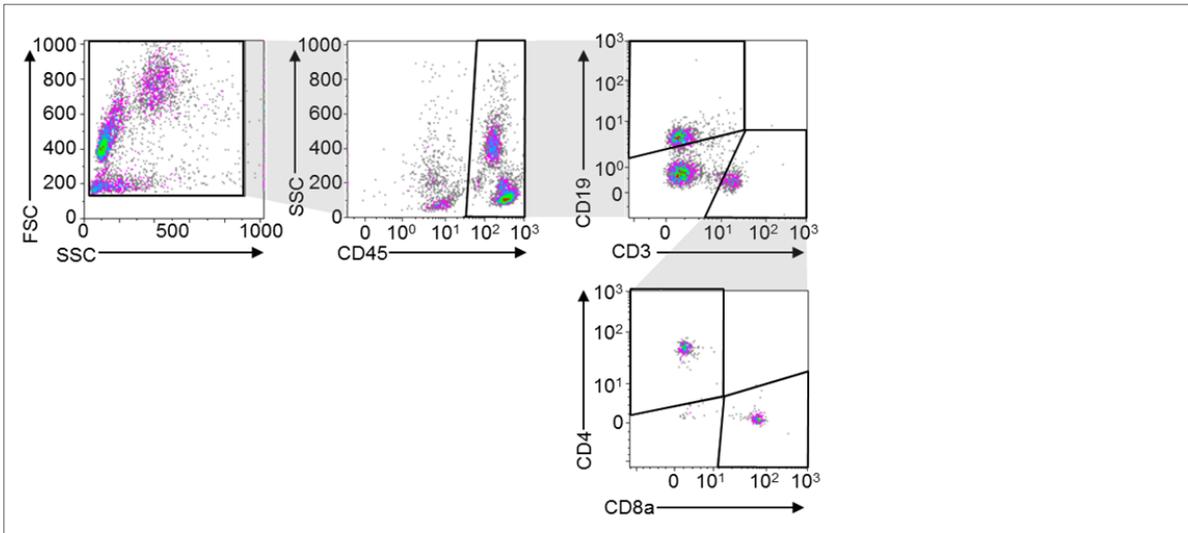


Abbildung 16: Gating-Schema für Lymphozyten im Blut nach kritischer HLI.

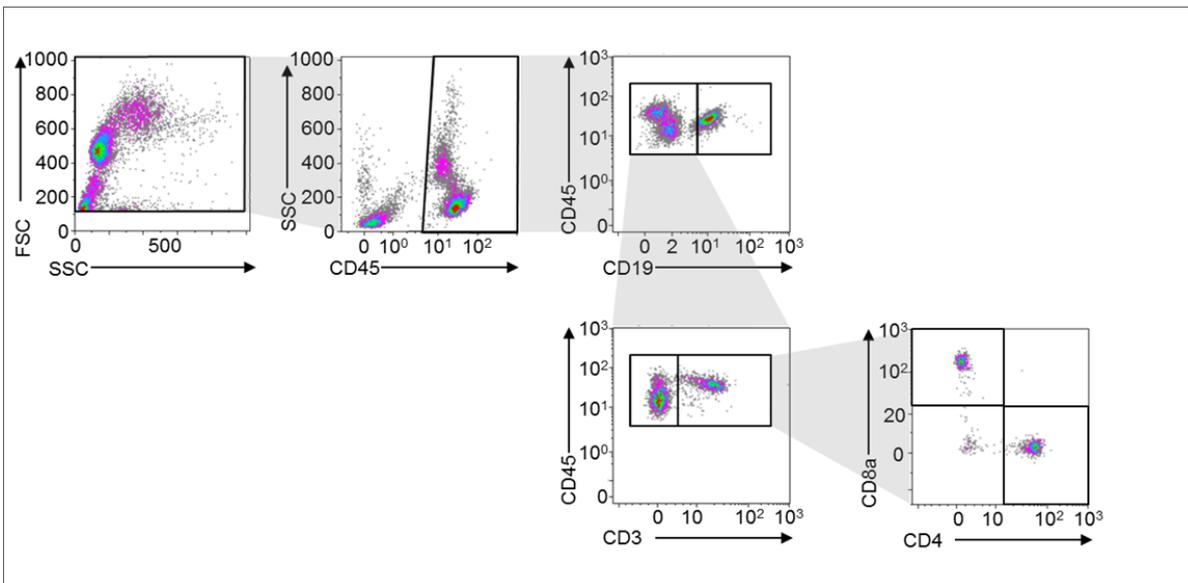


Abbildung 17: Gating-Schema für Lymphozyten im Blut nach milder HLI.

2.3.4 Verwendete Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie

Gewebe	Antikörper-Kombination	Katalog-Nummer	Firma
Muskeln	CCR2-FITC	150608	Biolegend, San Diego, CA, USA
	F4/80-PE	123110	Biolegend, San Diego, CA, USA
	MHCII-PE/Cy7	107630	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD11c-APC	117352	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD45-AlexaFluor® 700	103128	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Ly-6C-APC/Cy7	128026	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Ly-6G-PacificBlue™	127612	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD11b-PE-Dazzle*	101256	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD115-PerCP/Cy5.5*	135526	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Live/Dead-Aqua	L34965	molecular probes®, life technologies™, Eugene, OR, USA
Blut (Monozyten/ Neutrophile Granulozyten)	CD115-APC	171152-82	eBioscience, San Diego, CA, USA
	CD11b-PE	101208	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Ly-6G-PacificBlue™	127612	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Ly-6C-AlexaFluor® 488	128022	Biolegend, San Diego, CA, USA
Blut (Lymphozyten)	CD45-PE	103106	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD19-PacificBlue™	115523	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD3-APC/Cy7	100222	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD4-FITC	11-0042-82	eBioscience, San Diego, CA, USA
	CD8a-AlexaFluor 647	100724	Biolegend, San Diego, CA, USA

* nur bei der Analyse von Oberschenkelmuskeln verwendet

Tabelle 4: Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie

2.4 Zellkulturversuche

2.4.1 Verwendete Substanzen in der Zellkultur

Tabelle 5: Verwendete Substanzen in der Zellkultur

Substanz	Katalog-Nummer	Firma
Endothelial Cell Growth Medium MV	C-22010	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
DPBS	14040091	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Trypsin/EDTA-Lösung	L 2143	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	10566016	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
PenStrep	15140122	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien

2.4.2 Verwendete Zellen

Die Kultivierung der beschriebenen Primärzellen und Zelllinien erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre sowie konstanter Luftfeuchtigkeit. Alle verwendeten Zellen wurden vor Beginn der Versuche im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf auf die Anwesenheit von *Squirrel Monkey Retrovirus* (SMRV) getestet.

2.4.2.1 Humane koronararterielle Endothelzellen (HCAEC)

Zur Untersuchung der Angiogenese *in vitro* wurden humane koronararterielle Endothelzellen (HCAEC) der Firma PromoCell, Heidelberg bezogen. Um eine optimale Vitalität und Proliferationsaktivität der HCAEC zu gewährleisten, ist der Einsatz speziell supplementierter Kulturmedien erforderlich. Aus diesem Grund wurde zur Kultivierung der Zellen ein spezifisches Endothelzellmedium der Firma PromoCell, Heidelberg verwendet. Dieses „*Endothelial Cell Growth Medium MV*“ (PromoCell) wurde mit einem „*Supplement Mix MV*“ (PromoCell) und 1 % PenStrep (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Standardgemäß wurde das Nährmedium alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen bei Erreichen einer 75 %-igen Konfluenz passagiert. Hierzu wurden sie zunächst mit DPBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei vollständiger Abrundung der Zellen wurde die

Material und Methoden

Trypsinierung mit einem äquivalenten Volumen fetalem Kälberserum (FCS) und dem doppelten Volumen ECGM MV gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1100 *rpm* für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in ECGM MV resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Für die weitere Kultivierung wurden die Endothelzellen in einer Dichte von 10000 Zellen pro cm^2 in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.4.2.2 Humane embryonale Nierenzellen

Zur Produktion lentiviraler Vektoren wurden humane embryonale Nierenzellen (Lenti-Pac™ 293Ta) der Firma GeneCopoeia verwendet. Die Zellen wurden in DMEM kultiviert, das mit 10 % hitze-inaktivierten FCS und 1 % PenStrep supplementiert wurde. Aufgrund der starken Proliferationsaktivität wurden die Zellen alle 2-3 Tage mit frischem Nährmedium versorgt und bei Erreichen einer 75 %-igen Konfluenz im Verhältnis 1:4 subkultiviert.

2.4.3 Lentivirale Transduktion von HCAEC

2.4.3.1 Produktion lentiviraler Vektoren

Lentivirale Vektoren werden als wirkungsvolle Werkzeuge zur Einbringung von Fremd-DNA in Säugetierzellen genutzt. Die Nutzung von HIV-basierten Vektoren hat den Vorteil, dass auch nicht-prolierierende und terminal-differenzierte Zellen wie z.B. Neuronen stabil transduziert werden können [125]. Auf diesem Weg ermöglichen sie die Überexpression bzw. Herabregulation eines Gens in unterschiedlichen Säugetierzellen. Die zur Überexpression der *HAS3* in HCAEC verwendeten Vektoren wurden mit einem lentiviralen 4-Plasmid-System der dritten Generation (GeneCopoeia, Rockville, USA) produziert. Das *Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit* der Firma GeneCopoeia besteht aus dem Transfer-Plasmid (oeHAS3- oder Kontroll-Plasmid), dem *HIV packaging mix* (bestehend aus zwei Verpackungs-Plasmiden und einem VSV-Hüllprotein-Plasmid), dem Transfektions-Reagenz *Endofectin* und einem *TiterBoost*-Reagenz zur Erhöhung der produzierten Virusmenge. Für die Virenproduktion wurden $7,5 \times 10^5$ 293Ta-Zellen in D100er Kulturschalen ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von 70 - 80 % transduziert. Je produzierten Vektor wurden zwei 14 ml-Polypropylen-Gefäße mit 200 μl OptiMEM vorbereitet. In das erste Gefäß wurden 2,5 μg des Transfer-Plasmids (z.B. *HAS3oe*-Plasmid bzw. Kontroll-Plasmid) sowie 5 μl des *HIV packaging Mix* (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gegeben. In das zweite Gefäß wurde 1 μl *Endofectin* pipettiert

Material und Methoden

und vorsichtig mit dem *OptiMEM* vermischt. Anschließend wurde die fertige *Endofectin-OptiMEM*-Lösung tropfenweise zu der Plasmid-Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 - 20 min bei Raumtemperatur wurde der Plasmid-*Endofectin*-Komplex tropfenweise auf die 293Ta Zellen gegeben. Nach 15 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml frisches DMEM mit 3 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % PenStrep ersetzt. Zur Steigerung der Virusproduktion wurde schließlich 20 µl *TiterBoost* Reagenz (=1/500 des Gesamtvolumens) tropfenweise zu den Zellen pipettiert und die Kulturschalen vorsichtig geschwenkt. Die Ernte der lentiviralen Partikel im Überstand erfolgte 24 Stunden später. Zu diesem Zweck wurde das Medium bei 500 mg und 20 °C für 10 min zentrifugiert. Zur Entfernung abgeschwommener Zellen wurden die Überstände schließlich durch einen 0,45 µm Poly-Ether-Sulfon-Filter (Whatman® Puradisc 25 syringe filters, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit geringer Protein-Affinität filtriert und zu 200 µl in Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Lagerung der lentiviralen Partikel erfolgte bei -80 °C. Die verwendeten Transferplasmide enthalten eine eGFP-Sequenz, die im Falle einer erfolgreichen Infektion von den Zielzellen transkribiert wird. Zur Bestimmung der Virustiter wurden 293Ta-Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen der produzierten Vektoren in Doppelbestimmung infiziert und nach 72 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.4.3.2 Lentivirale Transduktion

Zur Überexpression der *HAS3* in HACEC wurden die Zellen 24 Stunden zuvor so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Für alle beschriebenen Transduktionen wurde ECGM MV verwendet, das mit 1 % PenStrep supplementiert wurde. Die Zusammensetzung der Transduktionsmedien wurde auf Grundlage einer *Multiplicity of infection (MOI)* von 0,5 berechnet, so dass statistisch jede zweite Zelle von einem Viruspartikel infiziert wurde. Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurde das Medium mit 5 µg/ml Polybrene versetzt. Anschließend wurden gleiche Virustiter des Kontroll- und *HAS3*-Überexpressionsvektors in dem vorbereiteten Medium verdünnt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach mehrmaligen Wasch-Zyklen mit PBS und Mediums-Wechsel 24 und 72 Stunden nach Infektion, wurden die Zellen nach 7 Tagen für die Bestimmung der Genexpression mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab, Erlangen, Deutschland) lysiert (siehe 2.5.1) oder im *Matrigel-Tube-Formation Assay* analysiert (siehe 2.4.3.4). Zur Bestimmung der HA-Sekretion ins Medium wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit frischem Nährmedium kultiviert (siehe 2.4.3.3).

2.4.3.3 HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay

Für die Bestimmung der HA-Sekretion in das Medium wurden die Überstände der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit frischem Nährmedium abgenommen und die Zellen mit Hilfe von 0,1 M NaOH-Lösung lysiert. Die HA-Mengen in den Überständen wurden anschließend mit einem ELISA-ähnlichen Kit (Hyaluronic Acid Test Kit, Corgenix, Broomfield, CO, USA) nach Anweisung des Herstellers analysiert. Die detektierte Menge an HA wurde auf die entsprechende Proteinmenge der Lysate normalisiert. Um auszuschließen, dass bereits im Nährmedium vorhandene HA zu einer Überschätzung der detektierten HA-Mengen in den Überständen führt, wurde die HA-Menge in einer Leerwertkontrolle (Nährmedium, das in Abwesenheit von Zellen parallel für 24 Stunden inkubiert wurde) mit bestimmt und von den Werten, die in den Zellüberständen bestimmt wurden, subtrahiert.

2.4.3.4 Matrigel-Tube-Formation Assay

Um den Einfluss der *HAS3* auf Angiogenese *in vitro* zu untersuchen wurden HCAEC wie unter 2.4.3.2 beschrieben mit einer MOI von 0,5 des leeren Kontroll- bzw. oe*HAS3*-Vektors infiziert und nach 7 Tagen im *Matrigel-Tube-formation Assay* untersucht. Dazu wurden 96-Loch Platten mit 100 µl Matrigel (Corning) befüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die transduzierten Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,025 % EDTA-Lösung abgelöst, mit FCS und ECGM MV versehen und für 5 min bei 1.100 *rpm* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem adäquaten Volumen ECGM MV resuspendiert. Nach Zellzählung wurden 50.000 Zellen pro Bedingung in Doppelbestimmung in je 200 µl ECGM MV aufgenommen und auf das *Matrigel* pipettiert. Die 96-Loch Platten wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Analyse erfolgte im Anschluss mittels Durchlicht-Mikroskopie. Dabei wurden 9 Aufnahmen pro Loch und Bedingung gemacht, welche zur Auswertung später zu einem Gesamtbild zusammengesetzt wurden. Die Anzahl der geschlossen Maschen und Verzweigungspunkte wurde manuell ausgezählt, wobei randständige Bereiche von der Analyse ausgeschlossen wurden.

2.5 Genexpressionsanalysen

2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen und Unterschenkelmuskeln

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus HCAEC wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet [126]. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 1 ml peqGOLD TriFast™ lysiert und zur weiteren Aufarbeitung in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proben wurden mit 200 µl Chloroform vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 15 min bei 20 °C und 13200 *rpm* zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, vorsichtig entnommen und mit einem äquivalentem Volumen Isopropanol gefällt. Die Proben wurden währenddessen bei 4 °C und 13200 *rpm* für eine Stunde zentrifugiert. Die RNA-Pellets wurden mit 1 ml 75 %-igen Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4 °C und 13200 *rpm* zentrifugiert. Nach Trocknung der Pellets wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser gelöst und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Konzentration und Reinheit (Quotient aus 260 nm/280nm) der RNA wurden mithilfe des Nanodrop-UV/VIS Spektrometer (Nanodrop, Peqlab, Erlangen) bestimmt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Unterschenkelmuskeln wurde das Gewebe pulverisiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit dem RNeasy® Microarray Tissue Mini Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

2.5.2 Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA

Zum Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen verwendet. Je analysierter Probe wurden 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben.

2.5.3 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qPCR)

Alle Untersuchungen wurden mithilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems der Firma Life Technologies, Singapore und unter Verwendung des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) mit zugesetztem ROX-Farbstoff durchgeführt. Eine Liste der eingesetzten Primer-Sequenzen kann Tabelle 6 entnommen werden. Für jeden analysierten qPCR-Ansatz wurden die Vorwärts- und Rückwärts-Primer in einer Konzentration von 0,625 µM eingesetzt. Die cDNA wurde in einer Konzentration von 2,083 ng/µl eingesetzt, wobei jede Probe als Duplikat vermessen wurde.

Tabelle 6: verwendete Primer-Sequenzen

Gensymbol	Vorwärts-Primer 5´ - 3´	Rückwärts-Primer 5´ - 3´
18S rRNA	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
hHAS3.2	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCCTAATACACTGCACAC

2.5.4 Genexpressionsanalyse mittels *Microarray*-Technik

Die Genexpressionsanalysen mittels *Microarray*-Technik wurden im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Auftrag gegeben und von Herrn Dr. Rene Dehnen durchgeführt. Beim Vergleich von *Has3*-defizienten gegenüber WT Mäusen wurde die RNA individueller Tiere untersucht.

Genexpressionanalysen mithilfe der *Microarray*-Technik erfordern eine hohe Qualität der RNA-Proben. Aus diesem Grund wurde die Integrität der RNA zunächst mit einem *Agilent 2100 Bioanalyzer* untersucht. Alle Proben wiesen ein hohes Maß an Integrität und wenig Degradation auf.

Die Menge an RNA wurde anschließend mithilfe eines *QbitRNA Assays* der Firma Life Technologies quantifiziert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem *WT Plus Reagent Kit* der Firma Affymetrix, Inc. Dieses Kit ermöglicht die Synthese von biotinylierten cDNA-Fragmenten, welche über die Verwendung eines zweiten Antikörpers detektiert werden können. Zunächst wurden 100 ng der RNA-Probe in cDNA umgeschrieben. Diese wurde daraufhin fragmentiert und endterminal mit Biotin-Resten markiert. Schließlich wurden die biotinylierten cDNA-Fragmente bei 45 °C über einen Zeitraum von 16 Stunden auf einen *Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Gene Expression Microarray* hybridisiert. Zur Detektion wurde

die cDNA schließlich mit einem Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugat inkubiert und die Intensität des Signals mit einem *Plate-Reader* gescannt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm *GeneSpring GX Software (Vers. 12.5; Agilent Technologies)*.

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 Bestimmung zirkulierender Zytokine und Chemokine

Die Untersuchung der Plasmaproben wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-1 α (IL1 α), IL1 β , IL3, IL5, IL6, IL10, IL12 (p40), IL12 (p70), IL13, IL17, Eotaxin, *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF), Interferon-gamma (IFN- γ), *Keratinocyte Chemoattractant* (KC), *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), *Macrophage Inflammatory Protein-1 α* (MIP-1 α), MIP-1 β , *Regulated On Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES) und TNF- α wurde ein kommerziell erhältliches Testsystem der Firma Bio-Rad angewendet (*Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay*). Eine Vermessung der Proben erfolgte mithilfe des *Bio-Plex[®] 200 suspension array* Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die anschließende Auswertung wurde unter Verwendung der *Bio-Plex Manager[™] Software* Version 6.0 durchgeführt.

2.7 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistik-Programm GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) ausgewertet und als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Ausreißer wurden mit Hilfe des Grubb's Test identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Bei der Analyse von zwei Datensätzen wurde ein zweiseitiger *Student's t-Test* angewendet. Beim Vergleich mehrerer Datensätze wurde eine *One-Way ANOVA* mit anschließendem *post-hoc-Test* durchgeführt. Die Kurven zur Wiederherstellung der Perfusion nach kritischer und milder HLI wurden mittels *Two-way ANOVA* auf Signifikanz getestet. Ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der HAS3 auf die Angiogenese im Modell der HLI

Um den Einfluss der HAS3 auf den Prozess der Angiogenese zu evaluieren, wurden 16-20 Wochen alte *Has3*-defiziente und WT Mäuse in einem Modell der kritischen HLI untersucht.

3.1.1 Wiederherstellung der Perfusion nach kritischer Hinterlaufischämie

Nach Ligatur und Exzision der *Arteria femoralis* wurde die Reperfusion der Hinterläufe mithilfe von LDPI-Messungen analysiert. Obwohl sich unmittelbar postoperativ (Zeitpunkt 0) kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennen ließ, wiesen die *Has3*-defizienten Mäuse eine im Verlauf signifikant verschlechterte Wiederherstellung der Perfusion auf (siehe Abbildung 18A). Die im Vergleich zu den WT Mäusen verminderte Perfusion konnte sowohl in der frühen Reperfusions-Phase an Tag 2 (siehe Abbildung 18B), als auch im späten Verlauf bis zu 35 Tage nach Induktion der Ischämie nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18C).

Ergebnisse

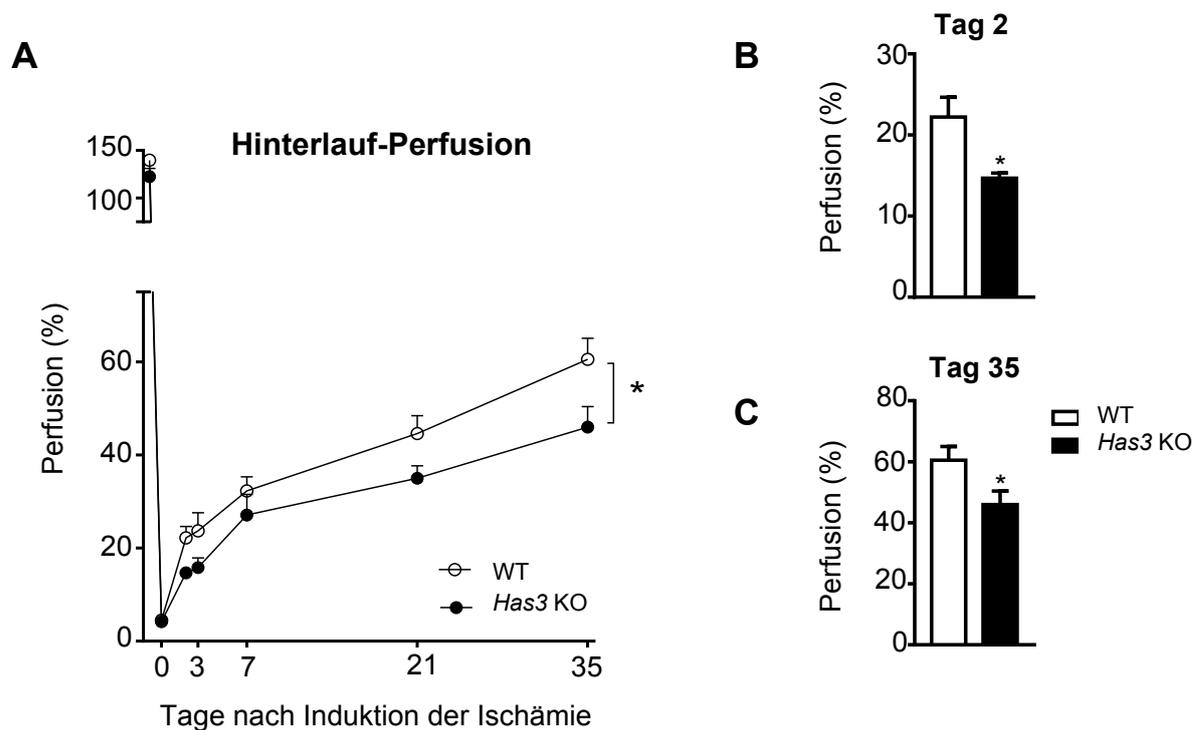


Abbildung 18: Wiederherstellung der Perfusion nach kritischer HLI.

Quantifizierung der Hinterlaufperfusion in *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen mittels Laser-Doppler-Perfusionsmessung (LDPI). Dargestellt ist das Verhältnis der *Perfusion Units* von ischämischem zu nicht-ischämischem Hinterlauf in %. **A**, Quantifizierung der Perfusion im Verlauf. **B**, Quantifizierung der Perfusion an Tag 2. **C**, Quantifizierung der Perfusion an Tag 35, n= 7-8. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **A** mithilfe einer *Two-Way Anova*, und in **B** und **C** mithilfe des *unpaired student t-test*. Die operative Induktion der Hinterlaufischämie und Perfusionsmessungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Freudenberger durchgeführt.

3.1.2 Kapillardichte in ischämischen Unterschenkelmuskeln

Um zu untersuchen, ob die verminderte Hinterlauf-Reperfusion der *Has3*-defizienten Mäuse mit einer veränderten Gefäßdichte einhergeht, wurden die Unterschenkelmuskeln operierter Tiere nach 35 Tagen entnommen und auf das Vorhandensein CD31-positiver Kapillaren immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant reduzierte Kapillardichte in den Unterschenkelmuskeln von *Has3*-defizienten Mäusen (siehe Abbildung 19). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die HAS3 von Bedeutung für das durch Angiogenese vermittelte Kapillarwachstum nach kritischer HLI sein könnte.

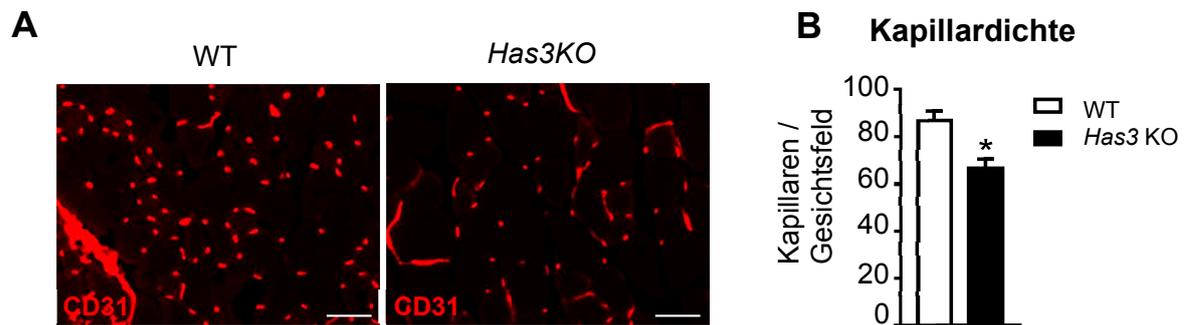


Abbildung 19: Analyse der Kapillardichte in ischämischen Unterschenkeln.

A, Repräsentative Rotkanal-Aufnahmen der CD31-Färbung von ischämischen Unterschenkelmuskeln *Has3*-defizienter (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäuse 35 Tage nach kritischer HLI. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. **B**, Quantitative Analyse der Kapillaranzahl dargestellt als Kapillaren pro Gesichtsfeld, $n = 5-6$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $*P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **B**, unter Anwendung des *unpaired student t-test*. Die Färbungen der Unterschenkelmuskeln sowie Quantifizierung der Kapillardichte wurden von Herrn Tobias Driesen durchgeführt.

3.1.3 Charakterisierung der Retina-Vaskularisierung

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die unter 3.1.2 beobachtete, verminderte Kapillardichte in den Unterschenkelmuskeln von *Has3*-defizienten Mäusen auf eine bereits bestehende Reduktion oder Veränderung präexistenter Gefäße zurückzuführen ist, wurde die basale Retina-Vaskularisierung in *Has3*-defizienten und WT Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die mit Isolectin-B4 angefärbten Gefäßstrukturen in Retinae von 17-18 Wochen alten Mäusen analysiert (siehe Abbildung 20). Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen hinsichtlich der ausgewerteten Parameter „Gefäßlänge“ (siehe Abbildung 20A), „prozentuale Gefäßfläche“ (siehe Abbildung 20B), „Anzahl der Knotenpunkte“ (siehe Abbildung 20C), „Gefäßdichte“ (siehe Abbildung 20D), „durchschnittlichen Gefäßlänge“ (siehe Abbildung 20E), „kumulative Anzahl der Endpunkte“ (siehe Abbildung 20F) sowie „kumulative Gefäßlänge“ (siehe Abbildung 20G). Darüber hinaus gab es auch keine Hinweise auf eine lückenhafte Gefäßstruktur, welche durch den Parameter „Lakunarität“ beschrieben wird (siehe Abbildung 20H). In einer weiteren Untersuchung zur Charakterisierung der basalen Kapillardichte in Unterschenkelmuskeln konnten darüber hinaus keine Unterschiede zwischen adulten *Has3*-defizienten und WT Mäusen festgestellt werden (nicht veröffentlichte Daten von Christin Lorenz).

Ergebnisse

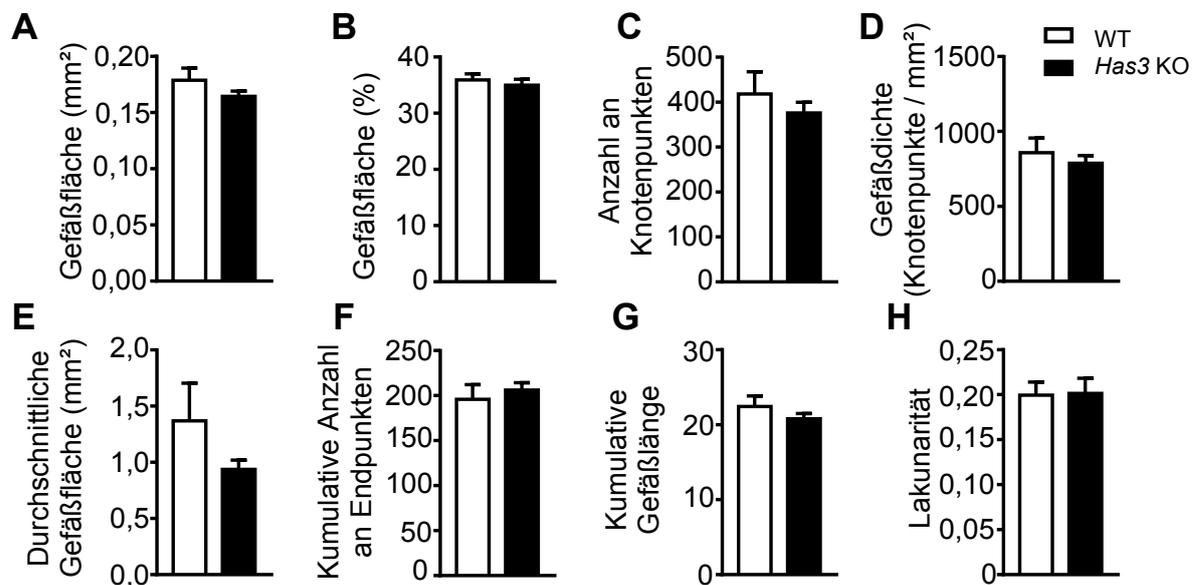


Abbildung 20: Retina-Vaskularisierung in adulten Mäusen.

Die Retinae von 17-18 Wochen alten *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen wurden mit dem Gefäßmarker Isolectin-B4 gefärbt. Zur Bestimmung der Parameter **A**, Gefäßlänge, **B**, prozentuale Gefäßfläche, **C**, Anzahl der Knotenpunkte, **D**, Gefäßdichte, **E**, durchschnittlichen Gefäßlänge, **F** kumulative Anzahl der Endpunkte, **G**, Kumulative Gefäßlänge und **H**, Lakunarität wurden zirkuläre Bereiche der jeweiligen Retina mit dem Programm *Angio-Tool* ausgewertet. Für jeden Parameter wurde ein Mittelwert der analysierten zirkulären Bereiche erstellt, n = 6. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamt-Retinae ± SEM

3.1.4 Rolle der endothelialen HAS3 für Angiogenese *in vitro*

Um ein detaillierteres Verständnis zur Rolle der endothelialen HAS3 im Kontext der Angiogenese zu erhalten, wurde ein *Matrigel-Tube-Formation Assay* mit HAS3-überexprimierenden HCAEC durchgeführt. Dieser Assay eignet sich zur Untersuchung der Migration und Differenzierung von Endothelzellen zu tubulären Strukturen.

3.1.4.1 Validierung der HAS3-Überexpression in HCAEC

Nach lentiviraler Transduktion von HCAEC mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,5 des Leervektors (Kontrolle) oder dem zur Überexpression der HAS3 führenden Vektors (oeHAS3) wurde die Überexpression der HAS3 nach 7 Tagen auf mRNA-Expressions- und Produktebene (Sekretion von HA in den Überstand) evaluiert (siehe Abbildung 21). Dabei zeigte sich eine etwa 40-fache Erhöhung der *HAS3*-Expression in den oeHAS3-transduzierten Zellen im Vergleich zu der Leervektorkontrolle (siehe Abbildung 21A). Zudem

Ergebnisse

konnte die erfolgreiche Überexpression der HAS3 anhand einer etwa 3-fach erhöhten HA-Sekretion in das Medium ausgemacht werden (siehe Abbildung 21B).

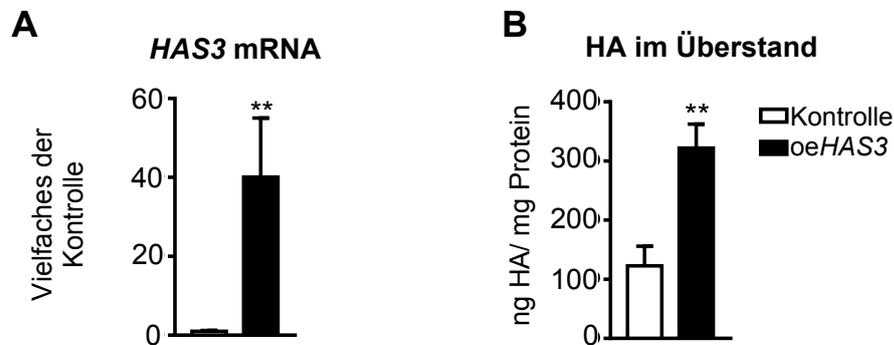


Abbildung 21: Validierung der HAS3-Überexpression in HCAEC.

HCAEC wurden mit einer *MOI* (*multiplicity of infection*) von 0,5 des Leervektors (Kontrolle) oder des zur Überexpression führenden Vektors (*oeHAS3*) transduziert. **A**, stellt die *HAS3* mRNA-Expression 7 Tage nach Transduktion dar und **B**, zeigt die HA-Sekretion in das Medium normalisiert auf den Proteingehalt der Zellen; $n = 6$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $**P < 0,01$ unter Verwendung des *unpaired student t-test*.

3.1.4.2 Analyse von tubulären Strukturen

Nach 24-stündiger Inkubation von *HAS3*-überexprimierenden bzw. Leervektor-transduzierten HCAEC auf *Matrigel* wurden lichtmikroskopische Durchlichtaufnahmen der tubulären Strukturen angefertigt (siehe Abbildung 22). Die Überexpression der *HAS3* führte dabei zu einer vergleichbaren Ausbildung von tubulären Strukturen wie in Leervektor-transduzierten Zellen. Es konnten weder Unterschiede bei der Anzahl von „geschlossenen Maschen“ (siehe Abbildung 22B) noch bei „Verzweigungspunkten“ (siehe Abbildung 22C) ausgemacht werden.

Ergebnisse

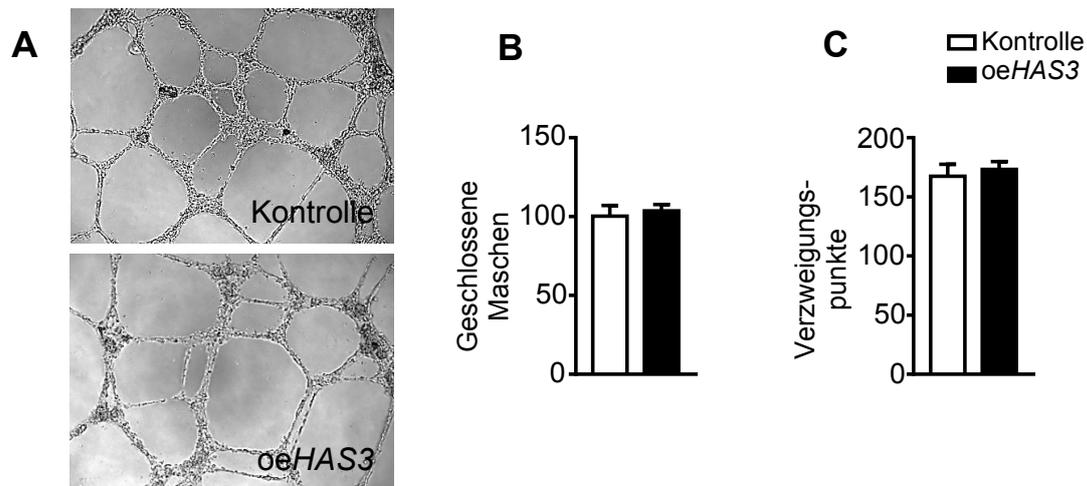


Abbildung 22: Analyse von tubulären Strukturen.

HCAEC wurden mit einer *MOI* (*multiplicity of infection*) von 0,5 des Leervektors (Kontrolle) oder des zur Überexpression führenden Vektors (*oeHAS3*) transduziert und nach 7 Tagen auf *Matrigel* ausgesät. **A**, Repräsentative Aufnahmen von tubulären Strukturen nach 24-stündiger Inkubation von HCAEC auf *Matrigel*. Quantifizierung der **B**, geschlossenen Maschen und **C**, Verzweigungspunkte; $n = 9$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.1.5 Analyse zirkulierender Zyto- und Chemokine

Zur Analyse der zirkulierenden Zyto- bzw. Chemokine wurde das Blutplasma 48 Stunden nach Induktion der HLI gewonnen und mithilfe eines Multiplex-Zytokin- bzw. Chemokin-ELISA auf die Anwesenheit der in Abbildung 23 beschriebenen Proteine untersucht. Beim Vergleich von *Has3-defizienten* zu WT Kontrollen konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die untersuchten, zirkulierenden Zytokine festgestellt werden.

Ergebnisse

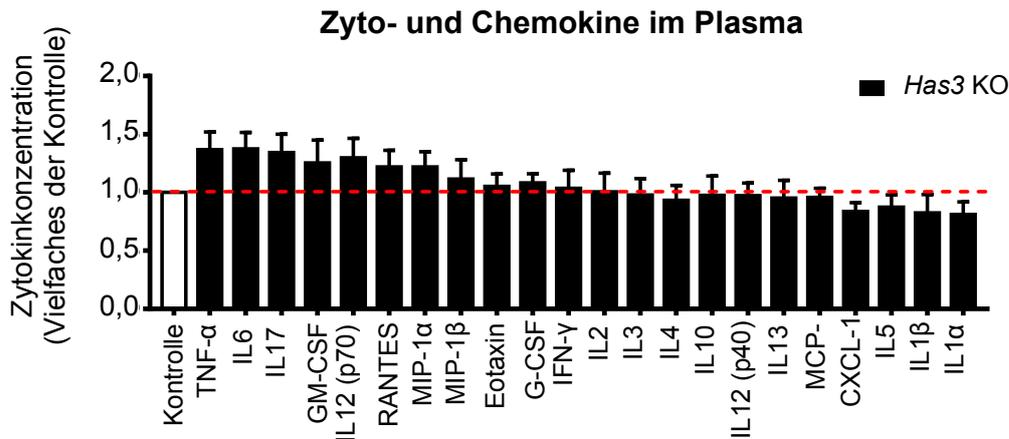


Abbildung 23: Messung von Zyto- und Chemokinen im Blutplasma.

Zytokin- und Chemokinkonzentration im Blutplasma zum Zeitpunkt 48 Stunden nach kritischer HLI. Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mithilfe eines Multiplex-Immunoassays bestimmt. Abgebildet sind die Plasma-Konzentrationen der *Has3-defizienten* Mäuse (*Has3* KO) als Vielfaches der WT Kontrollen (Kontrolle). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM; $n = 8-10$. Die Messungen erfolgten am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einer Kooperation mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr.

3.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen

Um die systemische Inflammationsreaktion noch näher zu charakterisieren wurden die unter 3.1.5 erhaltenen Ergebnisse mit durchflusszytometrischen Blutanalysen ergänzt. Das Blut aus *Has3-defizienten* und WT Mäusen wurde 48 Stunden nach Ischämie-Induktion entnommen, von Erythrozyten befreit und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper-Kombinationen gefärbt.

3.1.6.1 Analyse der Leukozyten und Lymphozyten

Bei der Analyse der zirkulierenden Leukozyten konnten keine Unterschiede zwischen *Has3-defizienten* und WT Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 24A, B). Es zeigten sich weder Unterschiede bei den zirkulierenden B-Lymphozyten (siehe Abbildung 24C, E), noch bei den T-Lymphozyten (siehe Abbildung 24D, E).

Auch eine Subgruppen-Analyse der T-Lymphozyten ergab keine Veränderungen zwischen den Genotypen: Es waren weder Veränderungen in der Anzahl der T-Helferzellen festzustellen (siehe Abbildung 24F, H), noch eine Beeinflussung der zytotoxischen T-Zellen auszumachen (siehe Abbildung 24G, H).

Ergebnisse

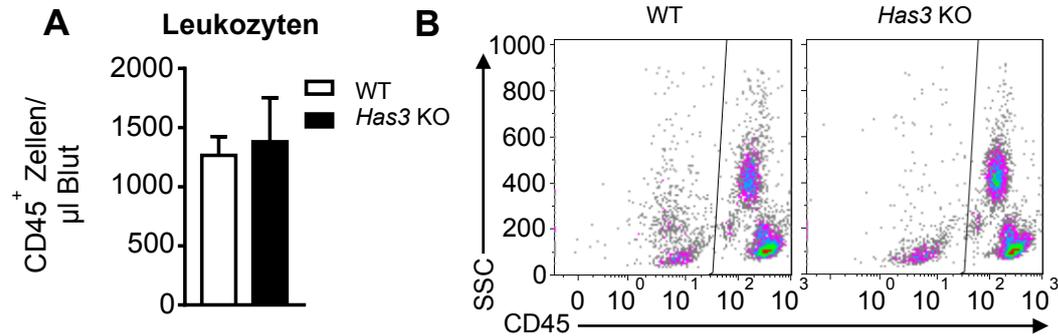


Abbildung 24: Analyse der zirkulierenden Leukozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B**, CD45⁺ Leukozyten im Blut von *Has3-defizienten* (*Has3 KO*) und Wildtyp (WT) Mäusen 48 Stunden nach kritischer HLI. Es ist die Anzahl der CD45⁺ Zellen pro µl Blut dargestellt; n = 5-6. In **B** ist ein repräsentativer *Density Plot* der durchflusszytometrischen Messung gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

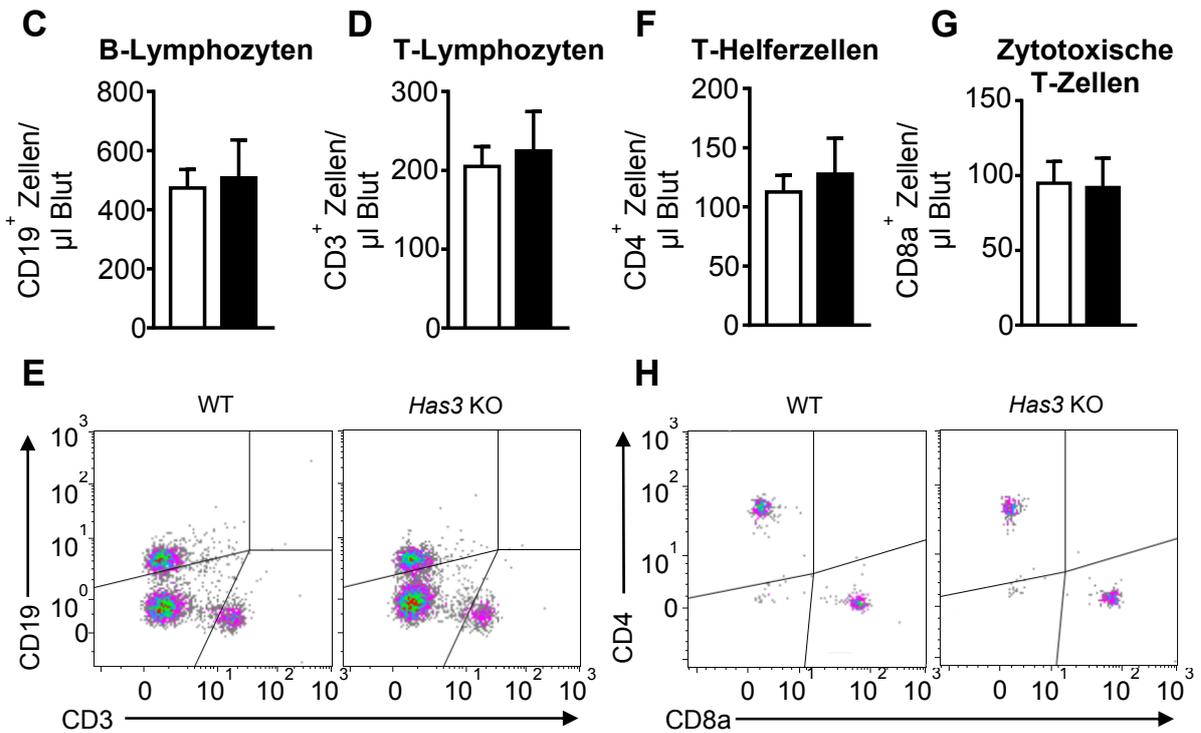


Abbildung 25: Analyse der zirkulierenden Lymphozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **C, E**, CD19⁺ B-Zellen, **D, E**, CD3⁺ T-Zellen, **F, H**, CD4⁺ T-Helferzellen und **G, H**, CD8a⁺ zytotoxischen T-Zellen im Blut von *Has3-defizienten* (*Has3 KO*) und Wildtyp (WT) Mäusen 48 Stunden nach kritischer HLI. Es ist die Anzahl der Zellen pro µl Blut dargestellt; n = 5-6. In **E** und **H** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Ergebnisse

3.1.6.2 Analyse der zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Neben einer unveränderten Anzahl von B- und T-Lymphozyten, konnten auch keine Unterschiede bei den myeloiden Immunzellpopulationen festgestellt werden. Weder die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, noch der Monozyten war verändert.

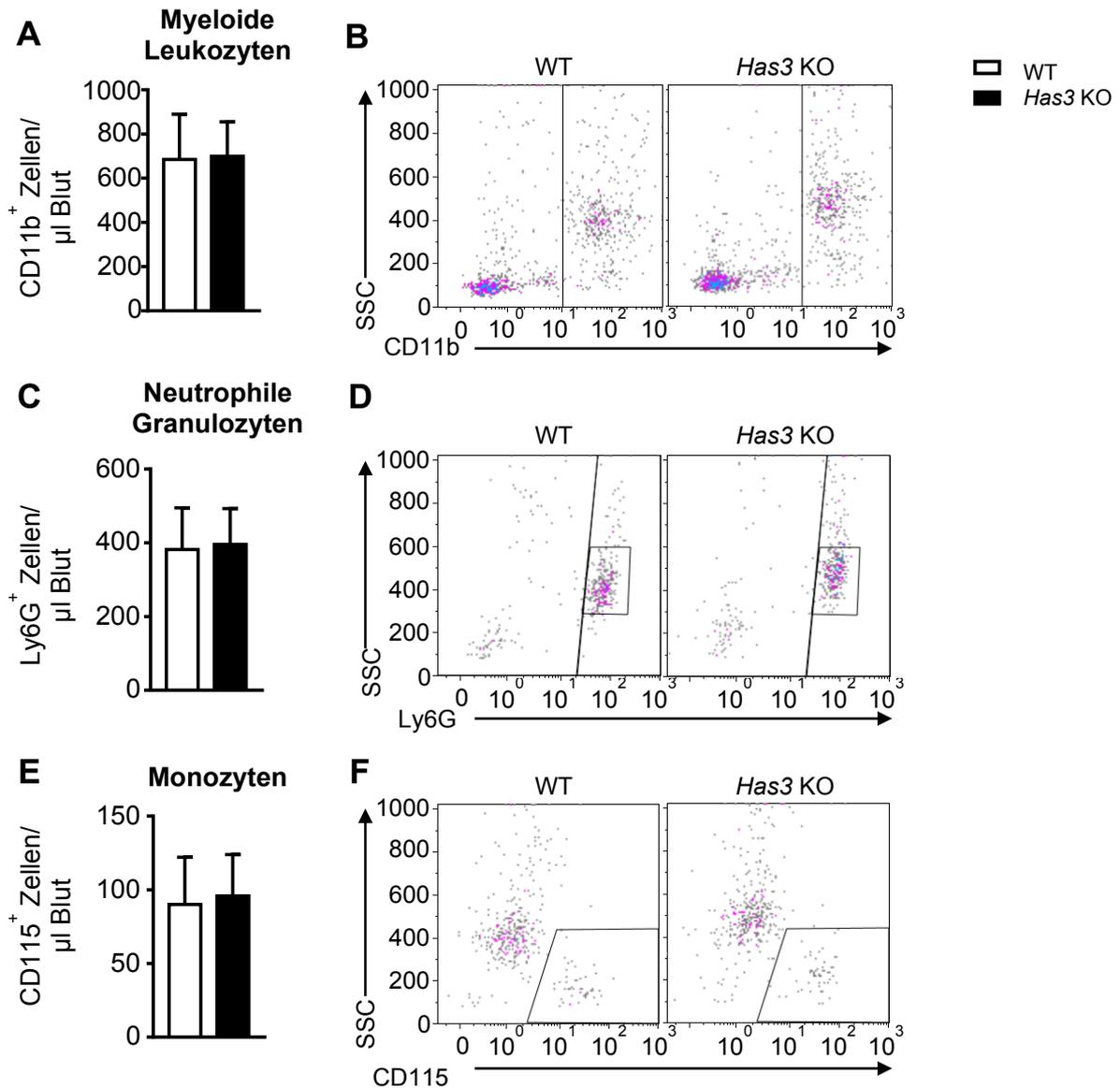


Abbildung 26: Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B**, CD11b⁺ myeloiden Leukozyten, **C, D**, Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten und **E, F**, CD115⁺ Monozyten im Blut von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 48 Stunden nach kritischer HLI. Es ist die Anzahl der positiven Zellen pro µl Blut dargestellt; n = 5-6. In **B, D, F** sind repräsentative *Density Plots* der durchflusszytometrischen Messung gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Ergebnisse

3.1.7 Analyse der Genexpression in ischämischen Unterschenkelmuskeln

Um einen Hinweis auf die zugrundeliegenden Mechanismen für die Unterschiede im Kapillarwachstum zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse ischämischer Unterschenkelmuskeln von *Has3-defizienten* und WT Mäusen durchgeführt. Nach Ligatur und Exzision der *Arteria femoralis* wurden die ischämischen Unterschenkelmuskeln nach 48 Stunden entnommen, die RNA isoliert und dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die weitere Analytik zur Verfügung gestellt.

Bei Betrachtung der mehr als 1,5-fach unterschiedlich regulierten Gene (siehe Tabelle 7), konnte eine signifikant verminderte Expression von C-X-C-Chemokin-Ligand 2 (*Cxcl2*), Lipocalin-2 (*Lcn-2*) und Interleukin-6 (*Il6*) in *Has3-defizienten* Mäusen festgestellt werden. Da sowohl *Cxcl2* als Chemokin-Ligand, *Lcn-2* als akutes Phase-Protein als auch *Il6* als Zytokin im Kontext von inflammatorischen Prozessen beschrieben wurden, sprechen die Ergebnisse für eine unterschiedliche lokale, post-ischämische Inflamationsantwort von *Has3-defizienten* und WT Mäusen. Diese wurde in den folgenden Experimenten näher untersucht.

Gensymbol	Proteinname	P-Wert	Regulation (im Vergleich zu WT-Kontrollen)
<i>Cxcl2</i>	<i>Macrophage inflammatory protein 2-alpha</i>	0,025*	-1,73
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	0,037*	-1,55
<i>Il6</i>	Interleukin 6	0,047*	-1,51

Tabelle 7: Auswahl unterschiedlich regulierter Gene in Unterschenkelmuskeln.

Die Gesamt-RNA wurde 48 Stunden nach kritischer HLI aus Unterschenkelmuskeln isoliert und mittels *Microarray*-Technik analysiert. Dargestellt sind die mehr als 1,5-fach unterschiedlich regulierten Gene in *Has3-defizienten Mäusen* im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen, n = 4, *P < 0,05. Die Werte wurden nach abnehmender Stärke der Regulation sortiert. Negative Werte stellen eine Herabregulation dar. Die Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf entstanden.

3.1.8 Leukozyteninfiltration in Unterschenkelmuskeln

3.1.8.1 Immunhistochemische Färbung von Leukozyten

Es ist bekannt, dass die Neubildung von Gefäßstrukturen nach Eintritt eines ischämischen Gewebeschadens maßgeblich durch die initiale Einwanderung von Leukozyten beeinflusst werden kann. Um den Einfluss einer *Has3*-Deletion auf die Leukozyten-Infiltration nach kritischer HLI zu analysieren, wurden ischämische Unterschenkelmuskeln 48 Stunden nach der Operation auf die Anwesenheit von CD45⁺-Zellen untersucht (siehe Abbildung 27). Dabei konnte eine signifikant verringerte Anzahl von CD45⁺-Zellen in *Has3*-defizienten im Vergleich zu WT Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 27A, B).

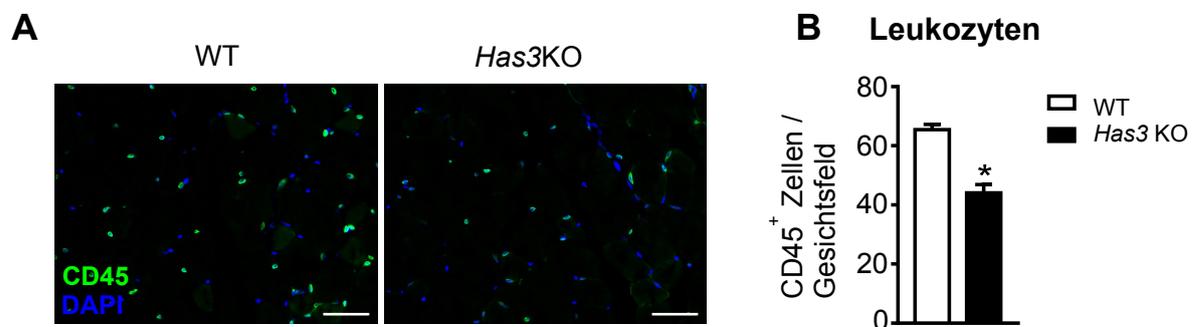


Abbildung 27: Leukozyteninfiltration in ischämischen Unterschenkelmuskeln.

A, Repräsentative CD45-Färbung von ischämischen Unterschenkelmuskeln *Has3*-defizienter (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäuse 48 Stunden nach kritischer HLI. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **B**, Quantitative Analyse der Leukozytenanzahl dargestellt als CD45⁺ Zellen pro Gesichtsfeld, n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, **P* < 0,05. Zur Testung auf Signifikanz wurde ein *unpaired student t-test* angewendet.

3.1.8.2 Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellpopulationen

Um die genaue Zusammensetzung der in den Muskel eingewanderten Immunzellpopulationen besser definieren zu können wurden die in 3.1.8.1 erhaltenen Ergebnisse mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen ergänzt. Die nicht-ischämischen (NI) und ischämischen (I) Unterschenkelmuskeln von *Has3-defizienten* und WT Mäusen wurden 48 Stunden nach Ischämie-Induktion entnommen, enzymatisch verdaut und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper-Kombinationen gefärbt.

Im Hinblick auf die untersuchten Immunzellpopulationen konnte in den nicht-ischämischen Unterschenkelmuskeln keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden. Analog zu der Reduktion von Leukozyten in den immunhistochemisch analysierten Muskelschnitten, zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion von Leukozyten in den ischämischen Unterschenkelmuskeln *Has3-defizienter* Mäuse (siehe Abbildung 28 A-D). Die verminderte Anzahl der Leukozyten war sowohl bei der Anzahl von neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 28 B-E), als auch Makrophagen (siehe Abbildung 28 C-F) festzustellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Immunzell-Komposition der Unterschenkelmuskeln unter basalen Bedingungen nicht durch die *Has3*-Defizienz beeinflusst wird. Jedoch scheint die frühe Infiltration von Immunzellen im Rahmen der post-ischämischen Inflammationsantwort bei *Has3*-defizienten Mäusen reduziert zu sein.

Ergebnisse

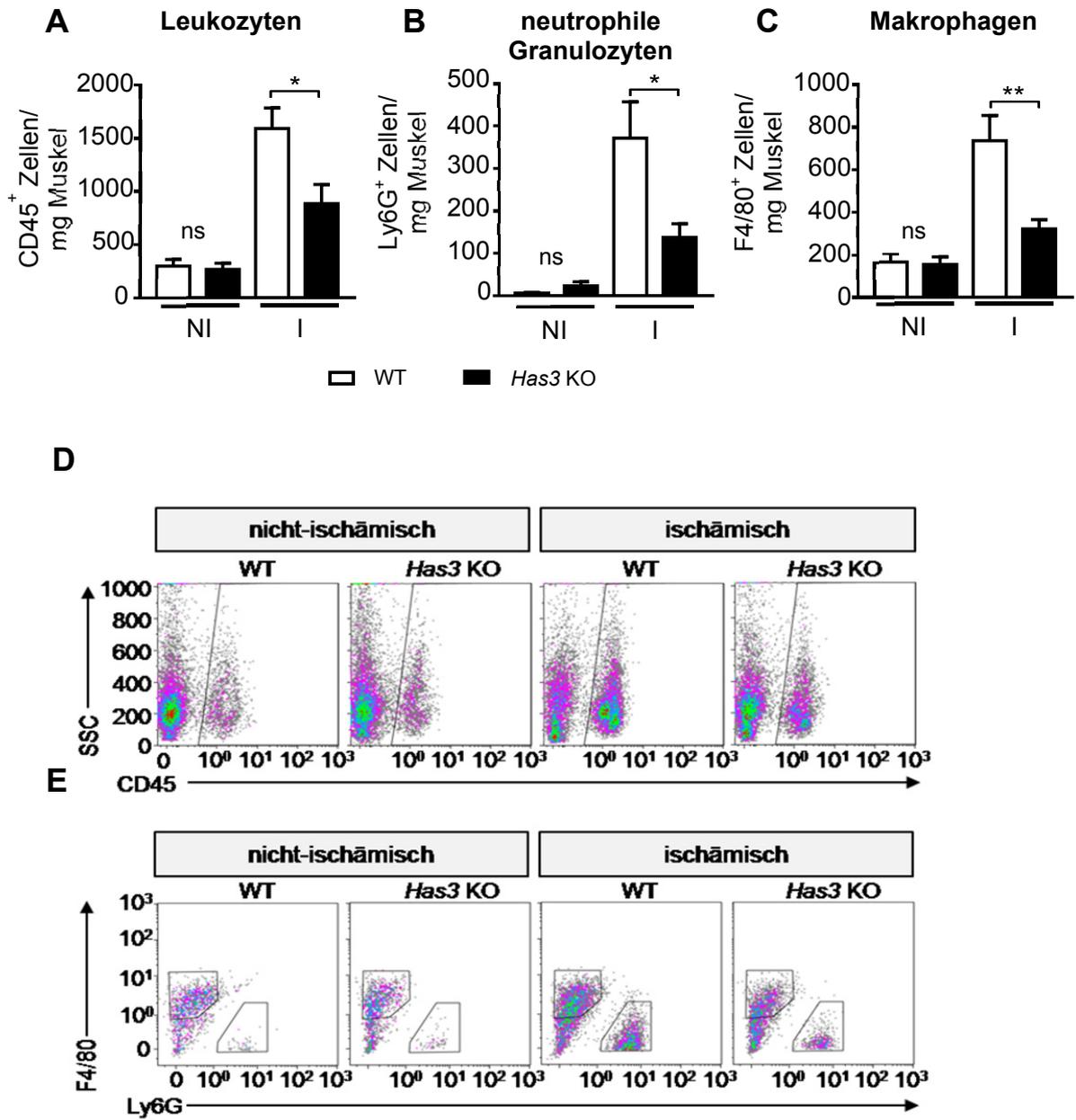


Abbildung 28: Analyse der Immunzellpopulationen in Unterschenkelmuskeln.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, D**, CD45⁺ Leukozyten, **B, E**, Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten und **C, E**, F4/80⁺ Makrophagen in nicht-ischämischen (NI) und ischämischen (I) Unterschenkelmuskeln von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 48 Stunden nach kritischer HLI. Es ist jeweils die Anzahl der Zellen pro mg Muskelgewebe dargestellt; n = 5-6. In **D** und **E** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, **P* < 0,05, ***P* < 0,01. In **A-C** wurde eine *One-Way Anova* mit anschließendem *Turkey post-hoc Test* angewendet. ns = nicht signifikant.

3.2 Einfluss der HAS3 auf die Arteriogenese im Modell der HLI

Um die Bedeutung der HAS3 auch im Kontext von Arteriogenese zu evaluieren, wurden 16-18 Wochen alte *Has3-defiziente* und WT Mäuse in einem milden HLI-Modell nach Hellingman *et al.* untersucht. Im Gegensatz zum kritischen HLI-Modell nach Driesen *et al.* wird die *Arteria femoralis* in diesem Modell nicht exzidiert, sondern unter Erhaltung aller Kollateralanschlüsse an zwei Stellen elektrokoaguliert (siehe Abbildung 11). Insbesondere die proximal induzierte Okklusion der *Arteria femoralis* führt zu einer verstärkten Durchblutung von nativ angelegten Oberschenkel-Kollateralen. Durch Verdickung der Wandschichten, bauen sich die nativ angelegten Kollateralen in funktionsfähige Umgehungskreisläufe um. Somit ist in diesem Modell mit einer Überbrückung von Perfusionsdefiziten durch Scherstress-vermittelte Arteriogenese zu rechnen.

3.2.1 Wiederherstellung der Perfusion nach milder Hinterlaufischämie

Nach Elektrokoagulation der *Arteria femoralis* wurde die Reperfusion der Hinterläufe mithilfe von LDPI-Messungen über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert. Obwohl unmittelbar postoperativ (Zeitpunkt 0) kein Unterschied in der Perfusion gemessen werden konnte, wiesen *Has3*-defiziente Mäuse eine über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant verschlechterte Wiederherstellung der Perfusion auf (siehe Abbildung 29). Die im Vergleich zu den WT Mäusen verminderte Perfusion konnte sowohl an Tag 3 (siehe Abbildung 29B), nach 7 Tagen (siehe Abbildung 29C), sowie 14 Tage nach Induktion der Ischämie nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29D).

Ergebnisse

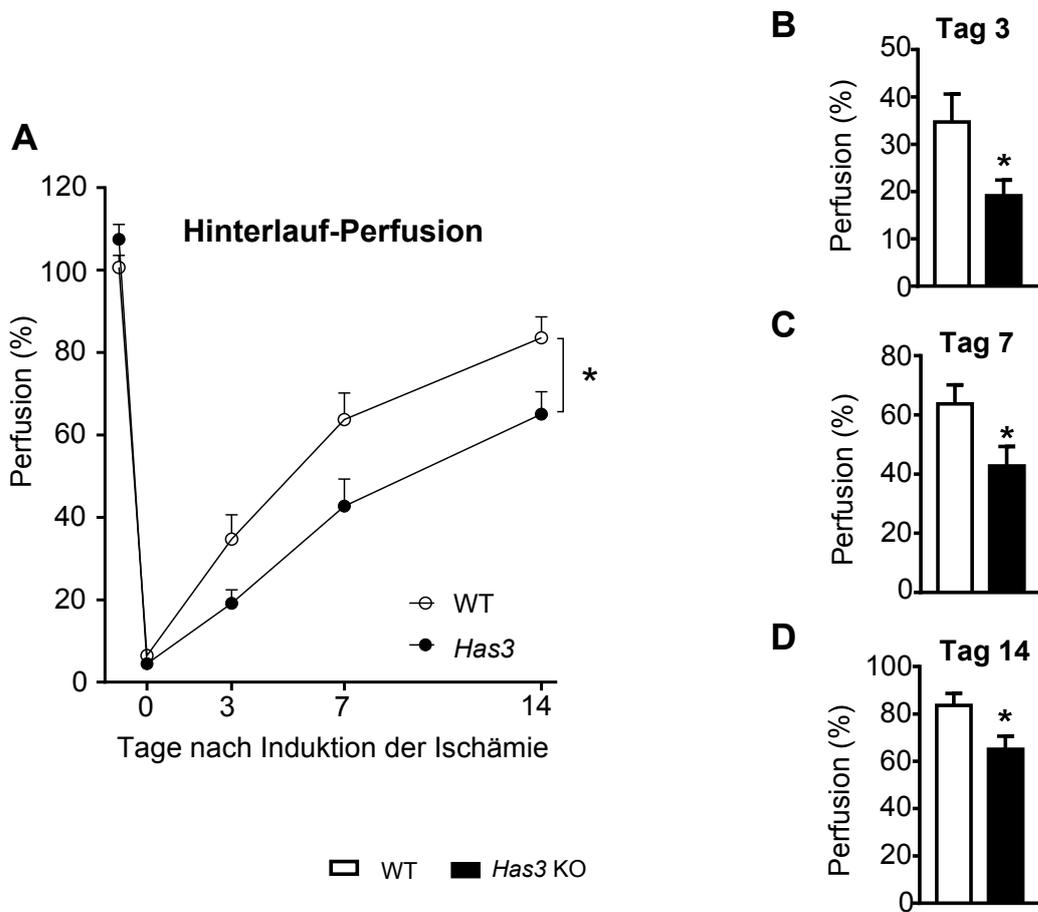


Abbildung 29: Wiederherstellung der Perfusion nach milder HLI.

Quantifizierung der Hinterlaufperfusion mittels Laser-Doppler-Perfusionsmessung (LDPI) in *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt ist das Verhältnis der *Perfusion Units* von ischämischem zu nicht-ischämischem Hinterlauf in %. **A**, Quantifizierung der Perfusion im Verlauf. **B**, Quantifizierung der Perfusion an Tag 3. **C**, Quantifizierung der Perfusion an Tag 7. **D**, Quantifizierung der Perfusion an Tag 14; n = 7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **A** mithilfe einer *Two-Way Anova*. In **B**, **C** und **D** wurde ein *unpaired student t-test* angewendet.

3.2.1 Untersuchung von Kollateralen mithilfe der Magnetresonanztangiographie

Um zu untersuchen, ob die verminderte Hinterlauf-Reperfusion in *Has3*-defizienten Mäusen durch einen Defekt der Arteriogenese verursacht wird, wurden die arteriellen Gefäße des operierten Hinterlaufs nach 21 Tagen mithilfe einer TOF-Magnetresonanztangiographie dargestellt. Die Messungen wurden in einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Kardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

In der Tat konnte ein im Vergleich zu WT Mäusen signifikant verringertes Blutvolumen in Kollateralgefäßen von *Has3*-defizienten Mäusen detektiert werden (siehe Abbildung 30). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Ausreifung von nativ-angelegten Kollateralgefäßen zu funktionsfähigen Arterien in *Has3*-defizienten Mäusen gestört ist. Somit scheint die HAS3 wichtig für die Arteriogenese *in vivo* zu sein.

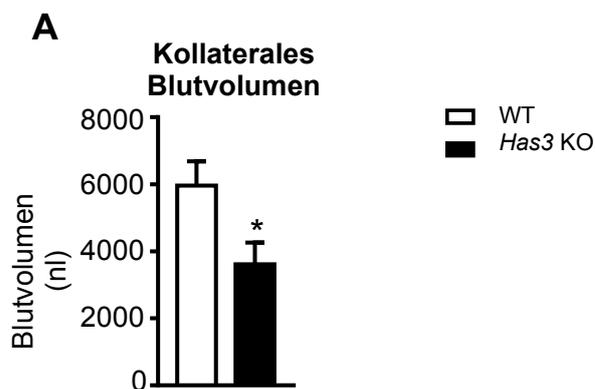


Abbildung 30: Time-of-Flight-Magnetresonanztangiographie der Kollateralen im Hinterlauf.

Magnetresonanztangiographische Analyse der Kollateralen in operierten Hinterläufen von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen zum Zeitpunkt 21 Tage nach milder HLI. **A**, Blutvolumen der Kollateralen in nL. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $*P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **A** mithilfe des *unpaired student t-test*. Die Messungen sowie Auswertungen wurden von Herrn Prof. Dr. Ulrich Flögel durchgeführt.

3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse von Oberschenkelmuskeln

Um zu untersuchen, ob die verminderte Perfusion und Arteriogenese in den *Has3-defizienten* (in Analogie zu dem kritischen Modell) durch eine lokal veränderte Entzündungsantwort bedingt ist, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung der operierten (ischämisch; I) und nicht-operierten (nicht-ischämischen; NI) Oberschenkelmuskeln vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die kompletten Oberschenkelmuskeln von *Has3-defizienten* und WT Mäusen 72 Stunden nach dem Eingriff entnommen, enzymatisch verdaut und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper-Kombinationen gefärbt.

Die durchflusszytometrische Analyse der operierten sowie nicht-operierten Oberschenkelmuskeln ergab keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die untersuchten Immunzellpopulationen. Es gab weder Veränderungen bei der Gesamtanzahl der Leukozyten (siehe Abbildung 31A, D), noch signifikante Unterschiede bezüglich der myeloiden Leukozytenpopulationen (siehe Abbildung 31C, E). Die weitere Analyse der neutrophilen Granulozyten zeigte zwar einen Trend zu einer verminderten Zellzahl in *Has3-defizienten* Mäusen (siehe Abbildung 31C, F), war jedoch wie die Anzahl der Makrophagen (siehe Abbildung 32A, B) nicht signifikant verändert.

Ergebnisse

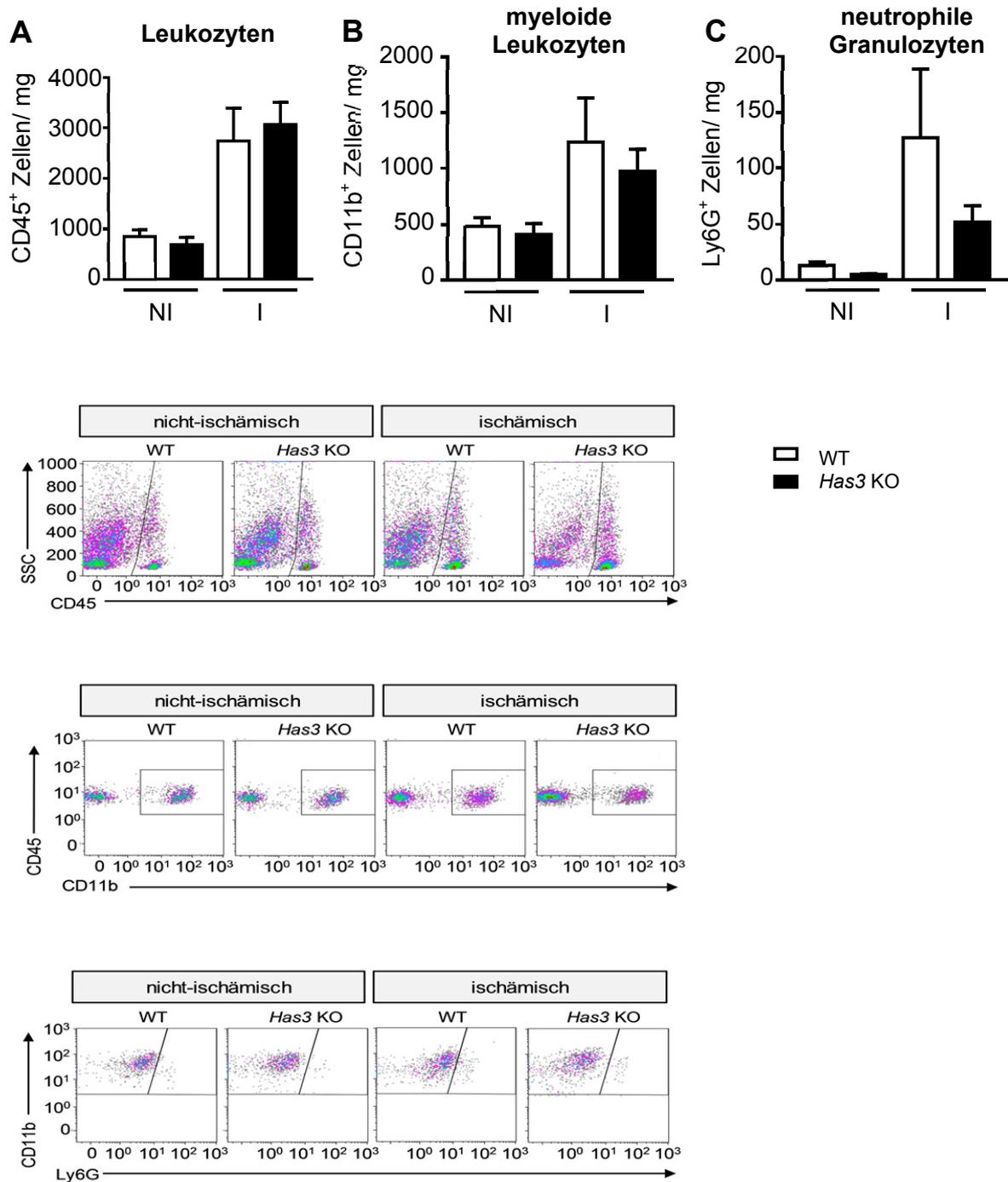


Abbildung 31: Analyse der Immunzellpopulationen in Oberschenkelmuskeln.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, D**, CD45⁺ Leukozyten, **B, E**, CD11b⁺ myeloiden Leukozyten und **C, F**, Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten in nicht-ischämischen (NI) und ischämischen (I) Oberschenkelmuskeln von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach milder HLI. Es ist jeweils die Anzahl der Zellen pro mg Muskelgewebe dargestellt; n = 6-7. In **D, E** und **F** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Ergebnisse

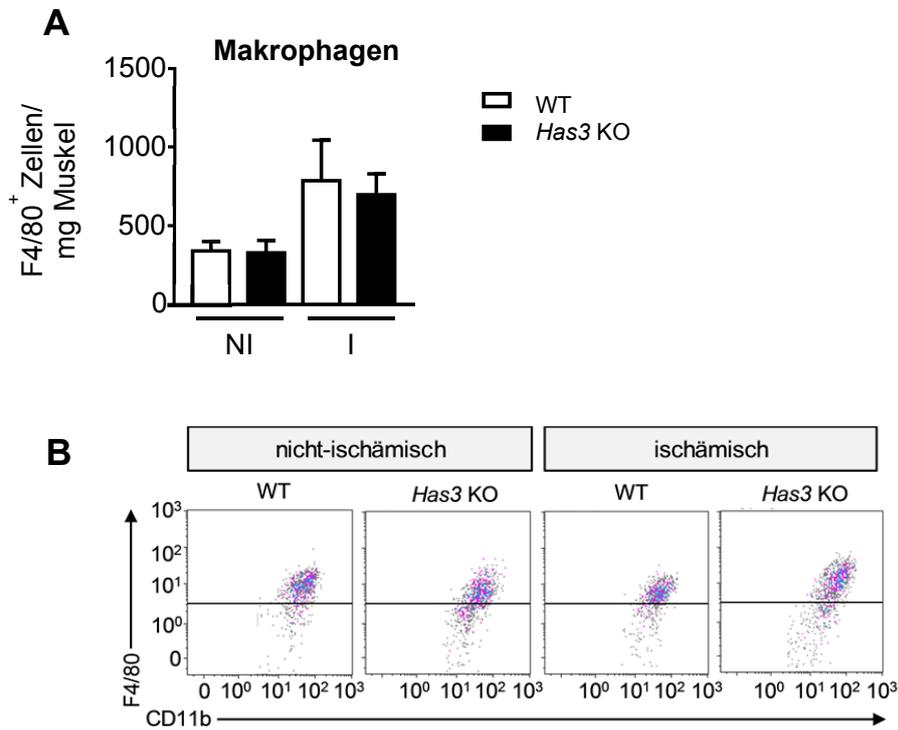


Abbildung 32: Analyse von Makrophagen in Oberschenkelmuskeln.

Durchflusszytometrische Analyse von **A**, **B**, F4/80⁺ Makrophagen in nicht-ischämischen (NI) und ischämischen (I) Oberschenkelmuskeln von *Has3-defizienten* (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach milder HLI. Es ist jeweils die Anzahl der Zellen pro mg Muskelgewebe dargestellt; n = 6-7. In **C** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

3.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellpopulationen

Um einen Einblick über die zirkulierenden Immunzellpopulationen zu erhalten, wurde auch das Blut mithilfe von durchflusszytometrischen Messungen analysiert. Zu diesem Zweck wurde das Blut 72 Stunden nach Okklusion der *Arteria femoralis* per Herzpunktion gewonnen, von Erythrozyten befreit und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper-Kombinationen gefärbt.

3.2.3.1 Analyse der zirkulierenden Leukozyten und Lymphozyten

Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die zirkulierenden Leukozyten festgestellt werden. Allerdings zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten Leukozyten-Zahl im Blut von *Has3*-defizienten Mäusen (siehe Abbildung 33A, B).

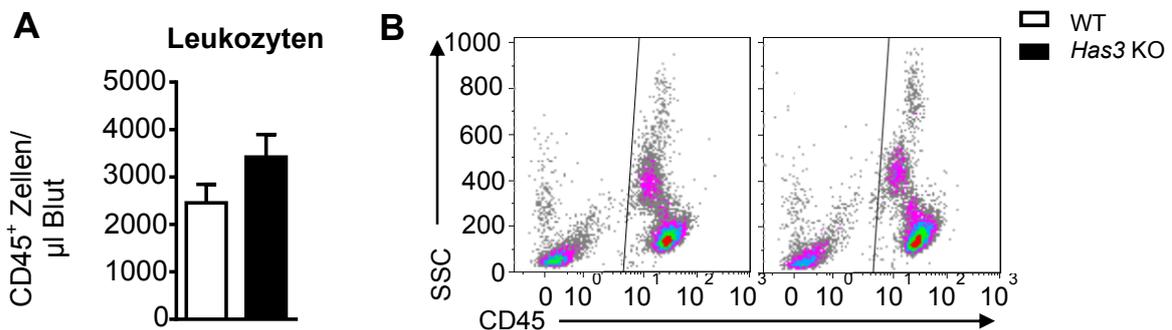


Abbildung 33: Analyse der zirkulierenden Leukozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B**, CD45⁺ Leukozyten im Blut von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach milder HLI. Es ist die Anzahl der Zellen pro µl Blut dargestellt; n = 8-11. In **B** ist ein repräsentativer *Density Plot* der durchflusszytometrischen Messung gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, **P* < 0,05.

Has3-defiziente Mäuse wiesen darüber hinaus einen Trend zu einer erhöhten Anzahl von zirkulierenden B-Lymphozyten (siehe Abbildung 34A, B) und T-Lymphozyten (siehe Abbildung 34C, D) auf, der sich auch in den T-Lymphozyten-Subpopulationen widerspiegelte (siehe Abbildung 34E, F, G). Allerdings waren diese Veränderungen nicht statistisch signifikant.

Ergebnisse

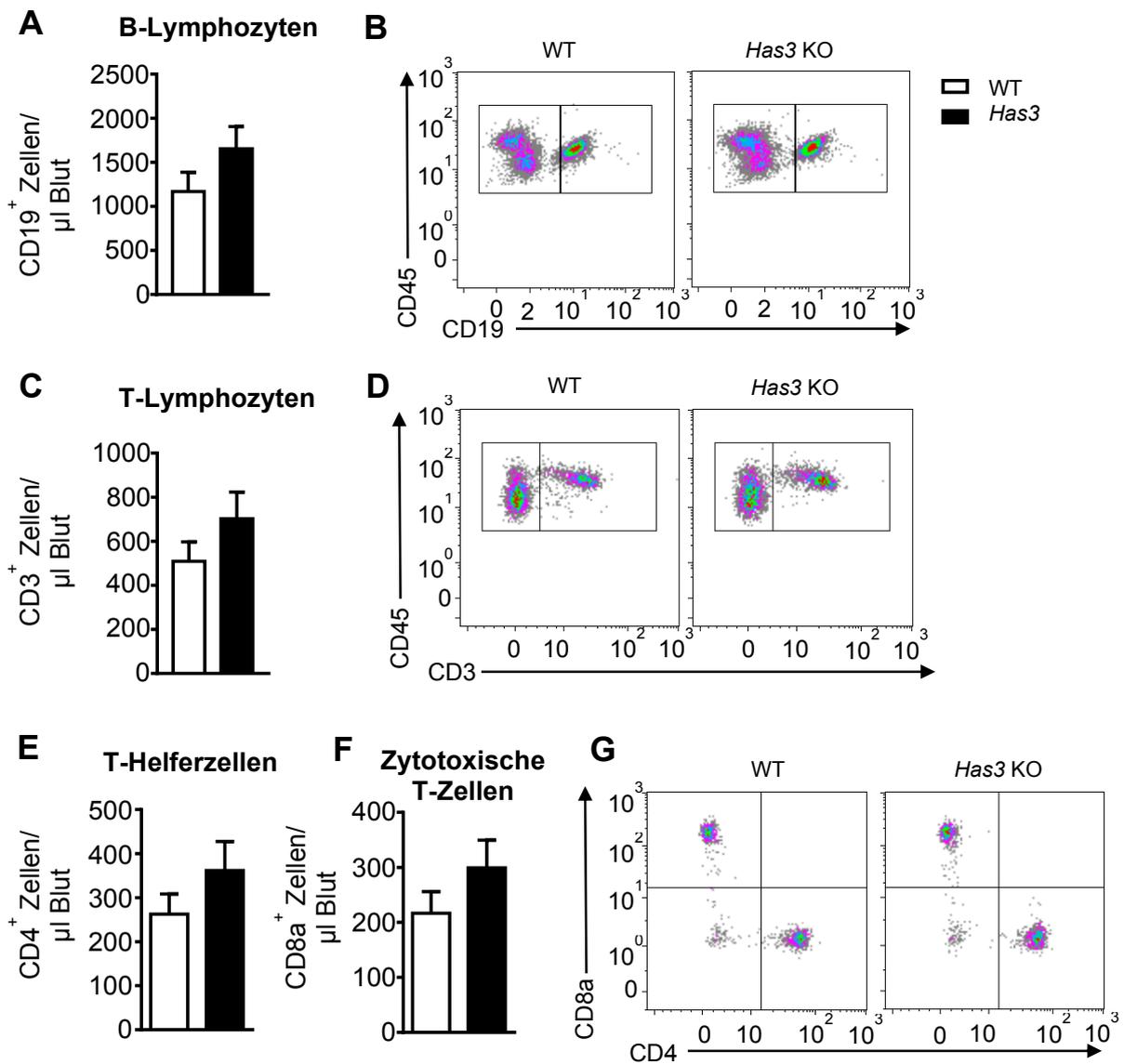


Abbildung 34: Analyse der zirkulierenden Lymphozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B**, CD19⁺ B-Lymphozyten, **C, D**, CD3⁺ T-Lymphozyten, **E, G** CD4⁺ T-Helferzellen und **F, G**, CD8a⁺ zytotoxischen T-Zellen im Blut von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach milder HLI. Es ist die Anzahl der Zellen pro µl Blut dargestellt; n = 8-11. In **B, D** und **G** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

3.2.3.2 Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Auch die Analyse der zirkulierenden myeloiden Leukozyten (siehe Abbildung 35A, B), neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 35C, D) sowie der Monozyten (siehe Abbildung 35E, F) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen.

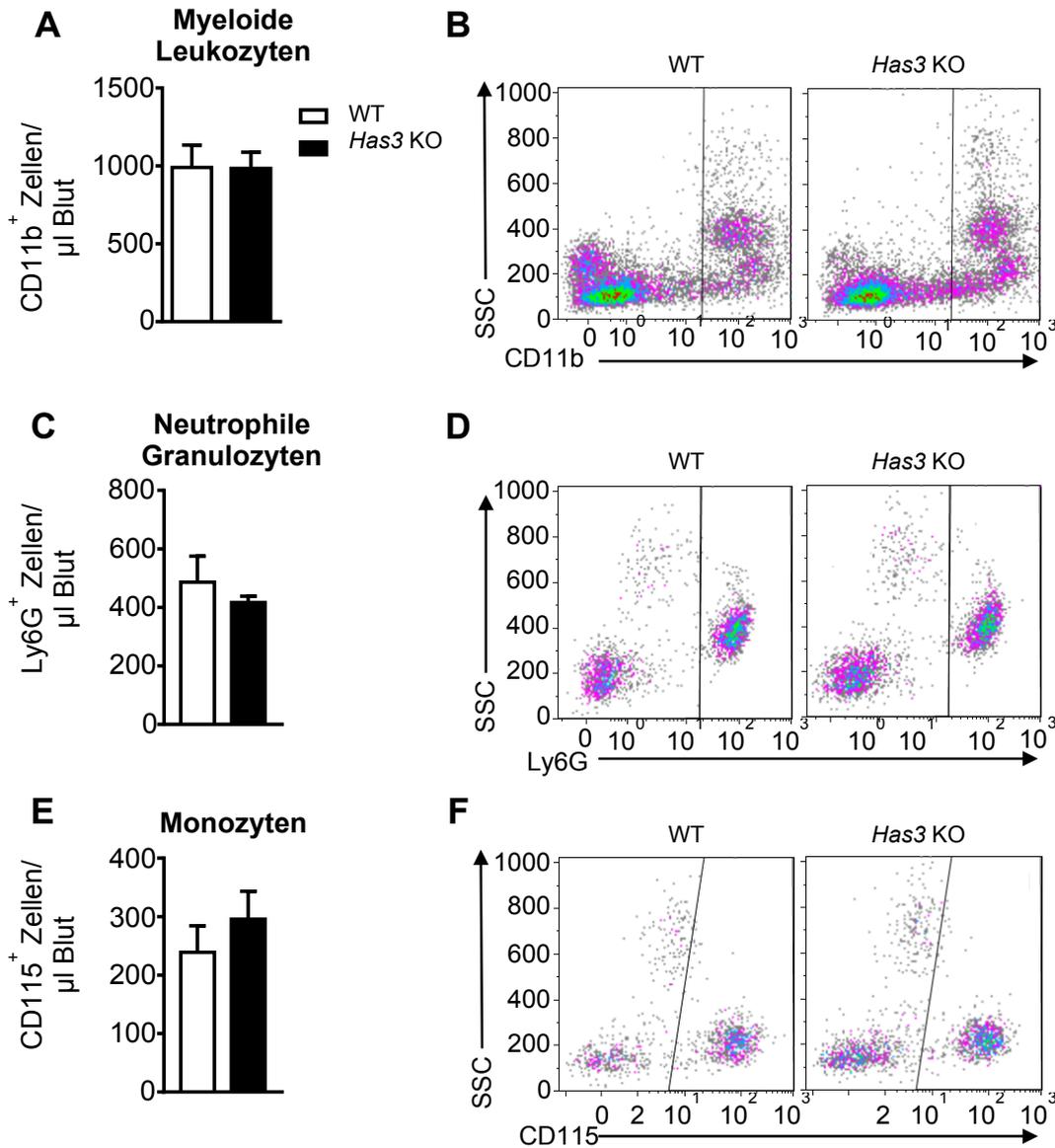


Abbildung 35: Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B**, CD11b⁺ myeloiden Leukozyten, **C, D**, Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten, **E, F**, CD115⁺ Monozyten im Blut von *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen 72 Stunden nach milder HLI. Es ist die Anzahl der positiven Zellen pro μl Blut dargestellt. n = 5-7. In **B, D** und **F** sind repräsentative *Density Plots* der jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

3.2.4 Untersuchung der vaskulären Reagibilität

Die Messung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) wird in der Humanmedizin als nicht-invasives Verfahren zur Beurteilung der Endothelfunktion im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen genutzt. In Anlehnung an das humane Modell, wurde die FMD der *Arteria femoralis* in anästhesierten *Has3-defizienten* und WT Mäusen untersucht (siehe

Abbildung 36). Nach Induktion einer 5-minütigen Ischämie durch Anlegen einer Druckmanschette um die Hinterläufe, war die anschließend gemessene Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie nicht unterschiedlich (siehe Abbildung 36A). Dahingegen konnte eine im Vergleich zu den WT Mäusen auf die Hälfte reduzierte FMD in den *Has3-defizienten* Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 36B). Dies spricht für eine unterschiedliche vaskuläre Reagibilität in den *Has3-defizienten* Mäusen, welche durch eine verminderte Scherstress-abhängige Reaktion des Endothels erklärt werden könnte.

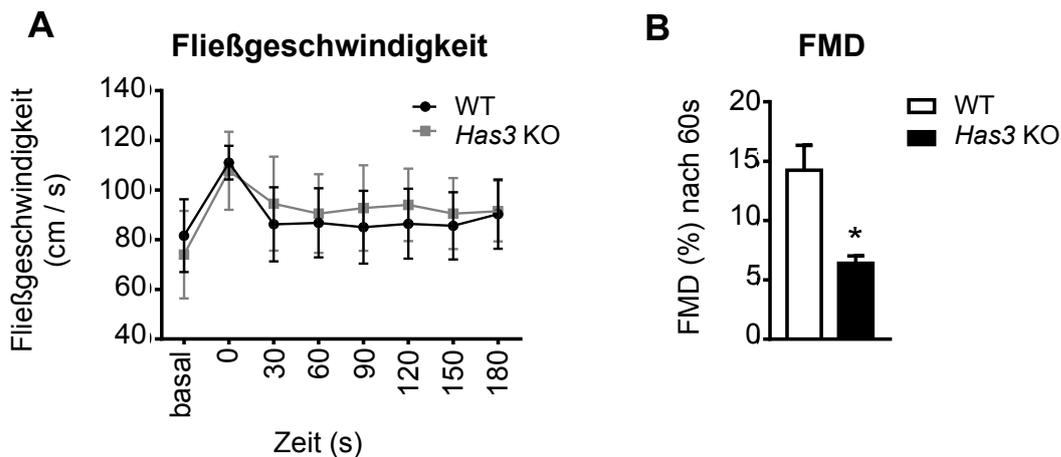


Abbildung 36: Analyse der vaskulären Reagibilität.

Nach Induktion einer 5-minütigen Hinterlaufischämie durch Anlegen einer Druckmanschette wurde die vaskuläre Reagibilität der *Arteria femoralis* in *Has3*-defizienten (*Has3* KO) und Wildtyp (WT) Mäusen mittels Duplex-Ultraschall analysiert. **A**, Messung der Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie. **B**, Flussvermittelte Vasodilatation (FMD) 60 Sekunden nach Öffnen der Druckmanschette; n= 4-5; Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **B** mithilfe des *unpaired student t-test*. Die Messungen wurden von Herrn Dr. Dominik Schuler durchgeführt.

3.2.5 Untersuchung von Endothelzell-spezifischen *Has3*-defizienten Mäusen

Da Endothelzellen wesentlich zum Umbau von Kollateralen zu funktionsfähigen Arterien beitragen, und *Has3*-defiziente Mäuse eine signifikant verminderte vaskuläre Reagibilität aufwiesen (siehe 3.2.4), wurde die Rolle der endothelialen *Has3* für die Reperfusion nach milder HLI untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Endothelzell-spezifisches *Knockout*-Modell nach Göthert *et al.* verwendet [117]. Zur Induktion des *Knockouts* wurden end-SCL-Cre^{+/-} und end-SCL-Cre^{+/-}/*HAS3*^{fl/fl} Mäuse in einem Alter von 13-15 Wochen über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Tamoxifen behandelt. Nach einer 3-wöchigen Auswaschphase erfolgte die operativ-induzierte Elektrokoagulation der *Arteria femoralis*. Die Reperfusion der Hinterläufe wurde anschließend über einen Zeitraum von 14 Tagen mithilfe von LDPI-Messungen verfolgt. Interessanterweise zeigten die Endothelzell-spezifischen *Has3*-defizienten Mäuse eine im Vergleich zu den Cre-Kontrollen stark verminderte Wiederherstellung der Perfusion auf (siehe Abbildung 37). Da der Kurvenverlauf eine starke Übereinstimmung mit dem der ubiquitären *Has3*-defizienten Mäuse (siehe Abbildung 29) aufweist, sprechen die Ergebnisse für einen wichtige Rolle der endothelialen HAS3 im Prozess der Arteriogenese.

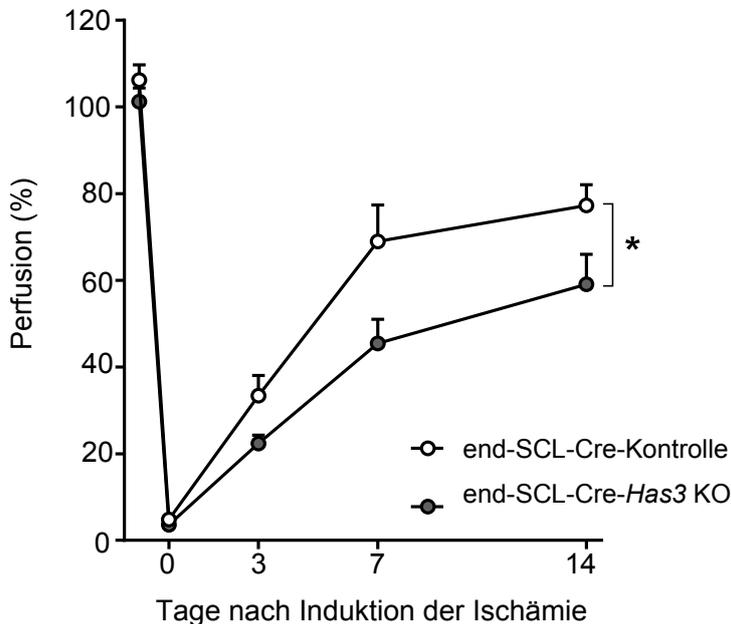


Abbildung 37: Untersuchung von Endothelzell-spezifischen *Has3*-defizienten Mäusen. Quantifizierung der Hinterlaufperfusion in Endothelzell-spezifischen *Has3*-defizienten (end-SCL-Cre-*Has3* KO) und Cre-Kontrollen (end-SCL-Cre) mittels Laser-Doppler-Perfusionsmessung (LDPI). Dargestellt ist das Verhältnis der *Perfusion Units* von ischämischem zu nicht-ischämischem Hinterlauf in %. **A**, Quantifizierung der Perfusion im Verlauf; n = 5-7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, **P* < 0,05 vs. endSCL-Cre. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in **A** mithilfe einer *Two-Way Anova*.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der HAS3 auf Blutgefäßneubildung durch Angiogenese und die Erweiterung bereits bestehender Kollateralgefäße durch Arteriogenese untersucht. Zu diesem Zweck wurden *Has3-defiziente* Mäuse und entsprechende WT Kontrollen in zwei unterschiedlichen Modellen der operativ-induzierten HLI untersucht.

Im ersten Teil wurde die Bedeutung der HAS3 im Kontext der Angiogenese untersucht. In einem kritischen HLI-Modell führte die genetische Deletion der *Has3* zu einer signifikant verschlechterten Wiederherstellung der Perfusion, einem verminderten Kapillarwachstum und einer eingeschränkten post-ischämischen Inflammationsantwort in den ischämischen Unterschenkelmuskeln. Durch die Analyse der Retina-Vaskularisierung konnte eine bereits basal veränderte Gefäßdichte durch das Fehlen der HAS3 ausgeschlossen werden. Auch zeigte sich in einem *Matrigel-Tube-Formation Assay* zur Analyse der Angiogenese *in vitro* kein Einfluss der endothelialen HAS3 im Hinblick auf die Ausbildung von tubulären Strukturen. Während zirkulierende Immunzellen und Zyto- bzw. Chemokine durch die Deletion der *Has3* nicht beeinflusst wurden, war die lokale Expression pro-inflammatorischer bzw. pro-angiogener Gene in *Has3*-defizienten Mäusen reduziert. Darüber hinaus konnte eine signifikant verringerte Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im ischämischen Muskelgewebe detektiert werden. Diese Unterschiede konnten jedoch nur unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen werden, da die Immunzellkomposition nicht-ischämischer Unterschenkelmuskeln keine Veränderungen aufwies. Somit konnte gezeigt werden, dass die HAS3 einen Einfluss auf die Rekrutierung von myeloiden Immunzellpopulationen zum ischämischen Gewebe hat und auf diese Weise indirekt Angiogenese nach HLI beiträgt.

Im zweiten Teil wurde der Einfluss der *Has3* in einem milderen Modell der HLI untersucht, welches zur Analyse der Arteriogenese im Oberschenkelmuskel herangezogen wurde. Auch in diesem Modell führte die genetische Deletion der *Has3* zu einer signifikant verschlechterten Wiederherstellung der Perfusion, was mit einer schlechteren Durchblutung von Kollateralgefäßen assoziiert war. Während hier keine Unterschiede bei der Leukozyteninfiltration in den Oberschenkelmuskel festgestellt werden konnten, deutete die Messung der FMD und Untersuchung von Endothelzell-spezifischen *Has3*-defizienten Mäusen auf eine Bedeutung der endothelialen *Has3* für den Prozess der Arteriogenese hin.

Diskussion

Im folgenden Abschnitt sollen die erhaltenen Ergebnisse systematisch interpretiert und diskutiert werden.

4.1 Bedeutung der HAS3 nach kritischer Hinterlaufischämie

4.1.1 Modell der kritischen Hinterlaufischämie als Angiogenese-Modell

Zur Untersuchung der Effekte einer *Has3*-Defizienz auf den Prozess der Angiogenese wurde ein HLI-Modell nach Driesen *et al.* angewendet. In diesem Modell kommt es durch die Ligatur und Exzision der *Arteria femoralis* zu einer starken Ischämie in dem operierten Hinterlauf. Besonders zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass mit der Exzision der *Arteria femoralis* auch nativ angelegte Kollateralanschlüsse entfernt werden. Dies macht eine Wiederherstellung der Perfusion über eine Reifung von arteriellen Kollateralen unwahrscheinlich.

Der Einfluss verschiedener Operationsverfahren auf die Perfusion, Kapillardichte und Morphologie von Kollateralen wurde von Hellingman *et al.* 2010 in einer Mausstudie analysiert [119]. Mithilfe von CT-Angiographien konnte gezeigt werden, dass alle Einfach- und Doppelligatur-Modelle mit der Ausbildung von Korkenzieher-förmigen Oberschenkel-Kollateralen einhergingen, was ein Merkmal für Arteriogenese ist. Wurde die *Arteria femoralis* hingegen exzidiert, so konnten keine derart veränderten Kollateralgefäße nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz kam es zu einer Wiederherstellung der Perfusion durch Angiogenese. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Wiederherstellung der Perfusion in dem von uns angewendeten Modell der kritischen HLI überwiegend durch Angiogenese vermittelt wird.

4.1.2 Einfluss der HAS3 auf pathophysiologische Angiogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Has3-defiziente* Mäuse eine im Vergleich zu WT Mäusen signifikant verschlechterte Reperfusion nach kritischer HLI aufwiesen. Die verminderte Reperfusion war dabei mit einer signifikant reduzierten Kapillardichte in ischämischen Unterschenkelmuskeln korreliert. Da die Durchblutung in dem angewendeten Ligatur-Modell überwiegend durch Kapillarwachstum wiederhergestellt wird, spricht dies für eine Bedeutung der HAS3 im Prozess der Angiogenese.

Dass es eine Korrelation zwischen der HAS3 und der Gefäßdichte geben könnte, wurde bereits in anderen pathologischen Krankheitsmodellen suggeriert. So konnte gezeigt werden, dass aggressive Prostata-Tumoren häufig mit einer Überexpression der HAS3 einhergehen.

In Kombination mit einer erhöhten Hyal1-Expression zeichneten sich die Tumoren durch eine erhöhte mikrovaskuläre Dichte aus [127].

In einem murinen Natriumdextransulfat-induzierten Kolitis-Modell führte eine *Has3*-Defizienz zu einer geringeren Gefäßdichte im pathologisch veränderten Darmgewebe, was zudem mit einer verminderten lokalen Inflammation verbunden war [128].

4.1.3 Kein Einfluss der HAS3 auf die basale Gefäßmorphologie

Obwohl es durchaus möglich ist, dass die genetische Deletion der HAS3 zu einer bereits basal veränderten Gefäßmorphologie führt, konnten keine Unterschiede im Hinblick auf die Retina-Vaskularisierung festgestellt werden. Auch die Kapillardichte in Unterschenkelmuskeln wurde durch das Fehlen der HAS3 nicht beeinflusst (nicht gezeigte Daten von Christin Lorenz).

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das Fehlen der HAS3 zwar keinen Einfluss auf die basale, physiologische Angiogenese *in vivo* hat, sie jedoch im adulten Organismus unter ischämischen bzw. inflammatorischen Bedingungen modulierend auf den Prozess der Angiogenese einwirkt. In einer kürzlich publizierten Studie wurden ähnliche Ergebnisse für das EZM-Protein *Developmental endothelial locus-1* (*Del-1*) veröffentlicht [129]. Obwohl *Del-1*-defiziente Mäuse eine erhöhte Vaskularisierung in zwei unabhängigen Ischämie-Modellen aufwiesen, zeigten sie keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich der physiologischen Retina-Vaskularisierung. Vielmehr wurde der beobachtete Phänotyp durch eine Verstärkung der post-ischämischen Inflammationsantwort induziert.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch den fehlenden Effekt einer endothelialen HAS3-Überexpression auf die Ausbildung von tubulären Strukturen *in vitro*, zumal der Versuch unter normoxischen Bedingungen, ohne Zusatz von VEGF und Zytokinen wie TNF- α durchgeführt wurde. Das verwendete *Matrigel* enthielt darüber hinaus nur ein Minimum an inkorporierten Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF und die Endothelzellen wurden auch keinem Scherstress ausgesetzt. Unter Berücksichtigung der erwähnten Versuchsbedingungen lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die endotheliale HAS3 unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Ausbildung von tubulären Strukturen hat. Insbesondere scheint sie keinen direkten Einfluss auf Differenzierung von Endothelzellen zu tubulären Strukturen haben. Somit kann das alleinige Fehlen der endothelialen *Has3* den beobachteten Phänotyp

Diskussion

im Modell der kritischen HLI nicht erklären. Um die Rolle der endothelialen HAS3 im Kontext von Ischämie und Inflammation noch besser beurteilen zu können wäre eine Modifikation der Versuchsbedingungen interessant. So könnte man den Versuch unter hypoxischen Bedingungen wiederholen. Desweiteren wäre eine Stimulation mit TNF- α als proinflammatorischen Mediator oder mit konditioniertem Medium von Immunzellen möglich.

Neben den Endothelzellen könnte in diesem Zusammenhang auch eine Veränderung von muralen Zellen wie den Perizyten von entscheidender Relevanz sein. Perizyten tragen vor allem zu der Stabilisierung von neuen Gefäßen bei. Wird die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen während der Reifungsphase gestört, so kann dies in einer vermehrten Regression der neugebildeten Gefäße resultieren. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der HAS3 in Endothelzellen erst während der Interaktion mit anderen Zelltypen zu Störungen führt. Möglich wäre z.B. eine veränderte Expression von Adhäsionsproteinen oder Zytokinen durch das Endothel, was eine veränderte Rekrutierung von Immunzellen zur Folge hätte. Diese hoch-komplexen Zell-Zell-Interaktionen können in dem *Matrigel-Tube-formation Assay* nicht abgebildet werden.

4.1.4 Unveränderte systemische Inflammation

Bekannt ist, dass das Kapillarwachstum entscheidend durch die post-ischämische Inflammationsreaktion beeinflusst wird. Deshalb könnte ein Fehlen der HAS3 in Immunzellen ebenfalls zu einer reduzierten Angiogenese *in vivo* führen. Im Folgenden wurde deshalb eine Analyse der systemischen Inflammationsreaktion in *Has3*-defizienten und WT Mäusen vorgenommen. Bei der Untersuchung zirkulierender Zyto- und Chemokine zum Zeitpunkt 48 Stunden nach kritischer HLI zeigten sich jedoch keinerlei Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Immunzellkomposition des Blutes gefunden. Auch hier konnten keine Veränderungen zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen festgestellt werden. Somit hatte die HAS3 zu dem analysierten Zeitpunkt keinen Einfluss auf systemische Inflammationsparameter, was eine Beeinflussung des lokalen Entzündungsgeschehen jedoch nicht ausschließt.

4.1.5 Verminderte Expression pro-inflammatorischer Gene

Um einen Hinweis auf die zu Grunde liegenden Mechanismen der reduzierten Angiogenese in *Has3*-defizienten Mäusen zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse der ischämischen Unterschenkelmuskeln durchgeführt. Trotz fehlender Unterschiede hinsichtlich der systemischen Inflammationsreaktion, konnte in *Has3-defizienten* Mäusen eine lokale Herabregulation von *Cxcl2*, *Lcn-2* und *Il6* festgestellt werden. Diese Gene wurden sowohl im Kontext von Inflammation, als auch Angiogenese beschrieben.

Cxcl2 zählt zu der Gruppe der CXC-Chemokine mit ELR-Motiv und stellt einen Liganden für den Rezeptor CXCR2 dar. Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf neutrophile Granulozyten [130], wurde CXCL2 in mehreren Untersuchungen mit Angiogenese assoziiert [131], [132], [133]. Die verminderte Expression von *Cxcl2* deutet auf eine reduzierte Entzündungsantwort und Angiogenese in *Has3*-defizienten Mäusen hin.

Auch die Reduktion von *Lcn-2* in *Has3*-defizienten Mäusen könnte in diesem Zusammenhang interessant sein. Als Akute-Phase-Protein spielt LCN-2 eine Rolle bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen und sterilen Gewebeschäden [134, 135]. In einem murinen Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis konnte in *Lcn-2*-defizienten Mäusen eine signifikant verminderte Rekrutierung von Neutrophilen festgestellt werden [136]. Darüber hinaus gibt es Publikationen, die eine Rolle von LCN-2 für die Angiogenese vermuten lassen. Durch die Applikation von LCN-2 in einem murinen Hornhaut-Mikrotaschen-Assay konnte eine Potenzierung der VEGF-induzierten Angiogenese erreicht werden [137]. In einem murinen Aneurysma-Modell führte *Lcn-2*-Defizienz hingegen zu einer verminderten Neovaskularisierung der Adventia [138].

Ein weiteres Gen, das in *Has3*-defizienten Mäusen signifikant herabreguliert vorlag, war *Il6*. Als pleiotropes Zytokin zeichnet sich IL6 durch vielfältige biologische Funktionen aus: So spielt es unter anderem eine Rolle bei der frühen Abwehr von Infektionen [139], bei aseptischen Entzündungen und im Metabolismus [140]. IL6 greift aktiv in die Entzündungskaskade ein, indem es in einem Komplex mit dem löslichen IL6-Rezeptor an das Endothel bindet und die Freisetzung von Chemokinen moduliert. Infolgedessen wird die Expression von Adhäsionsmolekülen gesteigert, was wiederum die Anheftung und Transmigration von Leukozyten fördert [141]. Obwohl IL6 häufig als pro-inflammatorisches Zytokin beschrieben wird, scheint die immunmodulierende Wirkung von IL6 kontextabhängig

Diskussion

zu sein: So wurde auch eine anti-inflammatorische Rolle bei der Auflösung von Entzündungsgeschehen diskutiert [142].

Eine positive Korrelation zwischen der Expression von IL6 und dem Ausmaß von Tumor-assoziiertes [143], [144] ,[145] bzw. entzündlicher [146] Angiogenese wurde in mehreren Studien bestätigt. In einem Mausmodell der Zerebralischämie kam es 48 Stunden nach dem Eingriff zu einer zeitgleichen Induktion von Il6 und anderen Angiogenese-assoziierten Genen [146]. *Il6*-defiziente Mäuse zeigten hingegen eine Reduktion der selbigen, was mit einer verminderten Kapillardichte einherging. Somit könnte eine lokal verminderte Expression von Il6 durchaus inhibierend auf den Prozess der Angiogenese wirken.

In der Summe deuten die Genexpressionsanalysen darauf hin, dass die post-ischämische Inflammationsantwort in *Has3*-defizienten Mäusen vermindert oder verzögert abläuft. Da die entsprechenden Gene auch als pro-angiogen beschrieben wurden, könnte diese Analyse einen möglichen Erklärungsansatz für die eingeschränkte Angiogenese in *Has3*-defizienten Mäusen liefern.

4.1.6 Verminderte post-ischämische Inflammationsantwort

Um zu überprüfen, ob die verminderte Expression pro-inflammatorischer Gene tatsächlich mit einer veränderten Einwanderung von Immunzellen einhergeht, wurde die Anzahl CD45-positiver Leukozyten in ischämischen Unterschenkelmuskeln bestimmt. Durch verschiedene Methoden konnte dabei eine signifikant verminderte Leukozyteninfiltration in *Has3-defizienten* Mäusen festgestellt werden. Bei der genaueren Analyse der einzelnen Immunzell-Populationen waren sowohl die neutrophilen Granulozyten, als auch Makrophagen reduziert, wohingegen keine Unterschiede hinsichtlich der zirkulierenden Zytokine und Immunzellen im Blut festgestellt werden konnten.

Die verminderte Immunzellinfiltration in *Has3*-defizienten-Mäusen könnte dabei verschiedene Ursachen haben. Denkbar wäre beispielsweise eine reduzierte Hämatopoese, Mobilisation der Immunzellen in das Blut oder Rekrutierung in das Gewebe. Da nach 48 Stunden keine Unterschiede in den zirkulierenden Immunzellen festgestellt werden konnten, scheint eine veränderte Mobilisation der Immunzellen nicht der Grund für den beobachteten Phänotyp zu sein. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Mobilisation der Immunzellen der

Diskussion

Invasion in das Gewebe vorausgeht, so dass potentielle Unterschiede in der Zirkulation nach 48 Stunden eventuell nicht mehr abgrenzbar sind.

Ein Hinweis auf die Ursache der verminderten neutrophilen Granulozyten-Infiltration könnte die Genexpressionsanalyse bieten: die Gene *Cxcl2* und *Lcn-2* lagen in Unterschenkelmuskeln von *Has3*-defizienten Mäusen reduziert vor. Interessanterweise werden diese Mediatoren in der Literatur als Neutrophilen-spezifische Lockstoffe beschrieben. Somit könnte die reduzierte Anzahl von neutrophilen Granulozyten durch eine verminderte Rekrutierung zum ischämischen Gewebe bedingt sein.

Da die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bereits wenige Stunden nach Induktion der Ischämie stattfindet, müsste man zur genauen Einordnung der Ergebnisse weitere Zeitpunkte (z.B. 12 oder 24 Stunden nach Ischämie) untersuchen. Um darüber hinaus die dynamischen Verschiebungen zwischen Mobilisation und Rekrutierung noch besser charakterisieren zu können, könnte man die Analyse auf weitere Kompartimente wie dem Knochenmark, Milz und Lymphknoten ausweiten.

Unter der Annahme, dass die Rekrutierung von Immunzellen kaskadenartig abläuft, könnte die reduzierte Makrophagen-Dichte in *Has3*-defizienten Mäusen ein Sekundäreffekt der ebenfalls verminderten Neutrophilen-Invasion sein.

Dass ein Fehlen der HAS3 eventuell Auswirkungen auf die Transmigration von Monozyten in das ischämische Gewebe haben könnte, ist jedoch durchaus denkbar: Im entzündlichen Gewebe wird die Ausbildung kabelartiger HA-Strukturen beobachtet, an denen Monozyten adhärieren können [147]. Theoretisch ist es also denkbar, dass das Fehlen der HAS3 zu einer Veränderung der lokalen HA-Matrix und weniger kabelartiger Strukturen führt, wodurch ihre adhäsiven Eigenschaften eingeschränkt werden. Diese Hypothese würde erklären, warum man zwar eine verminderte Anzahl von Leukozyten im Gewebe sieht, es jedoch zu dem untersuchten Zeitpunkt keine Unterschiede bei den zirkulierenden Immunzellen gibt.

4.2 Einfluss der HAS3 auf Arteriogenese

4.2.1 Modell der milden Hinterlaufischämie als Arteriogenese-Modell

Wie unter 4.1.1. beschrieben, erlaubt das angewendete Modell der kritischen HLI keine Aussagen über den Prozess der Arteriogenese. Um diesen Gesichtspunkt besser einordnen zu können, wurde ein milderes HLI-Modell genutzt. Da die Kollateralanschlüsse in diesem Modell intakt bleiben, können Perfusionsdefizite über die Reifung von Oberschenkel-Kollateralen ausgeglichen werden. Im ischämischen Unterschenkelmuskel findet währenddessen Kapillarwachstum statt.

Auch in diesem Modell konnte eine signifikant verschlechterte Reperfusion der *Has3-defizienten* Mäuse festgestellt werden. Obwohl davon ausgegangen werden kann, dass die Reperfusion in diesem Modell überwiegend durch die Reifung von Kollateralen wiederhergestellt wird, führt die Ischämie in den distalen Unterschenkelregionen ebenfalls zu einer Stimulation von Angiogenese. Um zu bestimmen, ob die Verschlechterung durch einen Defekt der Arteriogenese und/oder Angiogenese zustande kommt [148], wurde eine genauere Analyse der Oberschenkelkollateralen durchgeführt.

In der Tat konnte mithilfe von Magnetresonanzangiographischen Messungen gezeigt werden, dass die Erweiterung der Kollateralen in *Has3*-defizienten Mäusen eingeschränkt war, was sich in Form eines geringeren Blutvolumens zeigte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Durchblutungsstörungen in *Has3*-defizienten Mäusen durch eine Störung der Arteriogenese verursacht wurden.

4.2.2 Unveränderte Leukozyten-Infiltration nach 72 Stunden

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Immunzellpopulationen in Oberschenkelmuskeln konnten in dem milden HLI-Modell keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dies scheint im ersten Moment überraschend, da *Has3*-defiziente Mäuse in dem kritischen Ischämie-Modell eine massive Einschränkung der Immunzellinfiltration aufwiesen.

Für die Bewertung dieser Ergebnisse müssen die Mechanismen berücksichtigt werden, welcher der Angiogenese und Arteriogenese zu Grunde liegen: Arteriogenese wird durch einen erhöhten Scherstress auf kollaterale Endothelzellen induziert, wobei Hypoxie eine untergeordnete Rolle spielt. Hingegen findet die Induktion von Angiogenese in einem hypoxischen Milieu statt. Nichtsdestotrotz ist Inflammation für beide Prozesse wichtig.

Die Ergebnisse lassen verschiedene Schlussfolgerungen zu. Kiene *et al.* konnten in einem Mausmodell der operativ induzierten Karotis-Ligatur deutliche Effekte der HAS3 auf die Ausbildung einer Neointima-Hyperplasie beobachten, wobei die Deletion der HAS3 in diesem Zusammenhang protektiv war. In mechanistischen Untersuchungen waren die Unterschiede zwischen den Genotypen nicht auf eine veränderte Gefäßentzündung, sondern vielmehr auf eine veränderte Migration von glatten Muskelzellen zurück zu führen. Da die Expansion der Kollateralen vor allem durch die Migration und Proliferation der Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen beeinflusst wird, könnte dieser Mechanismus auch für das milde HLI-Modell von Relevanz sein.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde der gesamte mediale Oberschenkelmuskel aufgearbeitet. Da bekannt ist, dass Immunzellen während der Arteriogenese in sehr engem räumlichen Kontakt zu Kollateralgefäßen stehen, können lokal begrenzte Effekte mit der durchgeführten Methode eventuell nicht aufgelöst werden. Um den genauen Einfluss der Immunzellinfiltration noch besser definieren zu können, würde sich eine immunhistochemische Färbung von Kollateralgefäß-assoziierten Immunzellen anbieten.

4.2.3 Bedeutung der HAS3 für die fluss-vermittelte Vasodilatation

Zur Bestimmung der vaskulären Reagibilität von *Has3-defizienten* und WT Mäusen wurde die FMD nach einem Protokoll von Schuler *et al.* untersucht [121]. Nach 5-minütiger Ischämie und darauffolgender Hyperämie konnte in *Has3-defizienten* Mäusen eine auf die Hälfte reduzierte FMD nach 60 Sekunden gemessen werden.

Normalerweise reagiert das Endothel arterieller Gefäße auf erhöhten Scherstress mit der Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen, was mit einer temporären Vasodilatation einhergeht. Diese als FMD bezeichnete Reaktion des Körpers wird über die Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) [149, 150], *Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)* oder Prostacyclin vermittelt. Schuler *et al.* konnten für ihr Mausmodell allerdings zeigen, dass die FMD in der frühen hyperämischen Phase vor allem durch die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) beeinflusst wird. Somit könnte die reduzierte FMD in *Has3-defizienten* Mäusen eventuell mit einer veränderten eNOS-Aktivität erklärt werden, wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht weitergehend analysiert.

Da HA eine wichtige Komponente der Glykokalyx ist, könnte die Deletion der *Has3* zu einer Veränderung der Glykokalyx-Struktur führen und auf diesem Weg die Endothelzell-Reaktion auf Scherstress beeinflussen, was eventuell in einer veränderten NO-Produktion resultiert.

Der Zusammenhang zwischen einer verminderten HA-Menge in der Glykokalyx und einer eingeschränkten endothelialen NO-Produktion wurde bereits mithilfe von *ex vivo* Experimenten charakterisiert. Beispielsweise legen Untersuchungen von Mochizuki *et al.* nahe, dass HA wichtige Funktionen bei der Mechanotransduktion von Scherstress übernimmt [151]: In isolierten Femoralarterien von Hunden führte die Infusion von Hyaluronidase zu einer signifikant verringerten, flussvermittelten NO-Produktion. Im Gegensatz dazu wurde die Acetylcholin-induzierte NO-Produktion nicht durch die Applikation der Hyaluronidase beeinflusst. Aus diesen Untersuchungen leiten die Autoren eine wichtige Rolle der HA für die Scherstress-abhängige NO-Produktion ab, jedoch nicht für die Agonisten-induzierte NO-Produktion.

Diskussion

In einer Mausstudie von 2010 wurde die Rolle des HA-Inhibitors 4-MU in einem Modell der Atherosklerose untersucht [152]. Die Reduktion von HA in der Glykokalyx durch die 4-MU-Behandlung führte zu einer deutlichen Progression der Atherosklerose. Dies war mit einer signifikant verschlechterten Acetylcholin-abhängigen Vasorelaxation verbunden.

Da 4-MU alle HA-Synthasen hemmt, können diese Effekte keiner HA-Synthase-Isoform zugeordnet werden und erlauben keine Aussagen über die Bedeutung der HAS3 für die Endothelfunktion.

Die Endothelfunktion *Has3*-defizienter Mäuse wurde jedoch von Kiene *et al.* charakterisiert [113]: Hierzu wurde die endothel-abhängige (Acetylcholin-induzierte) und -unabhängige Relaxation von Aortenringen analysiert. Weder bei der Stimulation mit Acetylcholin, noch bei der endothel-unabhängigen Relaxation durch den NO-Donor *S-nitroso-N-acetyl-d,l-penicillamine* (SNAP) waren signifikante Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen festzustellen. Darüber hinaus gab es keine Unterschiede bei der eNOS-Proteinexpression der Aorten. Eine Analyse der eNOS-Phosphorylierung wurde hingegen nicht vorgenommen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint die HAS3 zwar keine Rolle bei der Agonisten-induzierten Vasodilatation zu spielen, könnte allerdings unter Scherstressbedingungen wichtig für die Mechanotransduktion und darauffolgende Aktivierung (Phosphorylierung) der eNOS sein. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste zunächst geklärt werden, inwiefern sich die Glykokalyx *Has3*-defizienter Mäuse überhaupt von WT Mäusen unterscheidet. Diese Fragestellung könnte mithilfe von Elektronenmikroskopischen Aufnahmen beantwortet werden. Interessant wäre auch die Bestimmung der eNOS-Phosphorylierung in temporär okkludierten Gefäßen.

Da erhöhter Scherstress in Kollateralen maßgeblich an der Initiation der Arteriogenese beteiligt ist, könnte die reduzierte FMD in *Has3*-defizienten Mäusen eventuell eine Erklärung für die verminderte Perfusion nach milder HLI bieten. In der Tat zeigten Endothelzell-spezifische *Has3*-defiziente Mäuse eine fast identische Einschränkung der Reperfusion nach milder HLI auf. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die endotheliale HAS3 wichtig für die Ausreifung von nativen Kollateralgefäßen zu funktionsfähigen Arterien ist und auf diese Weise zu einer Kompensation von Perfusionsdefiziten beitragen kann.

4.2.4 Ausblick und Limitierung

In der vorliegenden Arbeit wurden *Has3*-defiziente Mäuse und entsprechende WT Kontrollen in zwei unterschiedlichen Modellen der operativ-induzierten HLI untersucht. In diesen Modellen konnte ein wesentlicher Einfluss der HAS3 für die Angiogenese sowie Arteriogenese festgestellt werden. Inwiefern sich diese Ergebnisse jedoch auch auf andere Organe wie dem Herzen übertragen lassen, und ob die HAS3 auch in diesen Geweben zu einer Revaskularisierung nach ischämischen Ereignissen beiträgt, lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Gefäßbetten nur schwer einschätzen. Diese Fragestellungen müsste man mithilfe von weiteren Untersuchungen beantworten. Interessant wäre beispielsweise eine Untersuchung von *Has3*-defizienten Mäusen in einem akuten Myokardinfarkt-Modell.

Eine weitere Limitierung stellt die operative Induktion der kritischen HLI dar. Die Exzision der *Arteria femoralis* führt zu einer intensiven Ischämie des Unterschenkelmuskels und ermöglicht eine Untersuchung der Angiogenese *in vivo*. Nichtsdestotrotz stellt die Entfernung der Femoralarterie einen artifiziellen Zustand dar, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Untersuchungen in einem milden HLI-Modell durchgeführt.

Bei der Analyse der Retina-Vaskularisierung konnten keine Unterschiede zwischen *Has3*-defizienten und WT Mäusen festgestellt werden. Diese Untersuchungen wurden an vollständig entwickelten Retina-Präparaten adulter Mäuse durchgeführt. Um weitere Einblicke über den zeitlichen Ablauf der Retina-Vaskularisierung zu erhalten, wäre eine ergänzende Analyse junger Mäuse sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse über die Bedeutung der HAS3 in der post-ischämischen Inflammationsantwort gewonnen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HAS3 die Transmigration der Immunzellen in das Gewebe beeinflusst, jedoch keinen Einfluss auf die Mobilisation der Immunzellen aus dem Knochenmark in das Blut hat. Um eine genaue Aussage über die Funktion der HAS3 in der post-ischämischen Inflammation und deren Einfluss auf Angiogenese machen zu können, müssten mehrere Zeitpunkte analysiert werden. Insbesondere die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten findet bereits wenige Stunden nach dem Eingriff statt, so dass eine ergänzende Analyse dieser Immunzellpopulation nach 24 Stunden sinnvoll wäre.

5. Zusammenfassung

Ischämische Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind nach wie vor die Haupttodesursache weltweit. Lebensbedrohliche Komplikationen können durch den akuten Verschluss eines arteriellen Gefäßes entstehen. Wird die Durchblutung nicht unmittelbar und langfristig wiederhergestellt, so kann der Sauerstoffmangel im schlimmsten Fall zum Absterben des betroffenen Gewebes führen. Zwei körpereigene Prozesse, die zu einer Revaskularisierung ischämischen Gewebes und einer Kompensation von Durchblutungsstörungen beitragen können, sind die Angiogenese und Arteriogenese. In Ergänzung zu den bereits zur Verfügung stehenden Therapien könnte eine gezielte Stimulation dieser Prozesse zahlreichen Patienten mit ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen helfen und vor den Auswirkungen von Durchblutungsstörungen schützen.

Es ist bekannt, dass sowohl Angiogenese als auch Arteriogenese durch die post-ischämische Entzündungsantwort stimuliert werden. In diesem Zusammenhang könnte die Hyaluronsäure-Synthase 3 (HAS3) ein interessantes *Target* darstellen, da sie bereits im Kontext von entzündlichen Gefäßpathologien wie der Atherosklerose untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der HAS3 auf Blutgefäßneubildung durch Angiogenese und die Erweiterung bereits bestehender Kollateralgefäße durch Arteriogenese ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden *Has3*-defiziente Mäuse und entsprechende WT Kontrollen in zwei unterschiedlichen Modellen der operativ induzierten Hinterlaufischämie (HLI) untersucht. In einem Modell der kritischen HLI wiesen *Has3-defiziente* Mäuse eine im Vergleich zu WT Mäusen signifikant verschlechterte Reperfusion auf. Die verschlechterte Durchblutung war dabei mit einer signifikant reduzierten Kapillardichte in ischämischen Unterschenkelmuskeln korreliert, wohingegen die basale Muskelkapillardichte sowie Retina-Vaskularisierung nicht durch das Fehlen der HAS3 beeinflusst wurden. Obwohl es zum untersuchten Zeitpunkt keine Unterschiede im Hinblick auf zirkulierende Immunzellen und Zyto- sowie Chemokine gab, deuteten Genexpressionsanalysen auf eine lokal veränderte Entzündungsantwort in *Has3*-defizienten Mäusen hin. In der Tat konnte eine signifikant verminderte Leukozyteninfiltration in Unterschenkelmuskeln festgestellt werden, welche sich in einer reduzierten Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen widerspiegelte. *Has3*-defiziente Mäuse wiesen auch in dem milden HLI-Modell eine signifikant verschlechterte Reperfusion im Vergleich zu WT Mäusen auf, was auf einer Störung der Arteriogenese beruhte. Allerdings konnte der beobachtete Phänotyp nicht auf eine veränderte Immunzell-Rekrutierung zum Oberschenkelmuskel zurückgeführt werden. Jedoch wies die Analyse der Flussvermittelten Vasodilatation (FMD) auf eine Störung der vaskulären

Reagibilität in *Has3*-defizienten Mäusen hin. Es ist möglich, dass die unzureichende Vasodilatation bestehender Gefäße zu der verminderten Reperfusion in *Has3*-defizienten Mäusen beiträgt. Eine Beteiligung des Endothels ist wahrscheinlich, da endothelzell-spezifische *Has3*-defiziente Mäuse ebenfalls unter Perfusionsstörungen litten. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass die HAS3 im Kontext von ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu einer Neubildung von Kapillaren durch Angiogenese beiträgt, indem sie die Rekrutierung von Leukozyten zum ischämischen Gewebe vermittelt. Darüberhinaus ist die HAS3 an der Ausreifung von Kollateralen zu funktionsfähigen Arterien beteiligt, wobei die endotheliale HAS3 eine besondere Rolle zu spielen scheint.

6. Summary

Ischemic cardiovascular diseases are still the main cause of death worldwide. Life-threatening complications can result from the acute occlusion of an arterial vessel. If perfusion is not restored immediately and over time, ischemia can ultimately lead to tissue death. Angiogenesis and arteriogenesis are two endogenous processes, which can contribute to revascularization of ischemic tissue and compensation of circulatory disorders. In addition to existing therapies, a targeted stimulation of these processes could potentially help numerous patients with ischemic cardiovascular diseases by protecting them against the effects of circulatory disorders.

It's known that angiogenesis as well as arteriogenesis are triggered by the post-ischemic inflammatory response. In this context, Hyaluronan synthase 3 (HAS3) could be an interesting target as it has been already described to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. Purpose of the present study was to elucidate the role of HAS3 in adaptive vessel growth by angiogenesis and arteriogenesis. To address these questions, *Has3*-deficient and WT mice were subjected to two different models of surgically induced hind limb ischemia (HLI).

In a model of critical HLI, blood-flow recovery was significantly reduced in *Has3*-deficient mice. Impaired blood-flow was in line with a reduced capillary density in ischemic calf muscles, while basal muscle and retina vascularization were not affected by the deletion of HAS3. Although circulating immune cell subsets and circulatory cyto- and chemokines were not changed between *Has3*-deficient and WT mice, gene expression analysis revealed a locally impaired inflammatory response in *Has3*-deficient mice. Indeed, a decreased leucocyte infiltration could be detected in ischemic calf muscles, which was caused by a reduced number of neutrophils and macrophages. Similar to critical HLI, *Has3*-deficient mice showed an impaired reperfusion and collateral growth after mild HLI, while flow cytometric analysis of thigh muscle showed no differences in leukocyte recruitment. However, the analysis of flow mediated dilation (FMD) suggested an impaired vascular reactivity in *Has3*-deficient mice. A contribution of endothelial cells seems to be likely, because endothelial-specific deletion of *Has3* showed similar results as compared to global deletion. It is possible, that insufficient vasodilation of pre-existing vessels contributes to the impaired reperfusion after mild HLI. In summary, HAS3 contributes to inflammation-driven neovessel-formation by mediating leukocyte recruitment as one major trigger for angiogenesis. Moreover, HAS3 is involved in the remodelling of collaterals to functional arteries. In this regard, HAS3 in endothelial cells seems to play an important role.

7. Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H., *Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015*. 2016.
2. WHO, *Cardiovascular diseases (CVDs) (Stand 2017)*. 2016.
3. Leng, G.C., et al., *Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease in the general population*. *Int J Epidemiol*, 1996. **25**(6): p. 1172-81.
4. Criqui, M.H., et al., *The epidemiology of peripheral arterial disease: importance of identifying the population at risk*. *Vasc Med*, 1997. **2**(3): p. 221-6.
5. Buschmann, I. and W. Schaper, *Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth*. *News Physiol Sci*, 1999. **14**: p. 121-125.
6. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
7. Yano, K., L.F. Brown, and M. Detmar, *Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(4): p. 409-17.
8. Arnold, F. and D.C. West, *Angiogenesis in wound healing*. *Pharmacol Ther*, 1991. **52**(3): p. 407-22.
9. Reynolds, L.P., S.D. Killilea, and D.A. Redmer, *Angiogenesis in the female reproductive system*. *FASEB J*, 1992. **6**(3): p. 886-92.
10. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
11. Krupinski, J., et al., *Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke*. *Stroke*, 1994. **25**(9): p. 1794-8.
12. Koch, A.E., *The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59 Suppl 1**: p. i65-71.
13. Maynard, S.E., et al., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(5): p. 649-58.
14. Martinez, P., et al., *Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells*. *Osteoporos Int*, 2002. **13**(11): p. 874-81.
15. Jenkinson, L., et al., *Helicobacter pylori prevents proliferative stage of angiogenesis in vitro: role of cytokines*. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(8): p. 1857-62.
16. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
17. Sebag, J. and J.W. McMeel, *Diabetic retinopathy. Pathogenesis and the role of retina-derived growth factor in angiogenesis*. *Surv Ophthalmol*, 1986. **30**(6): p. 377-84.
18. Eelen, G., et al., *Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature*. *Circ Res*, 2015. **116**(7): p. 1231-44.
19. Logsdon, E.A., et al., *A systems biology view of blood vessel growth and remodelling*. *J Cell Mol Med*, 2014. **18**(8): p. 1491-508.
20. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
21. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. *Science*, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
22. Esser, S., et al., *Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells*. *J Cell Sci*, 1998. **111 (Pt 13)**: p. 1853-65.
23. Teichert, M., et al., *Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 16106.
24. Chun, T.H., et al., *MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(4): p. 757-67.

25. Hiraoka, N., et al., *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins*. Cell, 1998. **95**(3): p. 365-77.
26. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
27. Blanco, R. and H. Gerhardt, *VEGF and Notch in tip and stalk cell selection*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a006569.
28. Henke, C.A., et al., *CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2541-52.
29. van Hinsbergh, V.W., A. Collen, and P. Koolwijk, *Role of fibrin matrix in angiogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 426-37.
30. Senger, D.R., *Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 1-7.
31. Gaudry, M., et al., *Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4153-61.
32. Schrufer, R., et al., *The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18-deficient mice*. J Vasc Res, 2006. **43**(1): p. 1-11.
33. Ardi, V.C., et al., *Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20262-7.
34. Gonzalez, A.M., et al., *Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16075-80.
35. Aviezer, D., et al., *Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1005-13.
36. Echtermeyer, F., et al., *Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4*. J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. R9-R14.
37. Moldovan, N.I., et al., *Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. 378-84.
38. Goumans, M.J., et al., *Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1743-53.
39. van Uden, P., N.S. Kenneth, and S. Rocha, *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB*. Biochem J, 2008. **412**(3): p. 477-84.
40. Ziello, J.E., I.S. Jovin, and Y. Huang, *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia*. Yale J Biol Med, 2007. **80**(2): p. 51-60.
41. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
42. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
43. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
44. Kallio, P.J., et al., *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6519-25.

45. Kong, X., et al., *Constitutive/hypoxic degradation of HIF-alpha proteins by the proteasome is independent of von Hippel Lindau protein ubiquitylation and the transactivation activity of the protein.* J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15498-505.
46. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.* Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
47. Ben-Yosef, Y., et al., *Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation.* Circ Res, 2002. **90**(7): p. 784-91.
48. Oh, H., et al., *Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15732-9.
49. Melillo, G., et al., *A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter.* J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1683-93.
50. Chandel, N.S., et al., *Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin.* J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1013-21.
51. Ishii, K.J., et al., *Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs.* J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2602-7.
52. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2.* J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1272-81.
53. Frangogiannis, N.G., et al., *Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion.* Circulation, 1998. **98**(7): p. 699-710.
54. Singh, M. and H.K. Saini, *Resident cardiac mast cells and ischemia-reperfusion injury.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2003. **8**(2): p. 135-48.
55. Jones, S.P., et al., *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(5): p. H2196-201.
56. Briaud, S.A., et al., *Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H60-7.
57. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.
58. Johnson, C., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching.* Circ Res, 2004. **94**(2): p. 262-8.
59. Nucera, S., D. Biziato, and M. De Palma, *The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration.* Int J Dev Biol, 2011. **55**(4-5): p. 495-503.
60. Diez-Roux, G., et al., *Macrophages kill capillary cells in G1 phase of the cell cycle during programmed vascular regression.* Development, 1999. **126**(10): p. 2141-7.
61. Stasinski, T., et al., *[Effect of pacing on the function of the cardiovascular system in ischemic heart disease and pathological bradycardia].* Pol Tyg Lek, 1979. **34**(10): p. 369-72.
62. Maruotti, N., et al., *Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases.* Vasc Cell, 2013. **5**(1): p. 11.
63. Lin, Q., et al., *High-mobility group box-1 mediates toll-like receptor 4-dependent angiogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 1024-32.
64. De Filippo, K., et al., *Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways.* J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4308-15.
65. Strieter, R.M., et al., *The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27348-57.

66. Schaper, W. and W.D. Ito, *Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth*. *Circ Res*, 1996. **79**(5): p. 911-9.
67. Lindner, V. and T. Maciag, *The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis*. *Circ Res*, 2001. **89**(9): p. 747-9.
68. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-95.
69. Sherman, J.A., et al., *Humoral and cellular factors responsible for coronary collateral formation*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(9): p. 1194-7.
70. Schaper, W., *Collateral circulation: past and present*. *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(1): p. 5-21.
71. Chalothorn, D., et al., *Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains*. *Physiol Genomics*, 2007. **30**(2): p. 179-91.
72. Helisch, A., et al., *Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(3): p. 520-6.
73. Meier, P., et al., *The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(5): p. 614-21.
74. Yoon, S.J., et al., *Impact of coronary artery collaterals on infarct size assessed by serial cardiac magnetic resonance imaging after primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction*. *Coron Artery Dis*, 2009. **20**(7): p. 440-5.
75. Schaper, J., M. Borgers, and W. Schaper, *Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart*. *Am J Cardiol*, 1972. **29**(6): p. 851-9.
76. Hoefer, I.E., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis*. *Circulation*, 2002. **105**(14): p. 1639-41.
77. Ito, W.D., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion*. *Circ Res*, 1997. **80**(6): p. 829-37.
78. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. *Virchows Arch*, 2000. **436**(3): p. 257-70.
79. Weissmann, B., et al., *Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid*. *J Biol Chem*, 1954. **208**(1): p. 417-29.
80. 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.
81. Cao, G., et al., *Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(1): p. 325-36.
82. Termeer, C., J.P. Sleeman, and J.C. Simon, *Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response?* *Trends Immunol*, 2003. **24**(3): p. 112-4.
83. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 221-64.
84. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
85. Spicer, A.P., et al., *Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes*. *Genomics*, 1997. **41**(3): p. 493-7.
86. Stern, R. and M.J. Jedrzejas, *Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action*. *Chem Rev*, 2006. **106**(3): p. 818-39.
87. Csoka, A.B., G.I. Frost, and R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. *Matrix Biol*, 2001. **20**(8): p. 499-508.
88. Lepperdinger, G., B. Strobl, and G. Kreil, *HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(35): p. 22466-70.

89. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
90. Yang, B., L. Zhang, and E.A. Turley, *Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8617-23.
91. Milev, P., et al., *Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(2): p. 207-12.
92. Jiang, D., et al., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
93. Huang, L., M. Yoneda, and K. Kimata, *A serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter alpha-trypsin inhibitor*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26725-30.
94. Zhou, B., et al., *Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37733-41.
95. Lee, T.H., et al., *Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor- and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6154-60.
96. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 789-801.
97. Deed, R., et al., *Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 251-6.
98. Slevin, M., S. Kumar, and J. Gaffney, *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41046-59.
99. Slevin, M., et al., *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation*. Lab Invest, 1998. **78**(8): p. 987-1003.
100. Sattar, A., et al., *Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(4): p. 576-9.
101. Montesano, R., et al., *Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro*. Lab Invest, 1996. **75**(2): p. 249-62.
102. Wang, Y., et al., *Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis*. Pharmacol Rep, 2016. **68**(6): p. 1126-1132.
103. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol, 2007. **26**(1): p. 58-68.
104. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1672-80.
105. Rubio-Gayosso, I., S.H. Platts, and B.R. Duling, *Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2247-56.
106. Sokolowska, M., et al., *Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2alpha and eicosanoid production in monocytes and macrophages*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 4470-88.
107. Taylor, K.R., et al., *Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18265-75.
108. Khan, A.I., et al., *Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7594-601.
109. McDonald, B., et al., *Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 915-27.

110. Nacher, M., et al., *Physiological contribution of CD44 as a ligand for E-Selectin during inflammatory T-cell recruitment*. Am J Pathol, 2011. **178**(5): p. 2437-46.
111. Vigetti, D., et al., *The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells*. Glycobiology, 2009. **19**(5): p. 537-46.
112. van den Boom, M., et al., *Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis*. Circ Res, 2006. **98**(1): p. 36-44.
113. Kiene, L.S., et al., *Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(2): p. e9-16.
114. Xi, W., et al., *Plasma hyaluronan and collateral development in patients with coronary artery disease*. Coron Artery Dis, 2010. **21**(4): p. 228-32.
115. van Royen, N., et al., *CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1647-52.
116. Homann, S., et al., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession*. Matrix Biol, 2017.
117. Gothert, J.R., et al., *Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1769-77.
118. Driesen, T., et al., *A systematic approach to assess locoregional differences in angiogenesis*. Histochem Cell Biol, 2016. **145**(2): p. 213-25.
119. Hellingman, A.A., et al., *Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2010. **40**(6): p. 796-803.
120. Boring, Y.C., et al., *Lack of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes arteriogenesis*. Cardiovasc Res, 2013. **97**(1): p. 88-96.
121. Schuler, D., et al., *Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(12): p. 2651-7.
122. Pitulescu, M.E., et al., *Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice*. Nat Protoc, 2010. **5**(9): p. 1518-34.
123. Limbourg, A., et al., *Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1737-46.
124. Zudaire, E., et al., *A computational tool for quantitative analysis of vascular networks*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27385.
125. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
126. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
127. Bharadwaj, A.G., et al., *Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing*. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 1027-36.
128. Kessler, S.P., D.R. Obery, and C. de la Motte, *Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model*. Int J Cell Biol, 2015. **2015**: p. 745237.
129. Klotzsche-von Ameln, A., et al., *Endogenous developmental endothelial locus-1 limits ischaemia-related angiogenesis by blocking inflammation*. Thromb Haemost, 2017. **117**(6): p. 1150-1163.
130. Bizzarri, C., et al., *ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(1): p. 139-49.

131. Belo, A.V., et al., *Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue*. *Microcirculation*, 2005. **12**(7): p. 597-606.
132. White, E.S., et al., *Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(2): p. 853-60.
133. Addison, C.L., et al., *The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 5269-77.
134. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. *Nature*, 2004. **432**(7019): p. 917-21.
135. Chakraborty, S., et al., *The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1826**(1): p. 129-69.
136. Schroll, A., et al., *Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(12): p. 3346-57.
137. Yang, J., et al., *Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer*. *FASEB J*, 2013. **27**(1): p. 45-50.
138. Tarin, C., et al., *Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice*. *Cardiovasc Res*, 2016. **111**(3): p. 262-273.
139. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. *Nature*, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
140. Wallenius, V., et al., *Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity*. *Nat Med*, 2002. **8**(1): p. 75-9.
141. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. *Immunity*, 1997. **6**(3): p. 315-25.
142. Xing, Z., et al., *IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(2): p. 311-20.
143. Shinriki, S., et al., *Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(17): p. 5426-34.
144. Nagasaki, T., et al., *Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(2): p. 469-78.
145. Wei, L.H., et al., *Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway*. *Oncogene*, 2003. **22**(10): p. 1517-27.
146. Gertz, K., et al., *Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis*. *Brain*, 2012. **135**(Pt 6): p. 1964-80.
147. Kessler, S., et al., *Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation*. *Clin Transl Sci*, 2008. **1**(1): p. 57-61.
148. Heil, M., et al., *Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(6): p. H2411-9.
149. Bellien, J., et al., *[Role of endothelium-derived nitric oxide in sustained flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries]*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2003. **96**(7-8): p. 738-41.
150. Joannides, R., et al., *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo*. *Circulation*, 1995. **91**(5): p. 1314-9.
151. Mochizuki, S., et al., *Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(2): p. H722-6.

152. 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.

8. Originalarbeiten

Driesen, T., Schuler ,D., Schmetter ,R., Heiss ,C., Kelm ,M., Fischer JW., Freudenberger T.,
A systematic approach to assess locoregional differences in angiogenesis. Histochem Cell
Biol, 2016. **145**(2): p. 213-25.

9. Posterpräsentationen

Hyaluronan Synthase 3 deficiency leads to reduced leukocyte infiltration and neovessel-formation in a mouse model of hind limb ischemia

Schneckmann R, Driesen T, Freudenberger T, Hartwig S, Heiss C, Kelm M, Lorenz C, Lehr S, Fischer JW, Grandoch M

84th Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2018, Göttingen

Hyaluronan Synthase 3 promotes post-ischemic inflammation and vascular remodeling in a mouse model of unilateral hind limb ischemia

Schneckmann R, Driesen T, Freudenberger T, Hartwig S, Heiss C, Kelm M, Lorenz C, Lehr S, Fischer JW, Grandoch M

83rd Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2017, Heidelberg

Hyaluronan Synthase 3 promotes post-ischemic inflammation and neovascularization in a mouse model of severe hind limb ischemia

Schmetter R, Driesen T, Freudenberger T, Hartwig S, Heiss C, Kelm M, Lorenz C, Lehr S, Schuler D, Fischer JW, Grandoch M

Joint International Meeting Perspectives in Vascular Biology, 2016, Frankfurt

Blood-flow recovery after unilateral hind limb ischemia is influenced by hyaluronan synthesis

Schmetter R, Driesen T, Schuler D, Feldmann K, Bayer JK, Grandoch M, Heiss C, Kelm M, Fischer JW, Freudenberger T

81st Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2015, Kiel

10. Lebenslauf

Person	
Name	Rebekka Schneckmann geb. Schmetter
Geburtsdatum	18.03.1988
Geburtsort	Kamp-Lintfort
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet
Promotion	
08/2013-08/2018	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer Thema: „Bedeutung der Hyaluronsäure-Synthese 3 für die Angiogenese und Arteriogenese“
Studium	
06/2013	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin
11/2012-05/2013	Pharmaziepraktikum in der Apotheke Dr. Hermann Düsseldorf
05/2012-11/2012	Pharmaziepraktikum im Institut für medizinische und pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Arbeitskreis Prof. Dr. Thomas Kurz
10/2011	2. Staatsexamen
10/2010-03/2012	NRW-Stipendium
03/2010	1. Staatsexamen
04/2008-04/2012	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Schule	
08/1998-06/2007	Friedrich-Spee-Gymnasium, Geldern
08/1994-06/1998	Gemeinschaftsgrundschule Issum, Issum

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich gerne bei Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer dafür bedanken, dass ich diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen durfte. Ich freue mich, dass er mir die Möglichkeit zur Assoziation mit dem Sonderforschungsbereich 1116 gab, wodurch ich intensive Einblicke in den Bereich der Herz-Kreislauf-Forschung gewinnen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Maria Grandoch, die mich in allen Phasen meiner Promotion unterstützt hat. Das mir entgegen gebrachte Vertrauen hat mir sehr geholfen meine eigenen Fähigkeiten zu erkennen und im Zuge der Promotion weiter auszubauen. Durch die gute Kommunikation hat mir die Zusammenarbeit viel Spaß bereitet.

Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Till Freudenberger danke ich für die Betreuung und gewissenhafte Einarbeitung in die Laborpraxis. Er hat das Projekt in die Wege geleitet und somit wesentlich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf für die angenehme Zusammenarbeit und den regen Gedankenaustausch bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Kerstin Freidel, die mich mit ihrer steten Hilfsbereitschaft und herzlichen Art niemals im Stich gelassen hat. Ohne sie hätten zahlreiche Analysen nicht stattfinden können. Annika Zimmermann möchte ich für die moralische Unterstützung und ihre herzliche Art danken. Insbesondere ihr Humor hat mich nachhaltig geprägt. Anne Petz danke ich für die freundschaftliche Büro-Atmosphäre und vielen, hilfreichen Gespräche. Durch sie ist der Laboralltag um einiges bunter geworden.

Erika Lohmann, Sabine Lohmann und Karin Montag danke ich für die organisatorische Unterstützung.

Allen Kooperationspartnern möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit danken. Durch die gute Vernetzung zwischen den Arbeitsgruppen konnte der wissenschaftliche Wert dieser Arbeit sehr gesteigert werden.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie, da sie stets für mich da war und niemals den Glauben an mich verloren hat. Meinem Mann Oliver gilt ein besonderer Dank, weil er mich bedingungslos unterstützt hat, mir den Rücken stets freigehalten hat und sich oftmals in Geduld üben musste.

12. 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 15.06.2018

Rebekka Schneckmann