

Bedeutung der Hyaluronsäure nach kardialer Ischämie und Reperfusion

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anne Petz

aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2019

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. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	1
1.2 Todesursachen in Deutschland.....	1
1.3 Der Myokardinfarkt	3
1.3.1 Der Kardiomyozytenuntergang und die Initiation der Inflammation.....	3
1.3.2 Die Inflammationsreaktion	5
1.3.2.1. Neutrophile Granulozyten	5
1.3.2.2. Monozyten und Makrophagen	6
1.3.2.4. Die Lymphozyten	10
1.3.3 Die Fibroblastenantwort.....	10
1.4 Das Hyaluronsäuresystem	13
1.4.1 Hyaluronsäure.....	13
1.4.2 Hyaluronsäuresynthasen	13
1.4.3 Hyaluronsäurerezeptoren und -bindeproteine.....	14
1.4.4 Hyaluronsäure-Katabolismus	15
1.5 Hyaluronsäure und Inflammation	16
1.6 Hyaluronsäure und Fibroblasten	17
1.7 Hyaluronsäure und Myokardinfarkt	18
1.7.1 Einfluss der HAS2 auf die kardiale Funktion.....	19
1.8 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Tierversuche	22
2.1.1 Mäuse	22
2.1.2 Durchführung der Ischämie und Reperfusion	22
2.2 Durchflusszytometrie	23
2.2.1 Blut	24
2.2.2 Knochenmark	24
2.2.3 Milz	25
2.2.4 Herz.....	25
2.2.4.1 Bromdesoxyuridin Markierung	26
2.2.4.2 Ki67 Färbung.....	26

2.3	Zytokin/Chemokin Quantifizierung	27
2.3.1	Plasma Generierung	27
2.3.2	Multiplex-Analyse	28
2.3.3	M-CSF Bestimmung	28
2.4	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Realtime</i> -PCR	28
2.4.1	RNA Extraktion	28
2.4.2	cDNA Synthese	29
2.4.3	quantitative Realtime-PCR	29
2.5	Histologische Analysen	30
2.5.1	Mac-2 Färbung	31
2.5.2	Ly6G Färbung	31
2.5.3	Fibroblasten Färbung	31
2.5.4	Hyaluronsäure Färbung	31
2.6	Versuche an kultivierten Zellen	33
2.6.1	Isolation und Kultivierung der kardialen Fibroblasten	33
2.6.2	Stimulation der kardialen Fibroblasten	33
2.6.3	Quantifizierung von HA im Zellüberstand kardialer Fibroblasten, Monozyten sowie Makrophagen sowie im Plasma	34
2.6.4	Immunzytochemische Färbung der kardialen Fibroblasten	34
2.6.5	Isolation und Kultivierung der Knochenmarksmonozyten	34
2.6.6	Stimulation der Knochenmarksmonozyten	35
2.6.7	Co-Kultivierung von Knochenmarksmonozyten und Fibroblasten	35
2.7	Statistische Analyse	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Einfluss der HAS2 auf die postischämische Inflammation	39
3.1.1	Die lokale Immunantwort 72 Stunden nach Myokardinfarkt	39
3.1.2	Die Immunantwort in der Milz 72 Stunden nach Myokardinfarkt	44
3.1.3	Die Immunantwort im Knochenmark 72 Stunden nach Myokardinfarkt	45
3.1.4	Die systemische Immunantwort 72 Stunden nach Myokardinfarkt	46
3.1.5	Die Immunantwort der Monozyten und Makrophagen 24 Stunden nach Myokardinfarkt	49
3.1.6	Die frühe Immunantwort der neutrophilen Granulozyten 12 Stunden und 24 Stunden nach Myokardinfarkt	51
3.2	Mechanistische Untersuchungen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
3.2.1	HA-Produktion	54

3.2.2	Untersuchung der mRNA Expression der Chemokinrezeptoren <i>Ccr2</i> , <i>Ccr4</i> und <i>Cx3cr1</i>	56
3.2.3	Untersuchung der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen	57
3.2.4	Untersuchung der Apoptose während der Differenzierung der Monozyten	58
3.2.5	Ko-Kultivierung von Fibroblasten und Monozyten	59
3.2.6	Untersuchung der Proliferation 72 Stunden nach Myokardinfarkt	62
3.2.7	Untersuchung der Apoptose in den Makrophagen 72 Stunden nach Myokardinfarkt 65	
3.3	Einfluss der HAS2 auf die Fibroblasten nach Myokardinfarkt	66
3.4	Untersuchung der Fibroblastenaktivierung <i>in vitro</i>	69
4.	Diskussion	71
4.1	HAS2 und kardiale Funktion nach Myokardinfarkt	72
4.2	HAS2 und Inflammation nach Myokardinfarkt	74
4.2.1	Die detaillierte Charakterisierung der Immunantwort.....	74
4.2.2	Die möglichen Ursachen für die beobachtete Makrophagenreduktion im Herzen...77	
4.3	HAS2 und Fibroblasten nach Myokardinfarkt	80
4.4	Interaktion Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten	82
4.5	Hyaluronsäure-Akkumulation	83
4.6	Limitierung und Ausblick	85
5.	Zusammenfassung	87
6.	Summary	88
7.	Appendix.....	89
8.	Abbildungsverzeichnis	91
9.	Tabellenverzeichnis	93
10.	Literaturverzeichnis	94
11.	Originalarbeiten	108
12.	Kongressbeiträge	109
13.	Lebenslauf.....	110
14.	Danksagung	111
15.	Eidesstattliche Versicherung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>Acta2</i>	Aktin, $\alpha 2$, <i>Smooth Muscle</i> , Aorta
AF	Alexa Flour
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
CANTOS	<i>Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribunucleic acid</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Da	Dalton
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribunucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGR	<i>Early growth response protein</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
g	Gramm
<i>g</i>	<i>Gravity</i>
GAG	Gykosaminoglykan
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAC	N-Acetylglukosamin
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	<i>hour</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HARE	<i>Hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HYAL	Hyaluronidase
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
I/R	Ischämie und Reperfusion
IαI	Inter-α-Inhibitor
KC	<i>Keratinocyte-derived cytokine</i>
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
LAD	<i>Left anterior descending</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LV	Linker Ventrikel
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
Ly6	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
Mac-2	Galektin 3
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL-2)</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MertK	<i>Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
PerCP/Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-protein Cyanin5.5 Tandem Konjugat
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
Postn	Periostin

PPR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
RNase	Ribonuklease
<i>Rn18s</i>	<i>18S ribosomale RNA</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STEMI	<i>ST-Elevation Myocardial Infarction</i>
Tab.	Tabelle
Tcf	<i>Transkription factor</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TSG6	<i>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U	<i>Unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
V	Volumen
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T	zum Teil
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
4-MU	4-Methyumbelliferon

1. Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie die Herzinsuffizienz, die koronare Herzerkrankung und der Myokardinfarkt (MI), zählen zu den häufigsten Krankheiten mit Todesfolge in Deutschland und verursachen die höchsten Krankheitskosten¹. Es sind viele Risikofaktoren bekannt, die zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen können, u.a. hoher Blutdruck, hohe Cholesterinspiegel, Diabetes mellitus, Rauchen, Übergewicht, genetische Prädisposition, ein inaktiver Lebensstil, ungesunde Essgewohnheiten, fortschreitendes Alter und Stress^{2, 3}. Die Diagnose erfolgt häufig im späteren Krankheitsverlauf und die Sterblichkeit infolge von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist hoch.

1.2 Todesursachen in Deutschland

Laut dem statistischen Bundesamt sind im Jahr 2016 910.902 Menschen in Deutschland gestorben, darunter 462.595 Frauen und 448.304 Männer. Unter allen registrierten Todesfällen im Jahr 2016 in Deutschland liegt die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 7,9 % aller Todesfälle auf Platz eins, gefolgt von dem MI mit 5,3 % auf Platz zwei und der Herzinsuffizienz auf Platz vier mit 4,4 %. Bei Betrachtung der häufigsten zehn Todesursachen, zeigt sich folgende Verteilung in Deutschland, aufgeteilt in weibliches und männliches Geschlecht (Abb. 1). Unter Berücksichtigung der zehn häufigsten Todesursachen sind etwa 60 % aller Todesfälle Herz-Kreislauf-assoziierte Todesfälle⁴.

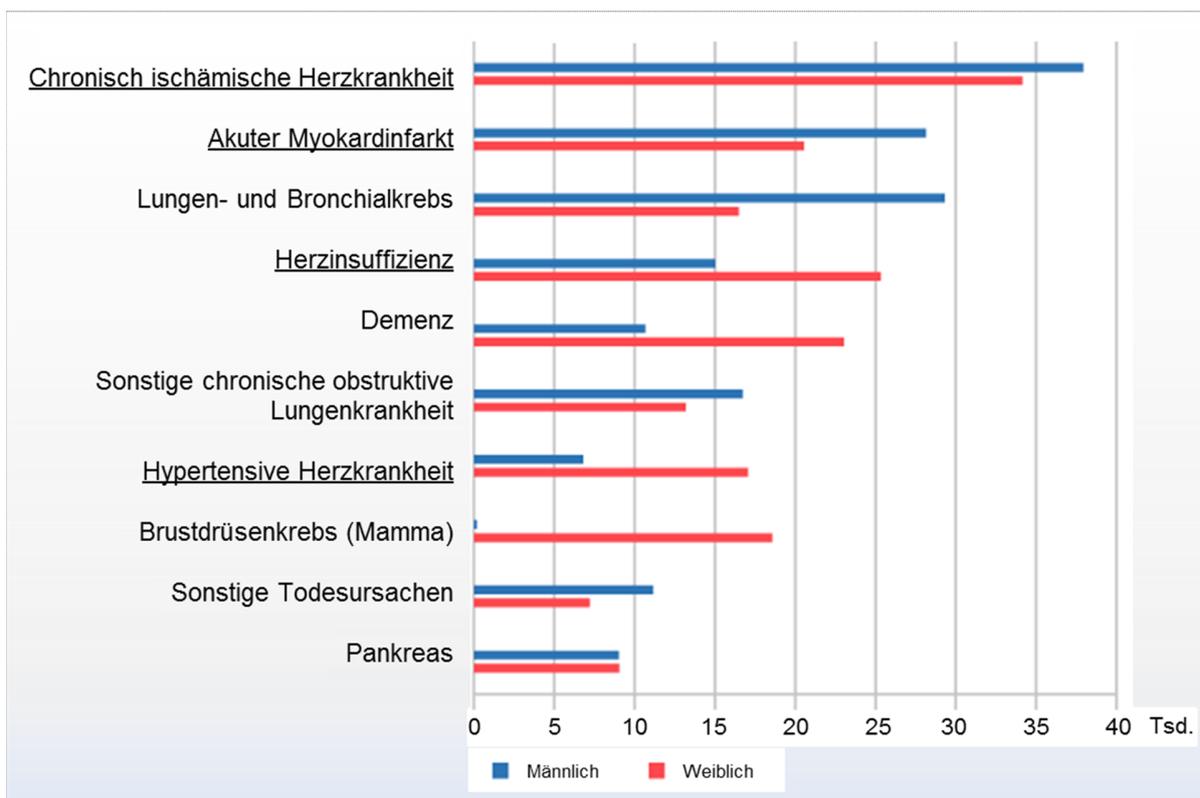


Abbildung 1: Verteilung der 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland (2016). In Rot sind alle weiblichen Todesfälle dargestellt, in Blau sind alle männlichen Todesfälle dargestellt⁴. Die Herz-Kreislauf-assoziierten Ursachen der Todesfälle sind unterstrichen. Tsd.=Tausend, als Größeneinheit für die Häufigkeit der Todesfälle.

Die Hauptursache für die chronisch ischämische Herzkrankheit ist die Atherosklerose, die in der Regel auch Auslöser eines MIs ist⁵. Aufgrund der Schädigung des Herzgewebes und den damit verbundenen Umbauvorgängen kann es infolge des MIs zur Herzinsuffizienz kommen. Die in Abbildung 1 dargestellte Statistik weist auf die Dominanz der Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache in Deutschland hin und zeigt damit auf wie nötig die Weiterentwicklung der Postinfarkt-Versorgung ist. Trotz der Fortschritte in der Akuttherapie in den letzten Jahrzehnten, besteht insbesondere Handlungsbedarf bei der Entwicklung von Therapien, die den langfristigen Gesundheitsstatus eines Patienten nach MI verbessern⁶. Da die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Postinfarktphase jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind, bedarf es intensiver Grundlagenforschung, um langfristig neue Therapiestrategien entwickeln zu können. Von der Grundlagenforschung bis zur Translation in die Klinik ist es jedoch ein langer Weg wie beispielhaft die jahrzehnte lange Entwicklung der mechanischen Interventionen der Pre- und Postkonditionierung demonstriert⁷⁻¹⁰. Bei dem

Ziel pharmakologisch die Infarktgröße zu reduzieren sind die Arzneistoffe mit Angriffspunkten in der Hämostase vielversprechend¹¹. Allerdings besteht bei diesen Wirkstoffen eine Schwierigkeit darin die Balance zwischen einer Reduktion weiterer Herz-Kreislauf-assoziiertes Ereignisse und möglicherweise auftretender Blutungen zu finden¹². Dennoch ist durch sowohl Bevölkerungswachstum als auch Alterszunahme die weltweite Prävalenz des MIs weiterhin hoch⁶.

1.3 Der Myokardinfarkt

Der MI definiert sich in der Klinik mittels zwei unabdingbarer Parameter: zum einen dem im Blut erhöhten kardialen Troponin (> 99. Perzentile) und zum anderen durch die klinische Observation einer Ischämie mittels z.B. Elektrokardiogramm (EKG) oder Identifikation eines Thrombus mittels Angiographie^{13, 14}. Wenn der MI durch Koronarverfahren bedingt entstanden ist (wie bei Typ 4+5), wird der Referenzwert der 99. Perzentile vervielfacht und zusätzlich muss ebenfalls eine weitere Verifizierung mittels z.B. EKG erfolgen¹⁴. Kardiales Troponin ist ein aus drei Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, welcher unter physiologischen Bedingungen an der Herzkontraktion beteiligt ist. Durch den Untergang der Kardiomyozyten nach MI wird Troponin in die Zirkulation freigesetzt^{15, 16}. Die gemessenen Troponinspiegel im Serum geben Auskunft über die Infarktgröße, aber auch über die langfristige, kardiale Funktion des Herzens nach Infarkt¹⁷⁻¹⁹. Ein akuter MI wird klinisch aktuell in 5 Typen eingeteilt: MI Typ 1 – ausgelöst durch Plaqueruptur/Erosion und Thrombusformation; MI Typ 2 – ausgelöst durch geringe Sauerstoffversorgung durch u.a. Vasospasmen oder Atherosklerotische Läsionen; MI Typ 3 – kardialer Herztod, ausgelöst durch unbekanntes Ursache, Evidenz eines MIs aber vorhanden; MI Typ 4 – ausgelöst im Zuge einer perkutanen Koronarintervention (4a), aufgrund einer Stent-Trombose (4b) oder einer Stent-Restenose (4c) sowie MI Typ 5 – ausgelöst im Zuge einer Bypass Operation^{14, 20}.

1.3.1 Der Kardiomyozytenuntergang und die Initiation der Inflammation

Während eines akuten MIs, ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Herzmuskels aufgrund der Ischämie für eine gewisse Zeit unterbrochen. In der Folge ist die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Kardiomyozyten bereits nach wenigen Sekunden reduziert und der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Vorrat in den Mitochondrien erschöpft. Die Kontraktilität des Herzmuskels nimmt ab und es entsteht darüber hinaus, aufgrund des osmotischen Ungleichgewichts, eine Schwellung der Mitochondrien in den Kardiomyozyten.

Dies führt innerhalb von kurzer Zeit zu einer Nekrose der Kardiomyozyten, der Ausbildung eines Ödems sowie der Initiation der Inflammationsreaktion²¹. Auch die Apoptose der Endothelzellen wird als weiterer Initiator des Kardiomyozytenuntergangs beschrieben²². Nekrotische sowie verletzte Zellen und die geschädigte extrazelluläre Matrix (EZM) setzen neben reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auch viele weitere Moleküle frei, die als Gefahrensignale fungieren können. Diese werden als gefahren-assoziierte molekulare Muster (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) bezeichnet und werden mithilfe der Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) der Immunzellen erkannt. Viele DAMPs sind im Herzen nach Infarkt beschrieben, unter anderem, die von sterbenden Zellen freigesetzten Proteine: *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1, ein DNA Stabilisationsprotein) und Hitzeschockproteine (DNA Chaperone), aber auch die von Fibroblasten sekretierten EZM Moleküle: Fibronectin Extradomäne A sowie Hyaluronsäure (HA)²³ oder die von Immunzellen exprimierten S100 Proteine²⁴. Die bedeutendsten PRRs sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR). TLRs werden insbesondere von Immunzellen exprimiert, können aber auch auf Fibroblasten, Endothelzellen und Kardiomyozyten exprimiert werden. Einige TLRs befinden sich auf der Zelloberfläche, andere im Endolysosom (einer Fusion aus Endosom und Lysosom)²⁵. Isolierte Langendorff-Herzen der TLR2-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine verbesserte postischämische Funktion²⁶. In einem Myokardinfarktmodell zeigten C3H/HeJ Mäuse, welche natürlicherweise eine Mutation in dem TLR4 Gen aufweisen, einen kardioprotektiven Phänotyp. Diese Effekte wurden über den AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalweg vermittelt²⁷. Über TLRs kann eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB hervorgerufen werden, was eine Translokation in den Nukleus auslöst. Infolgedessen wird die Transkription verschiedener pro-entzündlicher Gene hochreguliert, so dass es daraufhin zu einer verstärkten Sekretion von Zyto-/ Chemokinen sowie erhöhten Produktion von Adhäsionsmolekülen kommt^{25, 28}. Neben den bereits nekrotischen Kardiomyozyten tragen auch andere residente Zellen wie beispielsweise die Mastzellen zu einer Freisetzung von pro-entzündlichen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Histamin bei²⁹.

Bereits in diesem frühen Stadium nach Infarkt ist der Umbau der EZM von entscheidender Relevanz. Die Nekrose der Kardiomyozyten führt zu einer Induktion und Aktivierung spezieller Matrix-verdauender Proteasen - der sogenannten Matrixmetalloproteasen (MMPs). Durch den Verdau der EZM bewirken sie eine Freisetzung von in der Matrix inkorporierten Zyto-/ Chemokinen. Die Fragmente der EZM wiederum beeinflussen zusammen mit den

freigesetzten Zyto- und Chemokinen die Endothelzellaktivierung und unterstützen auf diese Weise die weitere Immunantwort, indem die Gefäßpermeabilität gesteigert wird und Plasmabestandteile in das Gewebe gelangen. In den Arealen, wo Kardiomyozyten bereits untergegangen sind, entsteht schnell eine provisorische Matrix, welche das geschädigte Myokard unterstützt³⁰.

Nicht nur der Gefäßverschluss selbst, sondern auch die Wiederherstellung der Durchblutung - die Reperfusion - trägt aufgrund der plötzlichen Wiederversorgung mit Sauerstoff, der damit verbundenen Anflutung von ROS sowie der Verstärkung der Immunantwort zu dem Gewebeschaden bei^{31, 32}. Bereits innerhalb der ersten Stunden nach Ischämie und Reperfusion (I/R) kann im infarzierten Gewebe eine deutliche Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen wie TNF- α oder Interleukin (IL)-6 detektiert werden. Während TNF- α -defiziente Mäuse in einem I/R-Modell kleinere Infarkte³³ aufwiesen, scheint IL-6 im Mausmodell zweiseitig zu sein. Es wird vermutet, dass eine IL-6 Defizienz akut kardioprotektiv ist, langfristig aber zu einer verschlechterten kardialen Funktion führt³⁴. Der entstandene mechanische Stress am Endothel ruft neben einer Freisetzung von Zytokinen auch die Aktivierung von Mechanosensoren wie den Integrinen hervor. Die erhöhte Zytokinexpression bewirkt wiederum im Folgenden eine verstärkte Aktivität der MMPs³⁵. So entsteht insgesamt eine sich gegenseitig weiter bedingende Kaskade von Initiationen der Inflammation.

1.3.2 Die Inflammationsreaktion

Das Immunsystem kann in das angeborene und adaptive Immunsystem unterteilt werden. Nach MI entsteht eine beide Systeme umfassende Inflammationsreaktion, wobei insbesondere die Immunzellen des angeborenen Immunsystems maßgeblich beteiligt sind³⁶.

1.3.2.1. Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die das ischämische Gebiet erreichen³⁵. Neutrophile Granulozyten produzieren neben Zyto- und Chemokinen auch ROS und fördern damit die Immunantwort^{37, 38}. Die Migration der Neutrophilen wird über Interaktion mit den Endothelzellen über L-Selektin und P-Selektin vermittelt. Daraufhin werden β -Integrine aktiviert, was wiederum eine Bindung an das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1 fördert^{39, 40}. Des Weiteren ruft eine Wechselwirkung zwischen CXC-Chemokinen und dem von neutrophilen Granulozyten exprimierten CXCR2-Rezeptor eine Konformationsänderung der Zellen hervor, was zu einer verstärkten Adhäsion der

neutrophilen Granulozyten an der Endotheloberfläche führt. Die aufgelockerte Endothelzellstruktur im entzündeten Herzgebiet begünstigt eine erleichterte Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch die Endothelzell- und Perizytschicht³⁶. Obwohl humane Studien existieren, bei denen eine exzessive Infiltration der neutrophilen Granulozyten nach Infarkt mit einem verschlechtertem Krankheitsverlauf und erhöhter Mortalität in Verbindung gebracht wurden^{41, 42} und die Inhibition der Myeloperoxidase in einer Studie sogar die kardiale Funktion nach Infarkt verbessern konnte⁴³, zeigt eine Studie von 2017 hingegen, dass neutrophile Granulozyten auch wichtige Interaktionspartner der Makrophagen sind. Dort konnte gezeigt werden, dass in Neutrophilen-depletierten Mäusen die Herzfunktion nach Infarkt verschlechtert war. Grund dafür war eine reduzierte kardiale Expression des Phagozytose-Rezeptors *myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase* (MertK) der Makrophagen und dadurch eine verminderten Fähigkeit der pro-entzündlichen Makrophagen apoptotische Kardiomyozyten und Zelldebris zu entfernen, wohingegen durch eine erhöhte Proliferation der anti-inflammatorischen Makrophagen die Myofibroblasten-Antwort und deren Kollagenproduktion exzessiv erhöht war⁴⁴. Diese Studie verdeutlicht, dass die Kommunikation zwischen den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wichtig für die Heilungsphase nach Infarkt ist.

1.3.2.2. Monozyten und Makrophagen

Sowohl in der Maus als auch bei dem Menschen stellen Monozyten nur bis zu 10% der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar⁴⁵ und dennoch haben Monozyten einen immensen Einfluss auf Entzündungsprozesse. In der Maus können folgende zwei Monozyten-Populationen unterschieden werden: Ly6C^{high} (CCR2⁺ CD62L⁺ CX3CR1^{int}) und Ly6C^{low} (CCR2⁻ CD62L⁻ CX3CR1^{high}) Monozyten⁴⁶⁻⁴⁸. 2007 wurde von Nahrendorf und Kollegen beschrieben, dass die Ly6C^{high}- und Ly6C^{low}- Monozyten in zwei distinkten Phasen das ischämische Areal infiltrieren. Dabei stellen die Ly6C^{high}- Monozyten die primär rekrutierte Population dar⁴⁹. Bei Menschen gibt es diese zwei Monozyten-Populationen ebenfalls: diese definieren sich über CD14 und CD16 Expression⁵⁰. Der Großteil der humanen Monozyten exprimiert CD14^{high} (CD14^{high} CD16⁻ CD64⁺ CCR2⁺ CX₃CR1^{low}) und entsprechend wenige Monozyten exprimieren CD16⁺ (CD14⁺ CD16⁺ CD64⁻ CX₃CR1^{high}). Während der Inflammation reagieren Monozyten auf Stimuli wie den CC-Chemokinligand 2 (CCL2)/ *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), welche im Entzündungsgeschehen am Endothel gebunden und aktiviert vorliegen können. In einer zweiten Phase werden geringere Mengen

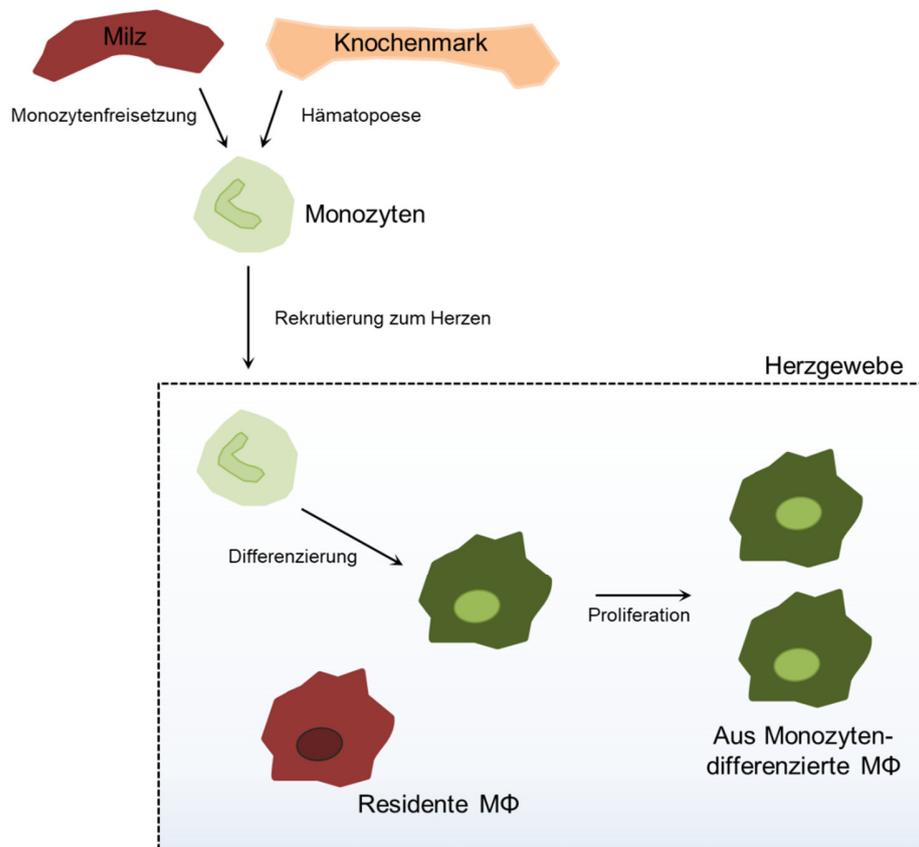
von Ly6C^{low} Monozyten über CX3CR1 rekrutiert⁴⁹. Es wird außerdem angenommen, dass die Infiltration der Monozyten die proliferative Expansion der Makrophagen beeinflusst⁵¹. Der Transkriptionsfaktor Nr4a1 ist wichtig für das Überleben der Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark⁵². Mit Hilfe von Nr4a1-defizienten Mäusen konnte in einer späteren Studie gezeigt werden, dass auch Ly6C^{high} Monozyten im Gewebe zu Ly6C^{low} Makrophagen differenzieren können. Nr4a1 ist also für die Makrophagen entbehrlich und somit folgt der Ly6C^{high} Monozyteninfiltrationsphase wahrscheinlich eher eine aus Ly6C^{high} Monozyten-differenzierte Ly6C^{low} Makrophagenphase. Nr4a1 reguliert somit die zweiphasige Monozyten/Makrophagen-Antwort nach Infarkt, wobei *Nr4a1*-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion führte. Diese so erweiterte Hypothese unterstreicht die Bedeutung der lokalen Umgebung für die Koordination von Inflammation und Heilung⁵³. Da die myeloiden Zellen nur kurze Zeit im Gewebe agieren bevor sie zugrunde gehen, muss die Hämatopoese gut funktionieren⁵⁴. Dafür sind hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen verantwortlich. Zwei Orte der Hämatopoese/Monozytopoese nach Infarkt sind beschrieben: die Milz und das Knochenmark (Abb. 2).

In der Milz gibt es sowohl residente Makrophagen, welche Aufgaben wie Zytokin-Produktion oder Pathogen-Erkennung haben, als auch Monozyten⁵⁵. Nach Infarkt sind die Monozyten besonders relevant. Die Monozyten werden über die Zirkulation in das ischämische Areal mobilisiert, so dass in den ersten Tagen nach Infarkt eine große Menge der Monozyten aus der Milz stammt. Das Reservoir an Monozyten in der Milz wird über die Differenzierung von Vorläuferzellen wieder aufgefüllt^{54, 56, 57}. Ein wichtiges Zytokin, das zu der Monozytopoese in der Milz beiträgt ist IL-1 β . So konnte in einem Myokardinfarktmodell gezeigt werden, dass ein Transfer von IL-1 Rezeptor-defizienten Vorläuferzellen in Wildtyp (WT) Mäusen zu einer Reduktion der Monozyten in der Milz führte⁵⁴.

Das Knochenmark stellt ein weiteres wichtiges Kompartiment für die Bildung von Monozyten dar. Normalerweise verankern Knochenmarksmakrophagen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen in einer hämatopoetischen Nische. Nach Infarkt werden die Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark sowie die Mobilisation dieser in die Zirkulation deutlich erhöht. Insbesondere die CCR2⁺ Stamm- und Vorläuferzellen erhöhen nach Infarkt die Expression von TLR2 und TLR4, die möglicherweise, die durch den MI ausgelösten DAMPs erkennen können und auf diese Weise zum Gewebe rekrutiert werden können. So wurde von Dutta und Kollegen 2015 auch gezeigt, dass die Injektion eines DAMPs (HMGB1) in Mäusen die Proliferation der CCR2⁺ Stamm- und Vorläuferzellen weiter förderte⁵⁸. CCR2 als wichtiger Rezeptor der Monozyten vermittelt die Freisetzung in die Zirkulation, aber auch

zusammen mit seinem Liganden: CCL2/MCP-1 die Rekrutierung in das Gewebe. So weisen MCP-1-defiziente Mäuse nach Infarkt eine verzögerte Immunantwort auf^{59, 60}.

Anhand der CCR2-Expression konnten Epelman und Kollegen im Jahr 2014 drei verschiedene Makrophagen-Populationen im Herzen definieren. Die zwei residenten Makrophagen-Populationen exprimieren den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) II entweder stark (MHCII^{high}) oder schwach (MHCII^{low}), aber in beiden Fällen nicht CCR2. Diese beiden Populationen entstehen bereits im embryonalen Dottersack vor der Geburt und erneuern sich fortan vermutlich größtenteils unabhängig von den infiltrierten Monozyten. Des Weiteren wurden die aus Monozyten differenzierten Makrophagen detektiert, welche insbesondere nach einer Verletzung des Gewebes von Bedeutung sind. Diese sind MHCII^{high} CCR2⁺. Interessanterweise rekrutieren neonatale Herzen genau diese Population nach Verletzung nicht, sondern heilen mithilfe einer Expansion der CCR2⁻ Makrophagen. Neben diesen drei Makrophagen-Populationen lässt sich im Herzen eine Monozyten-Population definieren: diese ist MHCII^{low} und CCR2⁺^{51,61}. 2014 wurde gezeigt, dass bereits neonatale Herzen Makrophagen für das Heilen des Herzgewebes nach Infarkt benötigen⁶².



*modifiziert nach Swirski et al. 2016. *Trends in Immunology*.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Monozyten und Makrophagen im Herzen nach Infarkt. Aus sowohl Milz als auch Knochenmark freigesetzte/produzierte Ly6C^{high} Monozyten infiltrieren über CCR2 in das Herzgewebe⁶³. Dort entstehen aus infiltrierten Monozyten die aus Monozyten-differenzierten Makrophagen und proliferieren lokal⁴⁷. Neben den aus Monozyten-differenzierten Makrophagen befinden sich zudem residente Makrophagen im Gewebe⁶⁴. MΦ: Makrophagen.

In einer Studie von 2007 wurden Monozyten/Makrophagen mit Hilfe der Clodronat-Liposomen nach Infarkt depletiert. Die so durchgeführte Depletion beeinträchtigte die Wundheilung und erhöhte das linksventrikuläre *Remodeling*⁶⁵. Eine Limitierung dieser Methode ist, dass alle Makrophagen apoptotisch werden. Dennoch kann aus dieser Studie eine wichtige Rolle für die Makrophagen nach Infarkt abgeleitet werden.

Makrophagen sezernieren außerdem pro-angiogene Faktoren und beeinflussen dadurch die Neovaskularisierung des Gewebes, was essentiell für die Versorgung des geschädigten Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff ist^{65, 66}. Insbesondere die Hochregulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) ermöglicht die Neubildung der Gefäße^{65, 67}.

67.

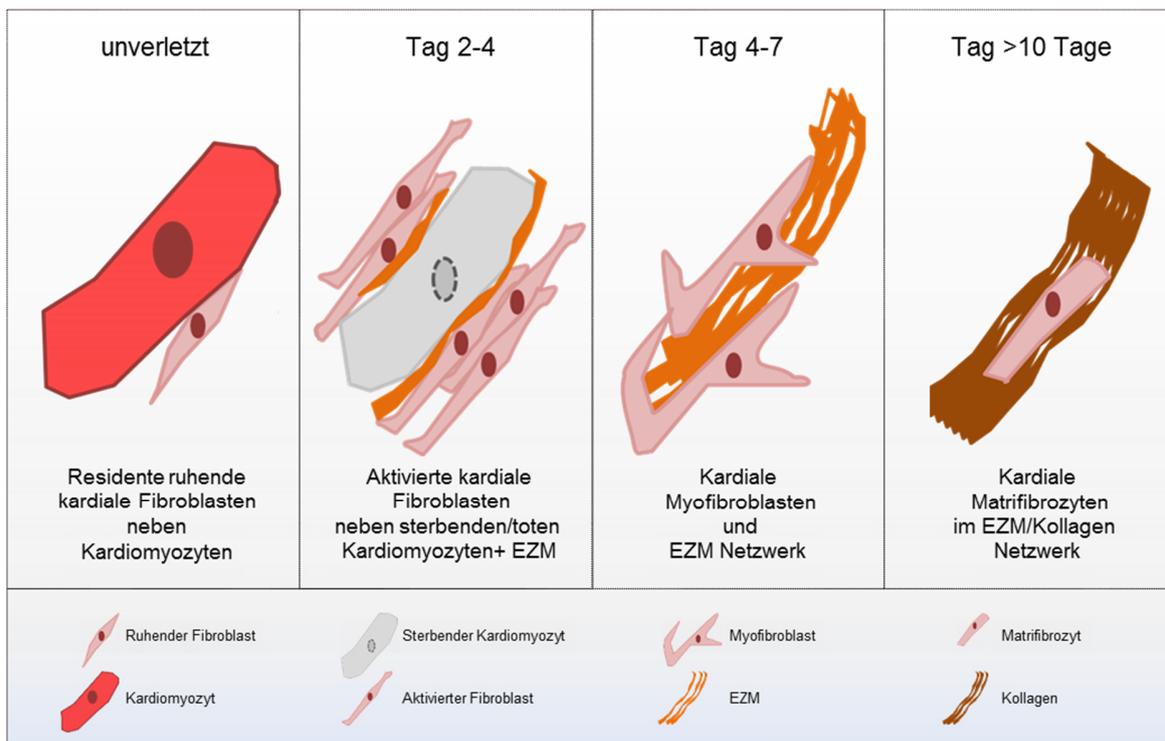
1.3.2.4. Die Lymphozyten

B- und T-Zellen sind die beiden zentralen Zelltypen des adaptiven Immunsystems. Sie entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und treten nach MI langsamer als die angeborene Immunzellen in das ischämische Gewebe ein⁶⁸. So sind B- und T-Zellen erst nach sieben Tagen in maximaler Anzahl im Herzgewebe nach Infarkt nachzuweisen⁶⁹. T-Lymphozyten sind abhängig von der Antigen-Präsentation in Form von MHC I oder MHC II. Das Antigen wird dann erst durch Antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren erkannt. Antigenpräsentierende Zellen sind neben Monozyten/Makrophagen auch dendritische Zellen und B-Zellen. CD4⁺ T-Zellen werden, basierend auf ihrem unterschiedlichen Zytokin-Profil, in T-Zell-Untergruppen wie Th1, Th2, Th17 klassifiziert⁶⁸. Unter den T-Zell-Populationen wird CD4⁺ T-Zellen bisher die bedeutendste Rolle nach Infarkt zugeschrieben. Mittels RAG1-defizienten Mäusen, welche keine ausgereiften B- und T Zellen besitzen⁷⁰, konnte nach MI gezeigt werden, dass diese kleinere Infarkte als ihre zugehörigen Kontrollen hatten. Dabei war besonders interessant, dass nur CD4⁺ T-Zell-depletierte Mäuse und keine CD8⁺ T-Zell-depletierten Mäuse signifikant kleinere Infarkte aufwiesen. Dies wurde in der gleichen Studie mittels Rekonstitution der RAG1-defizienten Mäuse und entsprechendem Transfer der verschiedenen Populationen gezeigt⁷¹. Darüber hinaus gibt es eine weitere Studie, die eine besondere Relevanz der CD4⁺ T-Zellen nach Infarkt in Bezug auf die Ausbildung einer intakten kollagenhaltigen Narbenbildung beschreibt⁷².

1.3.3 Die Fibroblastenantwort

Nach Infarkt produzieren Fibroblasten, insbesondere die aktivierten Myofibroblasten, große Mengen von EZM-Molekülen, welche die Areale der untergegangenen Kardiomyozyten stützen und ein kollagenhaltiges Narbengewebe fördern. Die Dynamik der Fibroblasten nach Infarkt im Mausmodell wurde 2018 von Fu und Kollegen wie folgt beschrieben: die Fibroblasten werden aktiviert und sind stark proliferativ. Die proliferative Phase erreicht ein Maximum an Tag 2 bis 4. Die über diesen Zeitraum entstandenen Fibroblasten bleiben langfristig aufrecht erhalten. Zwischen Tag 4 bis Tag 7 nach Infarkt differenzieren diese zu Myofibroblasten. Ein spezielles Merkmal der Myofibroblasten ist die Expression von glattem Muskel α -Aktin/*smooth muscle actin* (α -SMA) und werden daher auch α -SMA-positive Fibroblasten genannt. Zwischen Tag 7 bis Tag 10 verlieren die Myofibroblasten ihre proliferative Fähigkeit und die Expression von α -SMA reduziert sich sehr stark. Zu diesem Zeitpunkt ist ein vollständiges Narbengewebe mit kollagenhaltiger EZM entstanden. Trotz des Verlusts von α -

SMA, bleiben die aus Fibroblasten hervorgegangen Myofibroblasten in einem aktivierten Zustand. Diese neu charakterisierten Zellen werden Matrifybrozyten genannt, welche in dieser Studie auch in dem menschlichen Herzen nachgewiesen werden konnten. Matrifybrozyten unterstützen speziell die langfristige Aufrechterhaltung der Narbe (Abb. 3)⁷³.



*modifiziert nach Fu et al. 2018. *Journal of Clinical Investigation*.

Abbildung 3: Modell der Stadien der kardialen Fibroblasten nach Infarkt. Im unverletzten Gewebe befinden sich ruhende Fibroblasten, diese werden 2-4 Tage nach Infarkt aktiviert und 4-7 Tage nach Infarkt zu Myofibroblasten. Nach über 10 Tage werden die ehemaligen Fibroblasten Matrifybrozyten genannt⁷³.

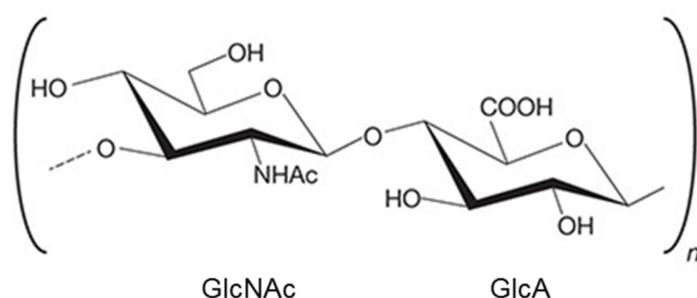
In älteren Studien wurde teilweise davon ausgegangen, dass die Myofibroblasten nach der Narbenbildung apoptotisch werden⁷⁴. Dies scheint allerdings mit der aktuellen Studie zu weiten Teilen weniger relevant zu sein⁷³. Als Hauptaktivator der Myofibroblasten wurde der *Transforming-growth factor* (TGF)- β 1 identifiziert, welcher die Synthese von EZM-Molekülen (wie Kollagen I + III, Fibronectin, HA) stimuliert und den weiteren Matrixabbau durch die Expression der Gewebeinhibitoren von Matrixmetalloproteinasen inhibiert^{75, 76}. Neben Fibroblasten sind Makrophagen die Hauptproduzenten von TGF- β 1. Die Fibroblasten im Herz nach Infarkt vermitteln die akute Wundheilung, das *Remodeling* des Gewebes sowie die Narbenbildung⁷³. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sie das Überleben der

Kardiomyozyten fördern können⁷⁷. Neben diesen positiven Effekten können Fibroblasten, durch eine verstärkte Expression von einer Vielzahl von Proteinen wie den Kollagenen, auch zu exzessiver Fibrose des infarzierten Herzens beitragen⁷⁸. Wohingegen Myofibroblasten durch ihre Expression von α -SMA detektiert werden können, wurden zur Identifizierung von Fibroblasten bisher verschiedene Marker in Studien verwendet: *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR) α , Kollagen1 α 1, Transkriptionsfaktor (Tcf) 21 und Periostin (Postn)⁷⁹. In einer Studie von 2016 wurde so gezeigt, dass mit Hilfe von Postn Expression fast alle Myofibroblasten im Herzen identifiziert werden konnten. Gleichzeitig wurde auch gezeigt, dass alle Postn-exprimierenden Fibroblasten aus den residenten Tcf21⁺ Fibroblasten entstanden sind⁸⁰. Das gezielte Ausschalten der Postn-exprimierenden Fibroblasten nach MI reduzierte in einer Studie von 2016 die kardiale Fibrose und verbesserte die kardiale Funktion⁸¹, wodurch eine wichtige Bedeutung dieses Zelltyps für die Heilungsphase nach MI belegt wurde.

1.4 Das Hyaluronsäuresystem

1.4.1 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein wichtiger Bestandteil der EZM und besteht aus einer sich wiederholenden Disaccharid-Struktur. Dieses Disaccharid besteht aus Glukuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin, verbunden über β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidische Bindungen und liegt als lineares Polysaccharid vor (Abb. 4). Hyaluronsäure ist anders als andere Glykosaminglykane (Heparinsulfat, Chondroitinsulfat und Keratinsulfat) nicht sulfatiert oder anderweitig modifiziert^{82, 83}.



*Modifiziert nach Hascall. 2015. *Essentials of Glycobiology.3rd edition*⁸⁴

Abbildung 4: Chemische Struktur von Hyaluronsäure.

Das Molekulargewicht der HA kann bis zu 10 MDa betragen. Eine besondere Eigenschaft dieses linearen Polysaccharids ist die Fähigkeit Wasser zu binden. Bereits ein Disaccharid kann etwa 15 Wassermoleküle binden^{85, 86}. Es ist das bisher längste in Tierzellen gefunden Polysaccharid und ist trotz seiner recht einfachen Struktur erst mit Entwicklung der Chordatiere entstanden⁸⁴. Die größte Menge an HA befindet sich im gesunden Mensch in der Nabelschnur, der Gelenkflüssigkeit, dem Glaskörper im Auge sowie der Haut⁸⁷. HA wird im Zuge von Um- und Abbau sowie in Inflammationssprozessen fragmentiert und kann dann auch als Oligomer vorliegen⁸⁸.

1.4.2 Hyaluronsäuresynthesen

Die Biosynthese der HA erfolgt in allen eukaryotischen Zellen über die Hyaluronsäuresynthesen (HAS) an der Plasmamembranoberfläche. Drei verschiedene Isoenzyme der HAS: HAS1, HAS2 und HAS3 sind an der Synthese der HA beteiligt^{83, 89}. Den

Has-Isoenzymen dienen UDP- α -D-Glukuronsäure und UDP- α -N-Acetyl-D-Glukosamin als Substrate. Diese werden im Wechsel an das reduzierte Ende des Polysaccharides angehängen bei gleichzeitiger Abspaltung seines UDPs und Anwesenheit eines Metallions^{83, 84}. Die Expression der *Has* unterscheidet sich in Abhängigkeit des betrachteten Zelltyps/des jeweiligen Gewebes. Zudem gehen die Level der *Has* mRNA in mehreren Studien mit der sekretierten HA-Menge einher⁹⁰. HAS2 wird es zugeschrieben die größte Menge an HA zu produzieren⁹⁰. HAS2 kann als Dimer vorliegen, evtl. auch als Multimer. Ubiquitinierung⁹¹ sowie weitere posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung und Anheftung von O-verknüpftem N-Acetylglukosamin)⁹⁰ können die Aktivität der HAS2 beeinflussen. In den Mausmodellen der *Has*-Defizienz zeigte sich eine unterschiedliche Bedeutsamkeit der verschiedenen *Has*-Isoenzyme während der Embryonalentwicklung. Die *Has2*-defiziente Maus ist an Tag 9,5 embryonal letal aufgrund einer defekten Herzbildung während der Transformation des kardialen Endothels in das Mesenchym⁹². *Has1*-, *Has3*-sowie *Has1/Has3*-defiziente Mäuse weisen keinen veränderten Phänotyp in der Embryogenese sowie der Lebensdauer auf.

4-Methylumbelliferone (4-MU) wird als ein pharmakologischer Inhibitor der HA-Synthese eingesetzt und wirkt zum einen als kompetitives Substrat der UDP-Glukuronyltransferase. In dem Fall entsteht keine UDP-Glukuronsäure mehr, sondern 4-MU-Glukuronide. Zum anderen reduziert 4-MU die mRNA der *Has* sowie die mRNA der *UDP-Glukosepyrophosphorylase* und *-dehydrogenase*⁹³.

1.4.3 Hyaluronsäurerezeptoren und -bindeproteine

Die zwei Hauptrezeptoren von HA sind CD44 und RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*). CD44 besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne, einem transmembranären Segment sowie einer Ektodomäne mit einem Linkmodul, welche in die EZM hineinragen. HA bindet an das Linkmodul von CD44, wodurch der zytoplasmatische Teil seine Konformation ändert und mit regulatorischen und adaptorischen Molekülen wie den Tyrosinkinase Src und Rho GTPasen interagiert. CD44 wird auf vielen Zellen exprimiert, u.a. auf Fibroblasten⁹⁴⁻⁹⁶ und Immunzellen⁹⁷. CD44 kann aufgrund eines unterschiedlichen mRNA-*Splicings* in sehr unterschiedlicher Form vorliegen. CD44 auf hämatopoetischen Zellen vermittelt die Bindung von HA, was die Interaktion der Immunzellen mit Endothelzellen unterstützen kann. Auf diese Weise wird ein Rollen der Leukozyten auf dem Endothel sowie die Extravasation in das Gewebe vermittelt^{98, 99}. Neben CD44 besitzen auch LYVE-1, HARE/STABILIN-1 (*hepatic*

hyaluronan clearance receptor) und HARE/STABILIN-2 ein Linkmodul für HA. Andere HA-Rezeptoren und -Bindeproteine besitzen kein Linkmodul, wie z.B. RHAMM¹⁰⁰. Weitere Bindeproteine (auch Hyaladherine genannt) sind beispielsweise insbesondere in der Retina vorkommend SPACR, SPACRCAN^{101, 102} oder bei der Pathogen-Abwehr Siglec-9¹⁰³. Der RHAMM Signalweg induziert vermutlich fokale Adhäsionen, um Änderungen im Zytoskelett zu initiieren. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Motilität der Zelle wie es zum Beispiel bei der Progression eines Tumors, der Invasion oder Metastasierung beobachtet wird. Neben der fokalen Adhäsionskinase (FAK), kann die HA-RHAMM Interaktion aber auch die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) oder die Src Kinasen aktivieren¹⁰⁴. Weitere relevante extrazelluläre Interaktionspartner der HA sind Hyalactane (eine Gruppe der Proteoglykane), bestehend aus Aggrecan, Versican, Brevican und Neurocan¹⁰⁵. Das im Plasma frei lösliche Protein Inter- α -Inhibitor (IaI) besteht aus dem Trypsininhibitor Bikunin und zwei schweren Ketten. Die schweren Ketten werden insbesondere bei Inflammation über das HA Bindemolekül TSG-6 an HA übertragen und kovalent gebunden¹⁰⁶.

1.4.4 Hyaluronsäure-Katabolismus

Hyaluronidasen (HYAL) fragmentieren HA an der β -1,4-glycosidischen Bindung zwischen dem N-Acetyl-Glukosamin und der Glukuronsäure entweder an der Zelloberfläche oder in den Lysosomen. Bisher wurden sechs HYALs in Säugetieren identifiziert. Die größte Relevanz beim Abbau von HA weisen HYAL1 und HYAL2 auf^{107, 108}, welche pH-abhängig reguliert werden¹⁰⁹. Für das Herz scheint HYAL2 besonders bedeutsam zu sein, da gezeigt werden konnte, dass in *Hyal2*-defizienten Mäusen sowohl im Serum als auch im Herzen eine hohe Menge HA detektiert werden kann. Darüber hinaus zeigen *Hyal2*-defiziente Mäuse eine Veränderung der Herzklappen. Die fehlende HA-Fragmentierung ohne Hilfe der HYAL2 führt also zu einer deutlichen HA- Akkumulation¹¹⁰. Auch unsere eigenen Vorarbeiten zeigen einen starken HA-Anstieg im Plasma *Hyal2*-defizienter Mäuse nach I/R (Daten nicht gezeigt). Die Funktion hochmolekularer HA und niedermolekularer HA kann sich deutlich unterscheiden. Insbesondere im Rahmen der Inflammation oder bei Gewebeschaden kann es zu einer Anreicherung von niedermolekularer HA kommen. Dadurch werden viele zelluläre Prozesse wie das Migrations- und Proliferationsverhalten, aber auch die Apoptose und Adhäsion sowie die Interaktion mit TLRs beeinflusst¹¹¹. Die Umsetzung der HA erfolgt sehr rasch. Es wird vermutet, dass ein ausgewachsener Mensch etwa 15 g Hyaluronsäure besitzt, wovon etwa ein Drittel täglich erneuert wird. Jedoch erfolgt die Umsetzung im z.B. Knorpelgewebe

langsam. Die Umsetzung erfolgt über die Rezeptor-vermittelte Endozytose und lysosomale Degradation. Wichtige Rezeptoren/Bindeproteine bei der Umsetzung von HA sind insbesondere HARE/STABILIN-1 (*hyaluronan receptor for endocytosis*), aber auch LYVE-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*)⁸⁴.

1.5 Hyaluronsäure und Inflammation

Ein Zusammenhang zwischen HA und Inflammation ist seit Jahrzehnten bekannt und bereits in vielen entzündlichen Pathologien beschrieben worden. 1985 wurde von Dahl und Kollegen die Gelenkflüssigkeit untersucht und es konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei rheumatoider Arthritis als auch bei anderen Gelenkentzündungen zu einer verstärkten Anreicherung von HA kommt¹¹². Ebenfalls ist HA in der broncho-alveolären *Lavage*-Flüssigkeit und dem Serum von Patienten mit Lungenerkrankungen nachgewiesen worden¹¹³. Darüber hinaus - besonders interessant für diese Arbeit - wurde eine Anreicherung von HA nach MI im Herzen beobachtet¹¹⁴. Auch in der chronisch entzündlichen Darmkrankheit wurde gezeigt, dass HA im entzündeten Darmgewebe gemeinsam mit dem Bindeprotein Ial in der Mukosaschicht des Darms angereichert ist¹¹⁵ und die Rekrutierung von Immunzellen in das Gewebe mittels kabel-ähnlicher Strukturen unterstützt¹¹⁶. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *Has3*-Defizienz in einem Mausmodell der Atherosklerose die Antwort der Th1 Zellen hemmt, was mit einer verminderten IL-12 Sekretion einherging und die Makrophageninfiltration reduzierte¹¹⁷. Die T-Zellantwort war auch in einem Modell der zentralen Nervensystem (ZNS) Autoimmunität mit 4-MU Behandlung beeinflusst und die Infiltration der T-Zellen in das ZNS Parenchym reduziert¹¹⁸. Ebenfalls war im Typ 1 Diabetes mellitus die Immunantwort unter 4-MU-Behandlung reduziert¹¹⁹. Insbesondere die Interaktion fragmentierter HA mit TLR2 sowie TLR4 kann die Inflamationsreaktion initiieren¹¹¹, aber auch CD44 als möglicher Interaktionspartner von HA beeinflusst die Imflammationsreaktion. Bollyky und Kollegen definierten 2010 HA-Akkumulation an einer sogenannten entzündlichen Synapse - bestehend aus T- Zelle und Antigen-präsentierender Zelle wie z.B. der dendritischen Zelle¹²⁰. Darüber hinaus konnte in einer Studie von 2008 gezeigt werden, dass die HA-CD44 Interaktion neben der Inflamationsreaktion auch die Fibroseentstehung nach MI beeinflusste. So war die Inflammation in *CD44*-defizienten Mäusen verlängert, die Antwort der Fibroblasten allerdings reduziert, was zu einer stärkeren Dilatation der Narbe führte¹²¹. CD44 wurde außerdem als relevanter Interaktionspartner für die Monozyten zu Makrophagen - Differenzierung

beschrieben⁹⁷. Des Weiteren wurde auch einigen Molekülen der EZM eine wichtige Rolle in der Atherosklerose bei der Makrophagendifferenzierung zugeschrieben¹²². HA kann Monozyten binden, woraufhin die Verteilung von CD44 an der Oberfläche der Monozyten verändert wird und sich eine sogenannte CD44 Kappe ausbildet, während HA internalisiert wird^{123, 124}. Immunzellen können außerdem das Gefäßwachstum durch Angiogenese oder Arteriogenese einleiten, welches ebenfalls von HA beeinflusst wird. Es ist beschrieben, dass HA sowohl Arteriogenese¹²⁵ als auch Angiogenese¹²⁶ positiv beeinflussen kann. HA stellt des Weiteren neben weiteren Proteoglykanen und Glykoproteinen eine wichtige Komponente der Glykokalyx dar, welche das Endothel in allen Gefäßen luminal umgibt¹²⁷. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass eine Inhibition von HA mit Hilfe von 4-MU die protektive Funktion der endothelialen Glykokalyx einschränkt. Dadurch wurde die Leukozyten-Adhäsion am Endothel begünstigt und das Fortschreiten der Atherosklerose gefördert¹²⁸.

1.6 Hyaluronsäure und Fibroblasten

In humanen Lungenfibroblasten beeinflusst HA die TGF- β 1 vermittelte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten¹²⁹, was auch in humanen dermalen Fibroblasten gezeigt wurde. Diese Effekte wurden dort über CD44 und den *epidermalen growth factor receptor* (EGFR) vermittelt¹³⁰. Des Weiteren wurde *Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 protein* (TSG-6) als wichtiger Mediator für die Differenzierung beschrieben. Insbesondere die Interaktion von HA und TSG-6 zusammen mit CD44 ist für den Differenzierungsprozess der Fibroblasten von besonderer Bedeutung¹³¹. Aktuell werden zwei unterschiedliche, aber miteinander kooperierende Signalwege diskutiert: zum einen der klassische TGF- β 1/Smad2-abhängige Signalweg und zum anderen ein HA/CD44/EGFR-abhängiger Signalweg. In einer Studie von 2016 konnte gezeigt werden, dass die TGF- β 1-abhängige Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch eine Interaktion von CD44 mit EGFR in sogenannten *Lipid Rafts* (Bereiche der Zellmembran, die besonders lipid- und cholesterinhaltig sind) vermittelt wird¹³¹. In einer weiteren Studie vermittelte TGF- β 1 die Hochregulation von CD44V6 über das *early growth response protein* (EGR) 1. Es konnte auch dort gezeigt werden, dass die von der HAS2 produzierte HA für den Myofibroblastenphänotyp wichtig ist. Diese Effekte wurden über einen durch TGF- β 1-stimulierten CD44V6/ERK1/EGR1 Signalweg moduliert¹³². Des Weiteren verstärkt HA die durch adventitielle Fibroblasten vermittelte Kontraktion eines Kollagen- Gels¹³³. Das Zusammenspiel der Fibroblasten und der

Immunzellen spielt nach Infarkt sicherlich eine bedeutende Rolle. So wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass IL-1 β eine TGF- β -induzierte kontraktile Aktivität von Fibroblasten abschwächte¹³⁴, aber von Fibroblasten sekretiertes IL-1 β auch die Immunmodulation beeinflusst, indem es die Monozyten- Infiltration in das Gewebe fördern kann¹³⁵.

1.7 Hyaluronsäure und Myokardinfarkt

1991 wurde von Waldenstrom und Kollegen 1991 erstmals gezeigt, dass HA nach Infarkt im Herzen akkumuliert. Nach permanenter Ligatur im Rattenherz stieg der HA-Gehalt in Herzen von Tag 1 bis Tag 3 kontinuierlich an. Der Anstieg der HA korrelierte dabei mit einer ausgeprägten Ödem-Bildung im Herzen¹¹⁴. In einer neueren Studie im Zebrafisch und der Ratte wurde ebenfalls gezeigt, dass sowohl HA als auch RHAMM innerhalb der ersten Tage nach Schädigung des Herzens hochreguliert sind und ein möglicher Signalweg über HA/RHAMM/FAK/Src reguliert sein könnte¹³⁶. Weitere Infarkt/HA-Studien sind insbesondere im Kontext der therapeutischen Applikation durch exogene Zugabe von HA entstanden. Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) Analyse von Schweinen nach Infarkt wurde gezeigt, dass HA-haltige Hydrogele die kardiale Funktion verbessern können und die Infarktgröße reduzieren¹³⁷. In einer weiteren Studie an Ratten förderten Hydrogele darüber hinaus die Ausbildung von neuen Gefäßen nach MI¹³⁸, so dass die Nutzung von HA als therapeutische Applikation eine interessante Therapieoption darstellen könnte. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die HA-Synthese in kardialen Fibroblasten durch IL-6 Stimulation hochreguliert wird und mittels Anti-IL-6 Inhibition reduziert werden konnte. Die Reduktion der HA nach permanenter Ligatur in Mäusen durch Anti-IL-6- Behandlung führte zu einer Reduktion der kardialen Funktion¹³⁹. Vorarbeiten im murinen I/R-Modell (C57BL/6J) zeigten zudem, dass es bereits nach 6 h und 48 h zu einer starken Hochregulation der *Has1*- und *Has2*- mRNA kommt (Abb. 5 A). Einhergehend damit stieg auch die mRNA Expression der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Hmmr* nach 48 h drastisch an (Abb. 5 B). Die mRNA Expression der *Hya1s* zeigte hingegen eine milde Herabregulation (Abb. 5 C).

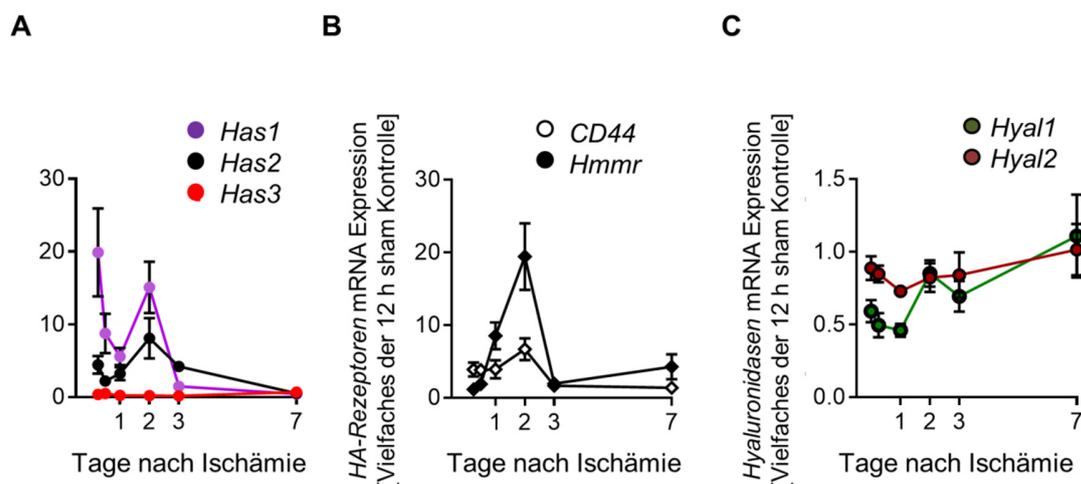


Abbildung 5: Induktion des HA-Systems nach Infarkt. Die Herzen von C57BL/6J Mäuse wurden nach Infarkt entnommen und das Herzgewebe des linken Ventrikels auf mRNA-Expression von **A**, *Hyaluronsäuresynthase (Has)* Isoenzymen, von **B**, HA-Rezeptoren: *CD44* und *Hmnr* und von **C**, *Hyaluronidasen (Hyal1* und *Hyal2)* untersucht. Untersuchungspunkte waren 6, 12, 24, 48, 72 Stunden sowie 7 Tage nach Infarkt. Mittelwert \pm SEM; n=3-6. Die Daten in dieser Abbildung wurden von Dr. Julia Müller erhoben

Aufgrund der mRNA Regulation der *Has*-Isoformen aus unseren Vorarbeiten nach I/R, erscheint die Untersuchung der mechanistischen Rolle der HA nach Infarkt relevant und vielversprechend.

1.7.1 Einfluss der HAS2 auf die kardiale Funktion

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die kardiale Funktion in *Has2*-defizienten Mäuse¹⁴¹ und den dazugehörigen Kontrollen mittels Echokardiographie vor und nach I/R untersucht. Es wurde für die *Has2*-defizienten Mäuse eine deutliche Einschränkung der kardialen Funktion im Vergleich zu ihren Kontrollen nach I/R ermittelt. Es wurden initial drei Kontrollen verwendet: Die Rosa26CreER^{T2} (1) sowie die *Has2*^{flox/flox} (2) wurden mit Tamoxifen behandelt und die Rosa26CreER^{T2}; *Has2*^{flox/flox} (3) wurde mit Vehikel (Öl) behandelt. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der *Has2*-defizienten Mäuse war im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollmäusen deutlich reduziert (EF nach drei Wochen: *Has2* KO: 21,4 %, Kontrolle 1: 49,5 %, Kontrolle 2: 43,0 %, Kontrolle 3: 37,4 %; Abb. 6A). Dies ging mit einer Erhöhung der enddiastolischen und endsystolischen absoluten Volumina des linken Ventrikels einher (Abb. 6B + C). Die Herzfunktion der *Has2*-defizienten Mäuse war über den gesamten Zeitraum der Heilungsphase eingeschränkt. Die zugrundeliegenden Mechanismen für diese Beobachtung wurden in dieser Arbeit genauer untersucht.

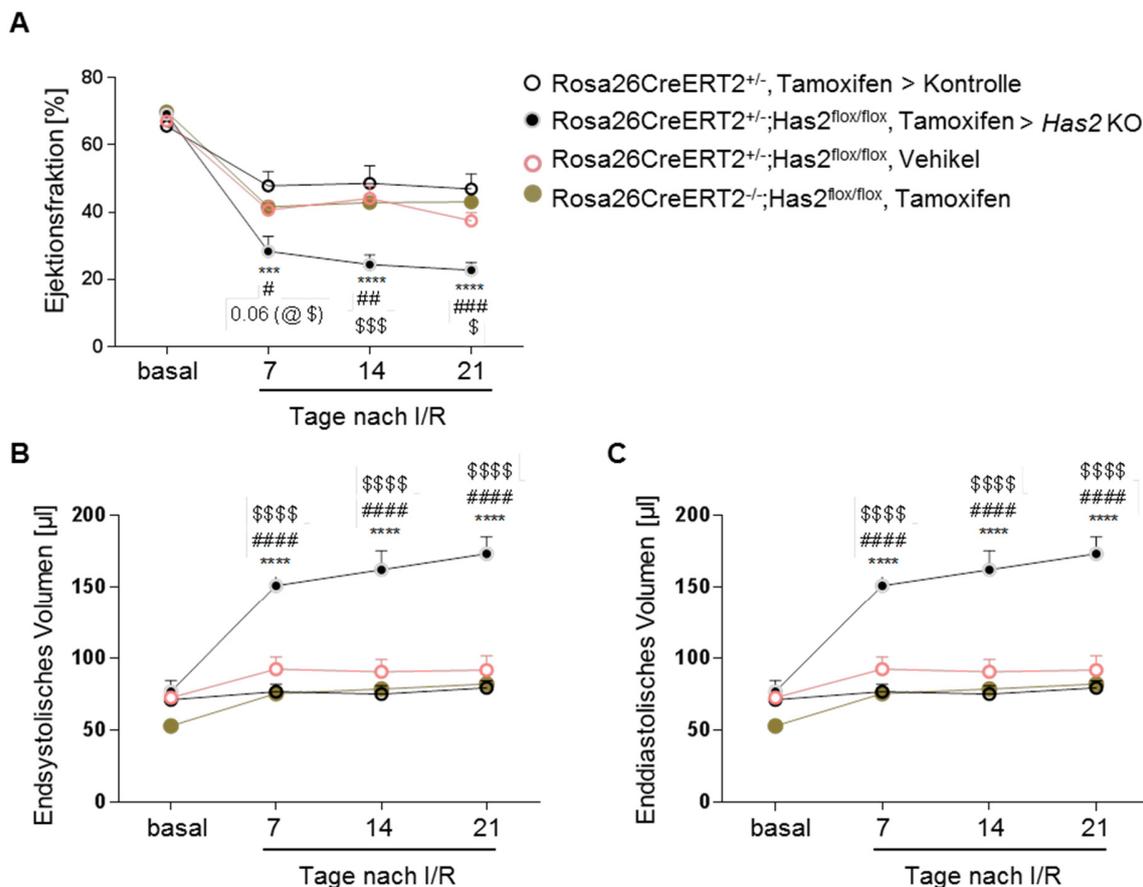


Abbildung 6: Die kardiale Funktion der *Has2*-defizienten Mäuse und ihrer Kontrollen nach Infarkt. Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} Mäuse wurden mit Tamoxifen behandelt, ebenfalls Has2^{flox/flox} Mäuse und Rosa26CreERT² Mäuse, außerdem wurden Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} Mäuse mit Öl (Vehikel) behandelt. Alle Mäuse wurden vor und nach Infarkt (7, 14 und 21 Tage) mittels Echokardiographie untersucht und die Parameter **A**, Ejektionsfraktion, **B**, Endsystolisches Volumen und **C**, Enddiastolisches Volumen wurden ermittelt. *: Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} vs. Rosa26CreERT²; #: Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} vs. Has2^{flox/flox}; \$: Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} vs. Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox}, Vehikel. Mittelwert ± SEM; n = 6. Die Signifikanzen wurden mit der *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Sidak's multiple comparison test* berechnet, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Dr. Simone Gorressen.

Da sich die Kontrollen hinsichtlich der kardialen Funktion nicht unterschieden, wurde in der folgenden Arbeit die mit Tamoxifen-behandelte Rosa26CreERT² Maus als alleinige Kontrolle zu der Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} (*Has2* KO) Maus verwendet.

Da sowohl die Immunantwort als auch die Fibroblastenaktivierung wichtige Mediatoren in dem Prozess des *Remodelings* nach MI darstellen, sollten Immunantwort und Fibroblastenaktivierung nachfolgend im Detail untersucht werden. Wie HA und insbesondere HAS2 in diese Prozesse eingreift ist bisher nicht genau bekannt.

1.8 Zielsetzung

Die Synthese der EZM ist stark in den Heilungsprozess und das *Remodeling* nach akutem MI involviert. Während bereits gezeigt wurde, dass die Kollagenanreicherung im Rahmen des *Remodelings* einen entscheidenden Beitrag zur Narbenbildung und interstitiellen Fibrose liefert, ist die früh gebildete EZM bisher weniger untersucht worden. Unsere Arbeitsgruppe hat in einer vorherigen Studie gezeigt, dass eine Reduktion der HA nach permanenter Ligatur in Mäusen mittels Anti-IL6- Behandlung zu einer verschlechterten kardialen Funktion führte¹³⁹. Es ist außerdem bekannt, dass HA in verschiedene entzündliche und fibrotische Prozesse involviert ist. Die Rolle der HA nach MI wurde bisher aber noch nicht geklärt. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass die kardiale Funktion nach I/R in Abwesenheit der HAS2 deutlich eingeschränkt war. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand deshalb eine Untersuchung der frühen *de novo*-Synthese der HA-Matrix nach MI und deren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen sowie die Myofibroblastendifferenzierung. Ziel der vorliegenden Studie war es dabei spezifisch die Rolle von HAS2 während der akuten Phase nach I/R im Mausmodell zu untersuchen. Um diese Fragestellung zu beantworten wurde ein konditionales Mausmodell der *Has2*-Defizienz verwendet. Dabei sollten sowohl die Immun- als auch die Fibroblastenantwort im Detail analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die Genehmigung für Tierversuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, Aktenzeichen 84-02.04.2012.A138 und Aktenzeichen 84-02.04.2015.A322, erteilt.

2.1.1 Mäuse

Für alle *in vivo* Experimente wurden männliche 12-18 Wochen alte Rosa26CreERT² (Taconic; Hudson, NY, USA)¹⁴⁰ Mäuse sowie Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} Mäuse¹⁴¹, alle auf einem C57BL/6J Hintergrund, verwendet. Die Rosa26CreERT² Mäuse, die Has2^{flox/flox} und Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} Mäuse wurden 3 Wochen vor Durchführung der I/R für 5 Tage intraperitoneal (i.p.) mit 1 mg / Maus / Tag Tamoxifen (Sigma, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Rosa26CreERT²;Has2^{flox/flox} Mäuse wurden in einem initialen Versuch außerdem als Kontrolle mit Öl (Vehikel zu Tamoxifen) behandelt. Durch die Aktivierung mit Tamoxifen der an einen mutierten Östrogenrezeptor (ER) gebundenen Cre-Rekombinase und deren Translokalisierung in den Nukleus, wird daraufhin der mit zwei LoxP-Erkennungssequenzen flankierte DNA Abschnitt - in diesem Fall ein wichtiger Bereich der *Has2* kodierenden Sequenz im Exon 2, welche das Startcodon und zwei Transmembrandomänen in der N-terminalen Region umfasst - herausgeschnitten und abgebaut. Für *in vitro* Studien wurden neben den bereits genannten Mausstämmen, C57BL/6J Mäuse (Janvier Labor, Le Genest-Saint-Ile, Frankreich) verwendet. Die konstitutiven *Has1* KO Mäuse¹⁴² und Wurfgeschwister wurden in der Arbeit verwendet, die Daten werden jedoch nicht gezeigt. Die Mäuse erhielten zu jeder Zeit Futter und Wasser *ad libitum* und wurden in einem normalen 12-Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten.

2.1.2 Durchführung der Ischämie und Reperfusion

Alle Mäuse wurden nach einem geschlossenen Thoraxmodell der myokardialen I/R operiert^{143, 144}. Dafür wurden die Mäuse mit Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert, mit einer peripheren Venenverweilkanüle intubiert und mit einem Tidalvolumen von 10 µg/g Körpergewicht mit einer Geschwindigkeit von 140

Schlägen/Minute operiert. Die Mischung der Beatmung lag bei 2/3 Luft und 1/3 Sauerstoff mit Isofluran 2,0 % (V/V; Forene ®, Abbott GmbH, Deutschland). Nach linker lateraler Thorakotomie zwischen der 3. und 4. Rippe wurde das Perikard präpariert und vorsichtig 1mm kaudal des linken Herzohrs unterhalb der Bifurkation des linken Arms der Koronararterie/*Left anterior descending* (LAD) und *Ramus diagonalis* ein Faden 7-0 Prolene (Ethicon) unter die LAD gelegt. Die Nadel wurde vom Faden abgeschnitten. Beide Enden des Fadens wurden durch einen etwa 0,1 cm dicken Polyethylen-Ring (PE-10) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm gefädelt und bildeten somit eine lockere Schlaufe um die LAD. Die Enden des Fadens wurden dann durch den Thorax und die Muskelschichten geführt, so dass die Fäden schließlich im Unterhautgewebe der rechten Seite des Thorax belassen werden konnten und die Brust mit Hilfe einer Hautnaht verschlossen wurde. Abschließend erfolgte der Verschluss der Haut mit 5/0 Prolene (Ethicon, New Jersey, USA). Die Isofluran-Narkose wurde beendet und die Maus noch weitere Minuten beatmet. Sobald die Atemreflexe der Maus wieder vorhanden waren, wurde die Extubation durchgeführt. Die Maus wurde anschließend warmgehalten bis sie sich von der Narkose erholt hatte. Drei Tage nach Vorbereitung der Ligaturanlage wurden die Mäuse unter Maskeninhalation von 2 % (V/V) Isofluran und einer Mischung aus 1/3 Sauerstoff und 2/3 Luft erneut anästhesiert. Es wurde nun lediglich die Haut geöffnet und unter Kontrolle der ST-Erhebung im Elektrokardiogramm mittels der *Basic Data Acquisition Software* (BDAS, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) eine Ischämie induziert. Nach 60-minütiger Ischämie wurde eine Reperfusion des Herzens vorgenommen. Dazu wurden die Fäden vorsichtig durchtrennt und anschließend die Haut mit (5/0) Prolene verschlossen. Die operative Induktion der myokardialen I/R wurde von Frau Dr. Simone Gorressen und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

2.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen wurden zur Charakterisierung der von Immunzellen im Blut, Knochenmark, Milz- und Herzgewebe durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Gewebe geerntet und direkt verarbeitet, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten.

Die absoluten Zellzahlen wurden unter Verwendung von Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) bestimmt. Durchflusszytometrische Messungen wurden, wie im jeweiligen Abschnitt angegeben, entweder mit einem Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Kalifornien, USA) oder mit einem LSRII-Durchflusszytometer (BD

Bioscience, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Die Kaluza Flow Analysis Software (Beckman Coulter, Kalifornien, USA) wurde für die nachfolgende Datenanalyse verwendet. *Gating*-Schemata zur Analyse der Fibroblasten und Immunzellen im Herzen sind im Appendix dargestellt.

2.2.1 Blut

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das Blut mit Hilfe von EDTA antikoaguliert. Die Blutproben wurden für 7 Minuten bei 4 °C mit hypotonischem Lysepuffer zur Lyse von Erythrozyten inkubiert (Tab. 2). Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit 300 x g bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in PEB-Puffer resuspendiert (Tab. 2). Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörper-Bindungen wurden die Zellen mit einem aufgereinigten Anti-Maus-CD16/32 (BioLegend, San Diego, USA) inkubiert. Schließlich wurden die Proben mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen gefärbt. Im Fall der Monozyten-Färbung erfolgte die Lyse erst nach der Färbung und zusätzlich wurden die Monozyten für 20 Minuten in 0.1 % (V/V) Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in PBS (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach einer letzten Zentrifugation zur Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Zellen in PEB resuspendiert und unter Verwendung des Gallios™ Durchflusszytometers gemessen. So konnten verschiedene Immunzell-Populationen identifiziert werden. Zellzahlen sind als Zellen pro µl Blut dargestellt.

2.2.2 Knochenmark

Zuerst wurden die Haut und die Muskeln sorgfältig von den Hinterbein-Knochen der Mäuse entfernt. Um das Knochenmark zu gewinnen, wurden die Gelenke von Femur und Tibia abgeschnitten und die Knochen anschließend mit sterilem PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unter Verwendung einer Spritze mit einer 26G-Nadel durchgespült. Der Durchfluss, der die Knochenmarkszellen enthielt, wurde gesammelt und die Suspension dann durch einen 100 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert. Nach Zentrifugation bei 300 x g bei Raumtemperatur (RT) wurden die Erythrozyten unter Verwendung des hypotonen Lysepuffers lysiert (Tab. 2). Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen dann in PEB-Puffer (Tab. 2) mit Anti-Maus-CD16/32, *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* und verschiedenen Antikörper-Kombinationen gefärbt. Die Messungen erfolgten an einem Gallios™ Durchflusszytometer. So konnten verschiedene Immunzell-Populationen identifiziert

werden. Die Zellzahlen sind als Absolutzahl beider Hinterbeine der jeweiligen Maus dargestellt.

2.2.3 Milz

Um Einzelzellsuspensionen von der Milz zu erhalten, wurde sie mit 3 ml PEB in MACS C Röhren (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben und dann mechanisch mithilfe des MACS-Dissoziators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zerkleinert. Die Zellen wurden über einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert. Die Proben wurden mit 300 × g bei 4 °C zentrifugiert und die Erythrozyten unter Verwendung des hypotonen Lysepuffers (Tab. 2) lysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C in RPMI Medium (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) inkubiert. Die Zellen wurden dann in PEB Puffer (Tab. 2) mit Anti-Maus-CD16/32, *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* und verschiedenen Antikörper-Kombinationen gefärbt und anschließend unter Verwendung des Gallios™ Durchflusszytometers gemessen. So konnten verschiedene Immunzell-Populationen identifiziert werden. Die Zellzahlen sind als Zellen pro mg Milzgewebe dargestellt.

2.2.4 Herz

Die Herstellung einer Einzelzellsuspension des Herzens wurde unter Verwendung von Kollagenase I (450 U/ml, Worthington, Lakewood, New Jersey, USA) und DNase I (60 U/ml, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) mit Magnesium und Calcium (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) über retrograde Perfusion durchgeführt. Nach Perfusion wurden die Herzen zerkleinert und für 15 min in ihrer Perfusionslösung bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde über einen 100 µm und 40 µm Filter filtriert und bei 300 × g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann resuspendiert und für 30 min bei 37 °C in RPMI Medium inkubiert. Die Einzelzellsuspension wurde mit Anti-Maus-CD16/32, *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* und verschiedenen Antikörper-Kombinationen gefärbt und anschließend mithilfe des LSRII-Durchflusszytometers (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) gemessen. Auf diese Weise konnten verschiedene Immunzell-Populationen identifiziert werden. Die Zellzahlen sind als Zellen pro mg Herzgewebe dargestellt. Eine Liste von Antikörpern, Klonen und Herstellern ist in Tabelle 1 angegeben.

2.2.4.1 Bromdesoxyuridin Markierung

Zur Bromdesoxyuridin (BrdU) Markierung wurde 1 mg BrdU (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) 24 h vor der Gewebeernte i.p. injiziert⁵³. Um den Einbau von BrdU in die DNA zu analysieren, wurden die Zellen unter Verwendung von Fix & Perm Medium A und B (Life Technologies, Eugene, OR, USA) für 20 Minuten bei RT fixiert und permeabilisiert. Vor dem Anfärben wurden die Zellen zudem mit 20 µg DNase I (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in HBSS mit Magnesium und Calcium (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.2 Ki67 Färbung

Die Ki67 Färbung wurde direkt nach der Permeabilisierung mit Fix & Perm Medium A und B (Life Technologies, Eugene, OR, USA) für 30 Minuten bei RT durchgeführt. Kurz vor der Messung der Proben erfolgte die Färbung der DNA durch Zugabe von Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Tabelle 1: Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

Antikörper	Klon	Hersteller
Ly6C - AlexaFluor488	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6C - APC/Cy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
F4/80 - PE	BM8	BioLegend, San Diego, CA, USA
F4/80 - PerCP/Cy5.5	BM8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - PE	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b - PacificBlue	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b - PE/Dazzle 594	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - AF700	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45 - PE	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11c - APC	N418	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G - PacificBlue	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G - BrilliantViolet 785	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8a - AlexaFluor647	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD3 - APC/Cy7	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD19 - PacificBlue	6D5	BioLegend, San Diego, CA, USA
MHCII - PE/Cy7	AF6-120.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
Annexin V - FITC	A5	BioLegend, San Diego, CA, USA

Ly6C - APC/Cy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD16/32 - ungekoppelt	93	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4 - FITC	RM4-5	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD11b - PE	M1/70	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CCR2 - FITC	475301	R&D Systems Minneapolis, USA
CCR2 - BrilliantViolet 421	SA203G11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD115 - APC	AFS98	eBioscience, San Diego, USA
Live/Dead - Aqua		Life Technologies, Eugene, OR, USA
CD64 - PE	X54-5/7.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD31 - PE/Cy7	390	BioLegend, San Diego, CA, USA
Feeder - APC	mEF-SK4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
ITGA7 - AlexaFluor700	334908	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ki67 - FITC	SolA15	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
BrdU - AlexaFluor488	3D4	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 2: Nicht kommerzielle Puffer für durchflusszytometrische Untersuchungen

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
hypotoner Lyse Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	Sigma-Aldrich (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
PEB-Puffer	2 mM EDTA, 0,5 % (M/V) BSA in PBS	

2.3 Zytokin/Chemokin Quantifizierung

2.3.1 Plasma Generierung

Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut mittels Herzpunktion aus dem rechten Ventrikel entnommen und mit EDTA (Endkonzentration: 10 mmol/l) antikoaguliert. Das Blut wurde 15 Minuten bei 800 × g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 5 Minuten bei 15700 × g bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde gesammelt und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.3.2 Multiplex-Analyse

Die Multiplex-Analyse diente zur Bestimmung von von Zytokinen und Chemokinen im Plasma. Die Bestimmung von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), IFN- γ , CXC-Chemokinligand-1 (CXCL-1), MCP-1, Makrophagen entzündliches Protein (*macrophage inflammatory protein*, MIP)-1 α , MIP-1 β , CCL-5 (RANTES) und TNF- α im Plasma erfolgte mit Hilfe des Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)¹⁴⁵. Der *Multiplex-Assay* wurde in Kooperation mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr (beide Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt.

2.3.3 M-CSF Bestimmung

Zirkulierendes M-CSF wurde im murinen Plasma unter Verwendung des Maus-M-CSF-Quantikin-ELISA-Kits (R & D Systems, Inc., Minneapolis, USA) analysiert. Die Analysen wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Realtime-PCR*

Um die mRNA-Expression von *Has1-*, *Has2-*, *Has3-*, *Cx3cr*, *Ccr2* und *Ccr5* zu bestimmen wurden die Zellen mit PeqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) lysiert und die RNA extrahiert.

2.4.1 RNA Extraktion

Nach Zugabe von Chloroform und einer Inkubation bei RT wurden die Proben für 10 Minuten bei 16000 x *g* zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In dieses neue Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zuvor die gleiche Menge an Isopropanol hinzugefügt. Die Fällung der RNA erfolgte während einer einstündigen Inkubation bei 4 °C. Die gefällte RNA für eine weitere Stunde bei 16.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert und sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde zweimal in 75 % Ethanol gewaschen und zwischen diesen Waschschritten jeweils für 10 Minuten bei 16.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die RNA getrocknet und für 5 Minuten bei 65 °C in RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration sowie Qualität der RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.4.2 cDNA Synthese

Jeweils 1 µg der isolierten RNA wurde für die cDNA Synthese eingesetzt. Unter Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die cDNA nach Herstellerprotokoll synthetisiert.

2.4.3 quantitative Realtime-PCR

Eine quantitative *Realtime*-PCR wurde mit Platin SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies, Eugene, OR, USA) unter Verwendung eines StepOnePlus-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die relative mRNA-Expression wurde mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode mit 18S als interne Kontrolle berechnet. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Quantitative *realtime*-PCR Primersequenzen

Gen	Symbol	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'
18S ribosomale RNA	<i>Rn18s</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
Actin, $\alpha 2$, <i>Smooth Muscle</i> , Aorta	<i>Acta2</i>	CAGGCATGGATGGCATCAATCAC	ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTCCG
Chemokin (C- X3-C motif) Rezeptor 1	<i>Cx3cr1</i>	AGTGTGTCTGGGTGTCCATTC	GGTAAGGCGAGTCAGCAGTT
Chemokin (CC motif) Rezeptor 2	<i>Ccr2</i>	AGTTCAGCTGCCTGCAAAGA	GCCGTGGATGAACTGAGGTA
Chemokin (CC motif) Rezeptor 5	<i>Ccr5</i>	AGACATCCGTTCCCCCTACA	GCAGGGTGCTGACATACCAT
Hyaluronsäure synthase 1	<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
Hyaluronsäure synthase 2	<i>Has2</i>	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
Hyaluronsäure synthase 3	<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC

2.5 Histologische Analysen

Nach der Reperfusion für 72 h nach Ischämie wurden die Mäuse getötet und Blut wurde zur Gewinnung von Plasma aus dem rechten Ventrikel entnommen. Die Herzen wurden mit PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gespült und anschließend in 4 % Formaldehydlösung (Histofix 4 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach 24 h wurden die Herzen in PBS überführt, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Herzen wurden mithilfe des Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar) in 5 µm Schnitten in 10 Ebenen (100 µm pro Ebene) von der Herzspitze an geschnitten, wobei zwischen jeder Ebene 250 µm verworfen wurden. Die Schnitte wurden nach einem Tag bei RT für 1 Stunde bei 60 °C hitzefixiert. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte der Ebene 5 und 6 verwendet.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte mittels absteigender Ethanolreihe entparaffiniert. Dafür wurden drei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte mit Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 15 Minuten durchgeführt. Darauf folgte eine jeweils 2-minütige Inkubation in 100 %, 95 % und 75 % Ethanol. Schließlich wurden die Herzabschnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Bevor je Färbung spezifische Antikörper verwendet wurden, wurden die Schnitte mit Blockierlösung (20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl, 10 % fetales bovines Serum (FBS; Gibco Life Technologies, Paisley, UK), 1 % bovines Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) blockiert. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte in allen Färbungen über Nacht bei 4 °C, wohingegen der Sekundärantikörper am nächsten Tag für eine Stunde bei RT inkubiert wurde.

Die Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle 4 angegeben. Für die Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP)-, Mac-2-, Vimentin- und α -SMA- Färbungen wurde der gesamte linke Ventrikel quantifiziert. Für die Ly6G-Färbung wurden sechs *regions of interest* (ROI) innerhalb des linken Ventrikels quantifiziert. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden Aufnahmen unter Verwendung eines Zeiss AxioObserver.Z1-Mikroskops aufgenommen und unter Verwendung der Software ZEN 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) zusammengefügt. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von ImageJ (NIH) und der ZEN 2 Software durchgeführt.

2.5.1 Mac-2 Färbung

Der Makrophagennachweis wurde mit einem Anti-Mac-2 (Cedarlane, Burlington, Kanada) Antikörper und einem Ziege-Anti-Ratten-HRP-konjugierten IgG2a- Sekundärantikörper (Novus Biologicals, CO, USA) durchgeführt.

2.5.2 Ly6G Färbung

Bei dieser Färbung wurde vor der Blockierung der Schnitte ein weiterer Schritt eingefügt. Es wurde mit Citratpuffer (pH 6,0, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) bei 98 °C für 30 Minuten ein Antigen-Retrieval durchgeführt. Damit wurde eine eventuelle Demaskierung der Epitope durch miteinander quervernetzte Proteine wieder aufgehoben. Der Nachweis von neutrophilen Granulozyten erfolgte danach mit dem primärem Anti-Ly6G, Klon 1A8-Antikörper (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) und einem Anti-Ratten-HRP-konjugierten IgG2a-Sekundärantikörper (Novus Biologicals, CO, USA). Die beiden HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Zytomed, Berlin, Deutschland) detektiert und die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt sowie mit Roti-Mount-Eindeckmedium Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

2.5.3 Fibroblasten Färbung

Für den Vimentin- und α -SMA-Nachweis wurden die Schnitte mit Anti-Vimentin (ab92547, Abcam) und Anti- α -glattem Muskelaktin (ab5694, Abcam) inkubiert, gefolgt von Alexa-Fluor 647-Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (H + L) -sekundärer Antikörper (Life Technologies, Eugene, OR, USA). Bei diesen beiden Färbungen wurde Roti-Mount FluorCare DAPI (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zum Eindecken verwendet.

2.5.4 Hyaluronsäure Färbung

Für die Färbung des HABPs wurde zunächst eine Blockierung von endogenen Biotin-Strukturen mittels eines Avidin-Biotin-Blockiersystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Färbung wurde biotinyliertes HBP (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde Streptavidin-Cy3 (Invitrogen, CA; USA) oder Streptavidin-HRP (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Es wurde Roti-Mount FluorCare DAPI (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zum Eindecken der Fluoreszenzfärbung verwendet. Im Fall der

HRP-konjugierten Sekundärantikörperfärbung wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Zytomed, Berlin, Deutschland) detektiert und die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt sowie mit Roti-Mount-Eindeckmedium (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Tabelle 4: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für immunhistochemische Färbungen.

Antikörper	Verdünnung
Ratte-Anti-Mac2 (CL8942AP, Cedarlane, Burlington, Kanada)	1:600
Ziege-Anti-Ratten-HRP-konjugierten IgG2a (NB7126, Novus Biologicals, CO, USA)	1:600 (Mac-2) 1:200 (Ly6G)
Ratte-Anti-Ly6G, Klon 1A8-Antikörper (551459, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)	1:100
Kaninchen-Anti-Vimentin (ab92547, Abcam, Cambridge, UK)	1:200
Kaninchen-Anti- α -glattem Muskelaktin (ab5694, Abcam, Cambridge, UK)	1:100
Alexa-Fluor 647-Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (A-21245, H + L , Life Technologies, Eugene, OR, USA).	1:200
Biotinyliertes HABP (385911, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1:100
Streptavidin-Cy3 (SA1010, Invitrogen, CA, USA)	1:200
Streptavidin-HRP (Calbiochem, Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1:200

2.6 Versuche an kultivierten Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.6.1 Isolation und Kultivierung der kardialen Fibroblasten

Primäre kardiale Fibroblasten wurden aus 8-10 Wochen alten Mäusen unter Verwendung von Kollagenase I (Worthington, Lakewood, NJ) in HBSS (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) mittels retrograder Perfusion isoliert. Nach Perfusion wurden die Herzen zerkleinert und für 15 Minuten in ihrer Perfusionslösung bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde über einen 100 µm und 40 µm Filter filtriert und bei 300 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5,5 mmol/l Glucose DMEM, ergänzt mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Gibco Life Technologies, Paisley, UK) gehalten. Danach wurden die Zellen für 4 h inkubiert. Nach 4 h erfolgte der erste Wechsel des Mediums, um lediglich zu diesem Zeitpunkt bereits adhärenente Zellen weiter zu kultivieren. Außerdem wurden so die durch den Verdau entstandenen Zelltrümmer zu einem gewissen Teil entfernt. Ein weiterer Wechsel des Mediums der Zellen erfolgte nach 48 h in Kultur. Weitere 48 h später wurden die Zellen für Experimente unter Verwendung von Trypsin subkultiviert und innerhalb von 2 Passagen verwendet.

2.6.2 Stimulation der kardialen Fibroblasten

Der *Has2* KO wurde *in vitro* unter Verwendung von Rosa26CreER^{T2} (Kontrolle) und Rosa26CreER^{T2};Has2^{flox/flox} (*Has2* KO) Mäusen durch Verabreichung von 500 nM 4-Hydroxytamoxifen (Sigma Aldrich) für 24 h in Passage 1 induziert. Aus kardialen Fibroblasten wurden mit 10 ng/ml TGF-β1 (PeproTech) zu Myofibroblasten stimuliert. Je nach Versuch wurden außerdem 100 µM 4-MU (Sigma Aldrich), 10 µg/ml Anti-CD44-Blockierungsantikörper -Klon KM201- (SouthernBiotech) oder 10 µg/ml IgG1κ-Isotypkontrolle (SouthernBiotech) verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden vom Hersteller validiert. Jeder Datenpunkt stellt eine biologische Probe je Maus dar.

2.6.3 Quantifizierung von HA im Zellüberstand sowie im Plasma

Zur Quantifizierung von HA in Zellkulturüberständen und im Plasma wurde ein Analyse-Kit auf der Basis von HA-bindendem Protein (Corgenix Medical Corp., Broomfield, CO, USA) nach Herstellerinformation verwendet. Vor der Analyse wurden die Überstände 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Die Werte wurden auf die Zellzahl normalisiert. Im Fall der HA Bestimmung im Plasma wurde die gemessene Konzentration in ng/ml angegeben.

2.6.4 Immunzytochemische Färbung der kardialen Fibroblasten

Die Immunzytochemische Färbung wurde unter Verwendung von HABP (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) und Anti- α -SMA durchgeführt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit einer essigsäuren Fixierlösung (3,7 % Formaldehyd, 70 % Ethanol, 5 % Essigsäure in PBS), um die HA nicht zu schädigen. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle 5 vermerkt.

Tabelle 5: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für immunzytochemische Färbungen.

Antikörper	Verdünnung
Kaninchen-Anti- α -glattem Muskelaktin (ab5694, Abcam, Cambridge, UK)	1:150
Alexa-Fluor 647-Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (A-21245, H + L , Life Technologies, Eugene, OR, USA).	1:400
Biotinyliertes HABP (385911, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1:375
Streptavidin-Cy3 (SA1010, Invitrogen, CA; USA)	1:400

2.6.5 Isolation und Kultivierung der Knochenmarksmonozyten

Die Isolierung von primären Monozyten aus dem Knochenmark wurde von 10-12 Wochen alten Mäusen unter Verwendung des *Monocyte Isolation Kit, mouse* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Monozyten wurden in 5,5 mmol/l Glucose DMEM, ergänzt mit 10 % FBS, 15 mmol/l HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Gibco Life Technologies, Paisley, UK) kultiviert.

2.6.6 Stimulation der Knochenmarksmonozyten

Zur Analyse der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurden Monozyten in einer 12-Loch Platte mit einer Dichte von 150.000 Monozyten pro Loch ausgesät und mit M-CSF (10 ng/ml) für einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden stimuliert. Die Differenzierung wurde über die Expression zelltypspezifischer Marker mit Durchflusszytometrie gemessen. Monozyten wurden als CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺ Zellen identifiziert, während Makrophagen als CD45⁺ CD11b⁺ F480⁺ Zellen identifiziert wurden. Die Apoptose wurde durch Bindung von Annexin V und *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) nachgewiesen. Die Behandlungen wurden in 5 % FBS durchgeführt und enthielten 300 µM 4-MU (Sigma Aldrich) oder 1 µg/ml blockierenden Anti-CD44-Antikörper -Klon KM201- (SouthernBiotech) und 1 µg/ml IgG1κ- Isotypkontrolle (SouthernBiotech). Die Induktion des *Has2* KOs unter Verwendung von Rosa26CreER^{T2} (Kontrolle) und Rosa26CreER^{T2};Has2^{flox/flox} (*Has2* KO) Mäusen wurde *in vivo* mit Tamoxifen drei Wochen vor der Monozyten-Isolierung, wie zuvor (Abschnitt: 3.1.1) beschrieben (in Abb. 25), oder *in vitro* unter Verwendung von 4-Hydroxytamoxifen (500 ng/ml) durchgeführt (in Abb. 26).

2.6.7 Co-Kultivierung von Knochenmarksmonozyten und Fibroblasten

Aus dem Knochenmark isolierte Monozyten und kardiale Fibroblasten wurden in 5 % FBS ohne M-CSF-Supplementierung co-kultiviert. In allen Experimenten wurden frisch isolierte Monozyten (Abschnitt 3.6.5) auf eine konstante Zellschicht kardialer Fibroblasten in Passage 1 einer 12-Loch Platte ausgesät. Um die Wirkungen von Monozyten/Makrophagen auf die kardialen Fibroblasten Aktivierung zu bestimmen, wurden 37.000 Monozyten für 48 Stunden auf einer Schicht kardialer Fibroblasten inkubiert. Die Genexpression von *Acta2* wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt (Abschnitt 3.4.3). Um die Wirkungen von kardialen Fibroblasten auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu analysieren, wurden 150.000 Monozyten 24 Stunden lang auf einer Schicht kardialer Fibroblasten ausgesät und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurde wie in Abschnitt 3.6.7 beschrieben mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von *GraphPad Prism Software Version 7.0* (La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Statistische Ausreißer wurden durch den Grubb-Test ($\alpha = 0,05$) berechnet und von der Analyse ausgeschlossen. Beim Vergleich zweier experimenteller Gruppen wurden Datensätze mit einem ungepaarten, zweiseitigen T-Test (*unpaired t-test*) analysiert. Um mehr als zwei Gruppen zu vergleichen, wurde eine *Oneway-ANOVA* verwendet. Um zwei oder mehr unabhängige Datensätze über die Zeit zu analysieren wie Herzfunktionsparameter während der 3 Wochen Reperfusion, wurde eine *Twoway-ANOVA* verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl von n's repräsentiert unabhängige *in vitro* Experimente, wobei jedes n eine neue Primärzellisolierung darstellt oder *in vivo* einzelne Tiere.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der HA und insbesondere die Bedeutung der HAS2 nach I/R untersucht werden. Aus den in der Einleitung genannten Vorarbeiten geht hervor, dass *Has1* und *Has2* in C57BL/6J Mäusen nach Infarkt je nach Zeitpunkt bis zu 20-fach (im Fall der *Has1*) bzw. bis zu 8-fach (im Fall der *Has2*) hochreguliert sind (Abb. 5). Die *Has1*-defizienten Mäuse (*Has1* KO) wiesen allerdings im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern keine Unterschiede in der kardialen Funktion sowie der Narbengröße drei Wochen nach I/R auf (Daten nicht gezeigt), so dass die Untersuchungen an den *Has1* KO Mäusen nach Infarkt für diese Arbeit abgeschlossen wurden.

Die *Has2*-defizienten Mäuse (*Has2* KO) hingegen wiesen im Vergleich zu drei verschiedenen Kontrollmäusen eine deutlich reduzierte kardiale Funktion nach I/R auf (EF nach drei Wochen: *Has2* KO: 21,4 %, Kontrolle 1: 49,5 %, Kontrolle 2: 43,0 %, Kontrolle 3: 37,4 %; Abb. 6A). So wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen an der *Has2* KO¹⁴¹ nach Infarkt fortgesetzt, um die Mechanismen der HA nach MI im Herzgewebe zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Paraffinschnitten der Herzen von *Has2*-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen angefertigt, um mittels HABP-Färbung zunächst überprüfen zu können, ob die HA-Akkumulation nach I/R in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen reduziert ist. Es konnte sowohl eine reduzierte Akkumulation von HA im Herzen als auch im Plasma ermittelt werden (Abb. 7). In Kooperation mit Professor Dr. Ulrich Flögel wurde des Weiteren eine neue Methode zur Visualisierung der HA im Herzen mittels *chemical exchange saturation* (CEST) entwickelt. Mit Hilfe dieser Methode konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion von HA im Herzen in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass die nachfolgenden Ergebnisse in den *Has2* KO Mäusen auf einer reduzierten HA-Akkumulation basieren können.

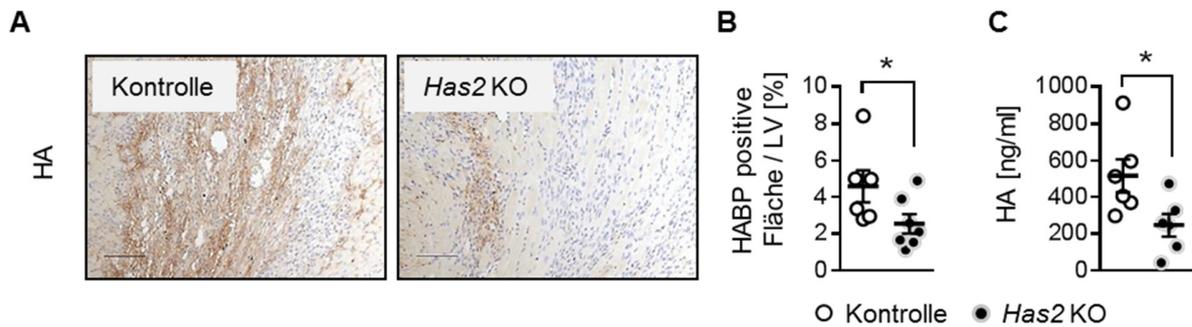


Abbildung 7: Untersuchung von HA mittels HABP im Herzgewebe nach Infarkt sowie der Konzentration von HA im Plasma. **A**, Repräsentative Bilder der Färbung von HA mittels HABP sowie **B**, die Quantifizierung im gesamten linken Ventrikel 4 W post I/R und **C**, Bestimmung von HA im Plasma 72 h post I/R in *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und den dazugehörigen Kontrollen. Der Maßstabsbalken repräsentiert 50 μ m. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, n = 6-8. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet; * $p < 0,05$.

Um jedoch zu verstehen, inwiefern HA in dem verwendeten, murinen I/R-Modell im Vergleich zu einer basalen HA-Akkumulation verändert ist, wurde zunächst eine HABP-Färbung in basalen Herzen von C57BL/6J Mäusen sowie in Herzen von C57BL/6J Mäusen 72 h nach I/R durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass unter basalen Bedingungen im gesunden Myokard wenig HA vorhanden ist. 72 h nach I/R konnte jedoch eine deutliche Anreicherung von HA nachgewiesen werden (repräsentative Bilder von mind. 3 Experimenten; Abb. 8A). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Folgenden überprüft, welche Zelltypen sich nach I/R in der HA-Matrix anreichern. Sowohl Myofibroblasten (α -SMA⁺; Abb. 8B) als auch Makrophagen (Mac-2⁺; Abb. 8C) befanden sich in bedeutender Vielzahl 72 h nach Infarkt in der HA-Matrix.

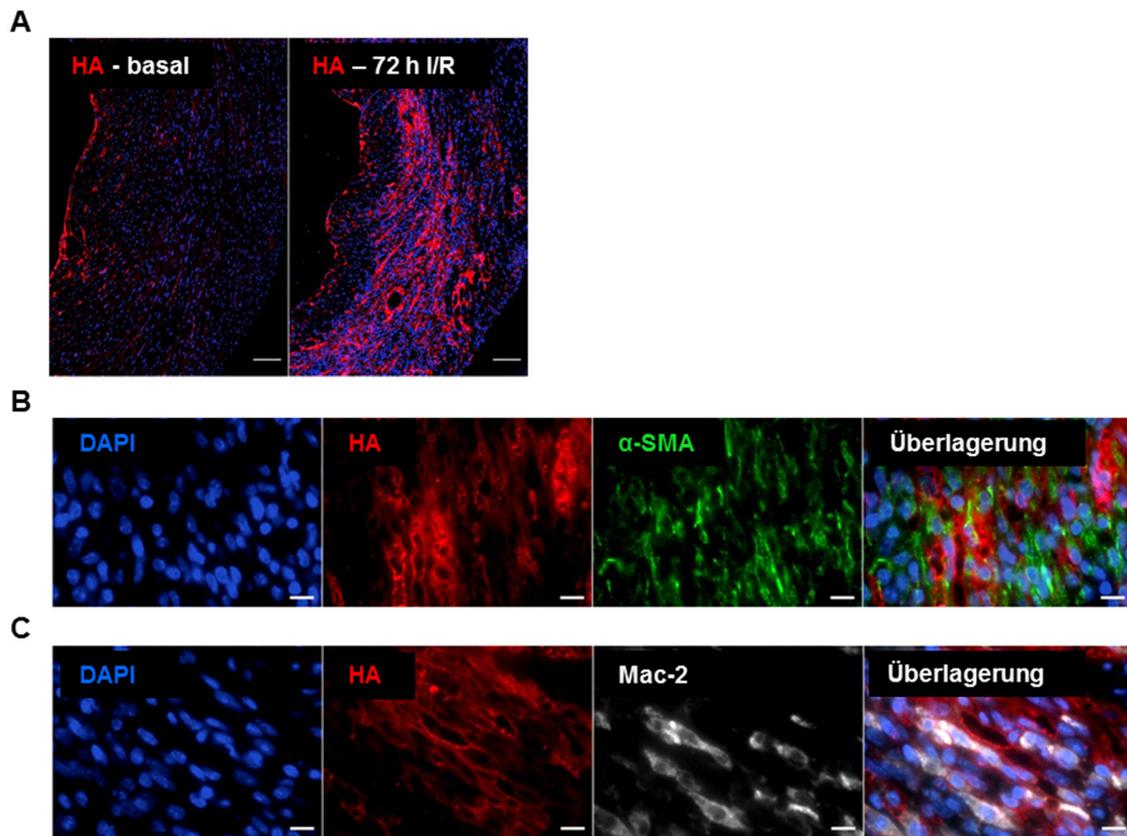


Abbildung 8: Immunhistochemische Untersuchung der HA-Akkumulation und Lokalisation von Myofibroblasten und Makrophagen in der HA-Matrix 72 h nach Infarkt. Repräsentative Bilder der A, Färbung von HA im basalen Herzen und 72 h nach Infarkt sowie der Doppelfärbung von B, HA/ α -SMA sowie C, HA/Mac-2 im Bereich des Infarkt. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μ m (A) sowie 10 μ m (B, C).

Eine wichtige Interaktion der HA-Matrix mit den beiden Zelltypen könnte daher möglich sein.

3.1 Einfluss der HAS2 auf die postischämische Inflammation

Die Immunantwort wurde lokal im Herzgewebe, in der Zirkulation und in den beiden Ursprüngen der Immunzellen nach Infarkt, Milz und Knochenmark in *Has2*-defizienten Mäusen und den dazugehörigen Kontrollmäusen untersucht.

3.1.1 Die lokale Immunantwort 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Als erstes wurde eine Charakterisierung des lokalen Entzündungsgeschehens im Herzen 72 h nach I/R im Herzgewebe vorgenommen.

Zu diesem Zweck wurden erneut Paraffinschnitten des Herzens angefertigt und mithilfe von immunhistochemischen Färbungen von Anti-Mac-2 und Anti-Ly6G untersucht. Beim

Vergleich der Mac-2 positiven Fläche innerhalb des gesamten linken Ventrikels wiesen *Has2*-defiziente Mäuse eine signifikante Reduktion um beinahe die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen auf (Abb. 9A). Mac-2 detektiert nach MI insbesondere die infiltrierte, aus Monozyten-differenzierten Makrophagen, aber auch eine Subpopulation der Fibroblasten und wird als Biomarker für Inflammation und Fibrose diskutiert¹⁴⁷. Somit konnten erste Hinweise auf eine lokal veränderte Immunantwort detektiert werden.

Hingegen wurde 72 h nach I/R mittels immunhistochemischer Ly6G-Färbung keine Veränderung der neutrophilen Granulozyten innerhalb des linken Ventrikels beobachtet (Abb. 9E).

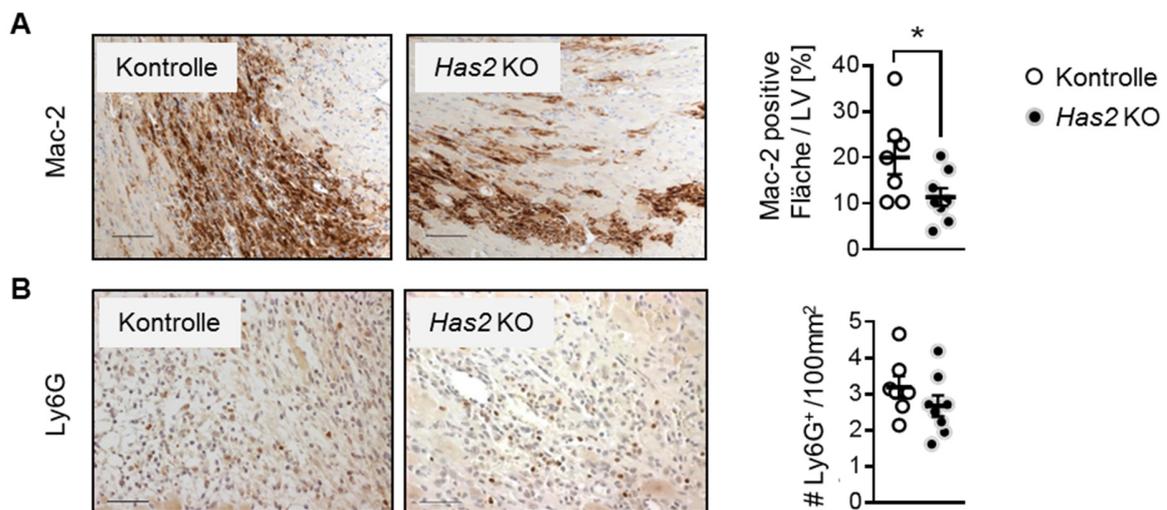


Abbildung 9: Immunhistochemische Untersuchung von Makrophagen und neutrophiler Granulozyten 72 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe. **A**, repräsentative Bilder der Mac-2 gefärbten Herzschnitte von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle und deren Quantifizierung im gesamten linken Ventrikel, **B**, repräsentative Bilder der Ly6G-angefärbten Herzschnitte und deren Quantifizierung in 6 Regionen innerhalb des linken Ventrikels. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM; n = 7-8. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet; * $p < 0,05$.

Um die Beobachtung der Reduktion des Mac-2- Signals im linken Ventrikel 72 h nach Infarkt zu bestätigen und genauer zu charakterisieren, wurde eine detaillierte durchflusszytometrische Analyse im Herzgewebe 72 h nach Infarkt durchgeführt. Es zeigte sich sowohl bei der Anzahl der ins Gewebe infiltrierte MHCII^{low} CCR2⁺ Monozyten, als auch in den Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten- Populationen, kein Unterschied (Abb. 10 A-D).

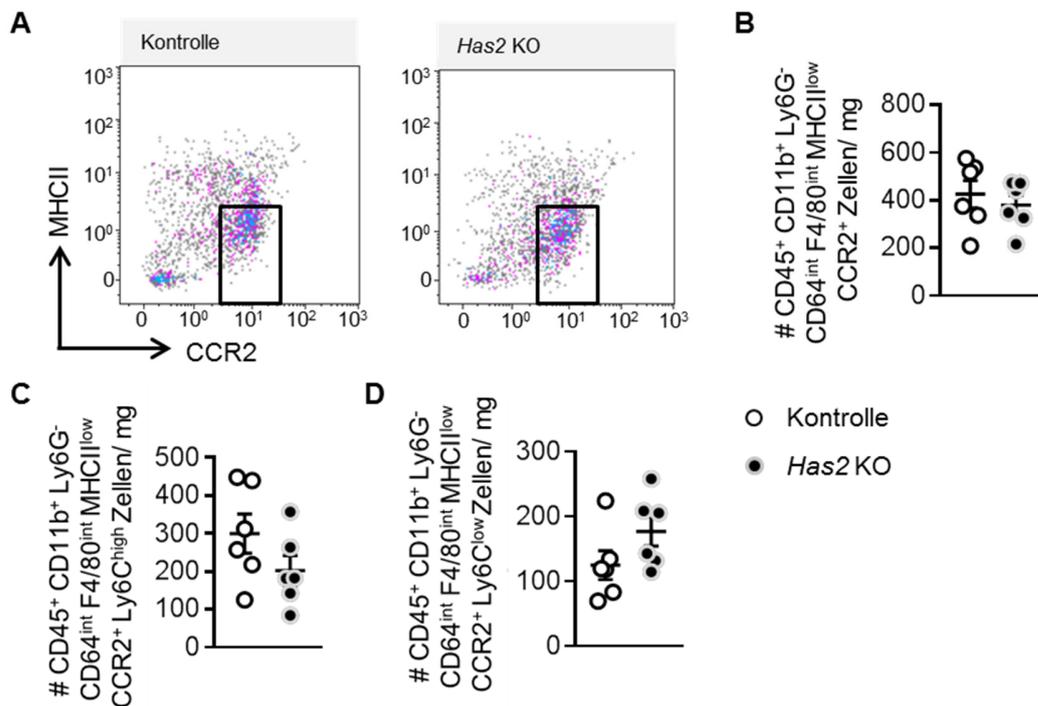


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der in das Herzgewebe infiltrierten Monozyten 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der in das Herzgewebe infiltrierten MHCII^{low} CCR2⁺ Monozyten in *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle, **B**, Quantifizierung der MHCII^{low} CCR2⁺ Monozyten und **C + D**, Quantifizierung der infiltrierten MHCII^{low} CCR2⁺ Ly6C^{high} (C) und MHCII^{low} CCR2⁺ Ly6C^{low} (D) Monozyten. In B-D ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, n = 6.

Im Gegensatz zu den kardialen Monozyten zeigte sich jedoch eine deutlich signifikante Reduktion aller Makrophagen (F480⁺ CD64⁺; Abb. 11B) sowie der aus infiltrierten Monozyten-differenzierten Makrophagen (F480⁺ CD64⁺ MHCII^{high} CCR2⁺; Abb. 11 A+C). Die Identität der verschiedenen Makrophagen-Populationen im Gewebe wurden mittels Oberflächenmarker entsprechend der Literatur definiert⁵¹.

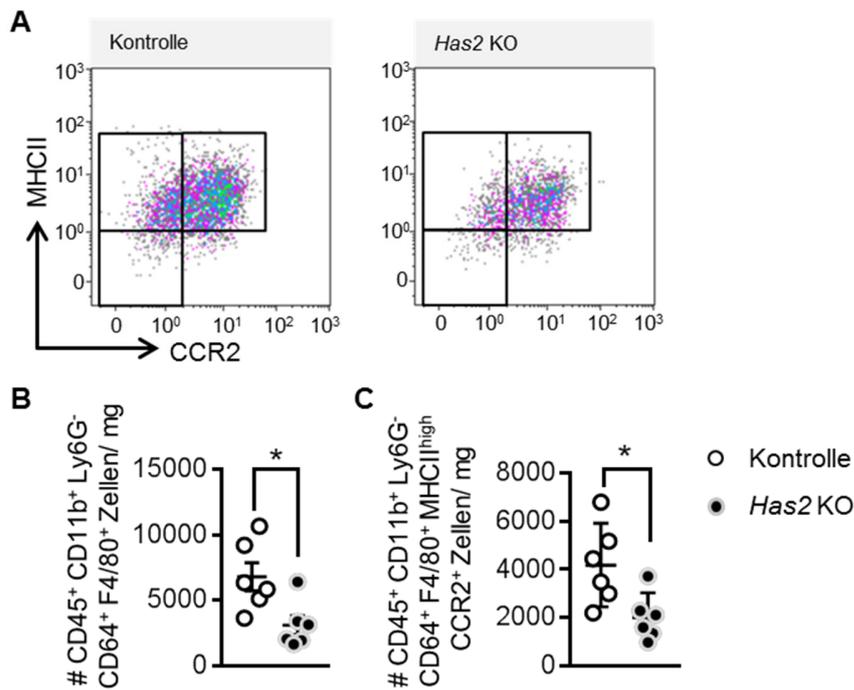


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der Makrophagen im Herzgewebe der *Has2*-defizienten Mäusen und der dazugehörigen Kontrolle, **B**, Quantifizierung aller F4/80⁺ CD64⁺ Makrophagen und **C**, Quantifizierung der im Gewebe aus Monozyten-differenzierten F4/80⁺ CD64⁺ MHCII^{high} CCR2⁺ Makrophagen. In B + C ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 6. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, * $p < 0,05$.

In den MHCII^{low} CCR2⁻ Makrophagen der *Has2*-defizienten Mäuse wurde im Vergleich zu den Kontrollmäusen kein eindeutiger Unterschied detektiert (Abb. 12A), wohingegen die MHCII^{high} CCR2⁻ Makrophagen signifikant reduziert waren (Abb. 12B).

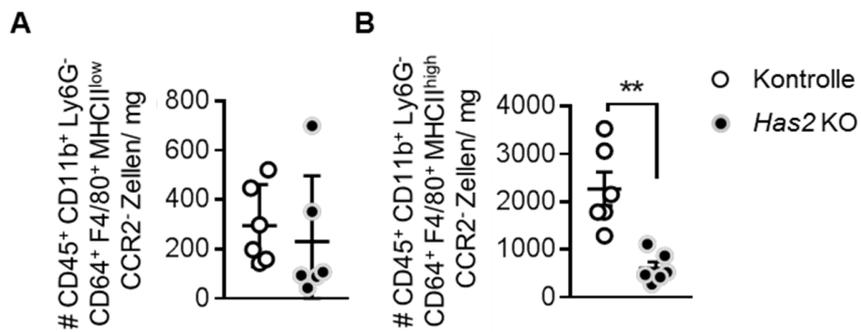


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der residenten Makrophagen im 72 Stunden nach Infarkt. **A**, Quantifizierung der bereits während der Embryogenese unabhängig von der post-embryonalen Hämatopoese entstandenen F4/80⁺ CD64⁺ MHCII^{low} CCR2⁻ Makrophagen und **B**, F4/80⁺ CD64⁺ MHCII^{high} CCR2⁻ Makrophagen der *Has2*-defizienten Mäusen und der dazugehörigen Kontrolle. In A + B ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 6. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, ** $p < 0,01$.

Obwohl die angeborene Immunantwort nach Infarkt überwiegt, können auch B- und T-Lymphozyten das Entzündungsgeschehen nach Infarkt beeinflussen^{68, 148}. Aus diesem Grund wurden die adaptiven Immunzellen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie in den *Has2*-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrollmäusen analysiert. B- und T-Lymphozyten, sowie die Subpopulationen der in CD4⁺ T-Helfer Lymphozyten und den zytotoxischen T-Lymphozyten, wiesen 72 h nach Infarkt im Herzgewebe der *Has2*-defizienten-Mäuse keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollmäusen auf (Abb. 13).

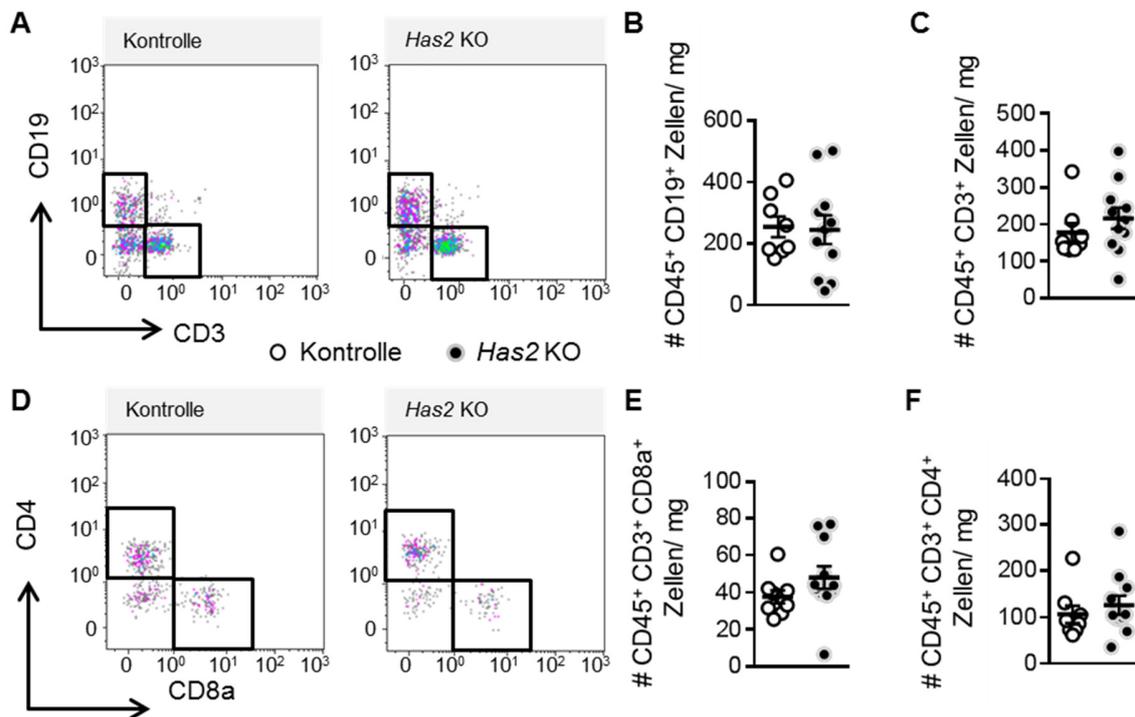


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der B- ($CD45^+ CD19^+$) und T-Lymphozyten ($CD45^+ CD3^+$) im Herzgewebe der *Has2*-defizienten Mäuse (*Has2* KO) und der dazugehörigen Kontrolle, **B**, Quantifizierung der B-Lymphozyten und **C**, Quantifizierung der T-Lymphozyten. **D**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* von zwei T-Lymphozyten Subpopulationen sowie **E**, Quantifizierung der zytotoxischen T-Lymphozyten ($CD45^+ CD3^+ CD8a^+$) und **F**, Quantifizierung der T-Helfer Lymphozyten ($CD45^+ CD3^+ CD4^+$). In **B** + **C** sowie **E** + **F** ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n = 8-11$.

3.1.2 Die Immunantwort in der Milz 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Nach Detektion einer reduzierten Anzahl kardialer Makrophagen nach I/R in den *Has2*-defizienten Mäusen, sollten nun die zugrunde liegenden Ursachen der reduzierten Anzahl kardialer Makrophagen untersucht werden. Die Milz setzt nach Infarkt bis zu 50 % der myeloiden Immunzellen in die Zirkulation frei^{54, 56, 57}. Aus diesem Grund war es von großem Interesse zu sehen, ob die Zusammensetzung und Menge der Immunzellen, insbesondere der Monozyten, in der Milz von *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen beeinflusst war. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die absolute Anzahl aller Leukozyten als auch die Anzahl der Monozyten in der Milz in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle unverändert war (Abb. 14).

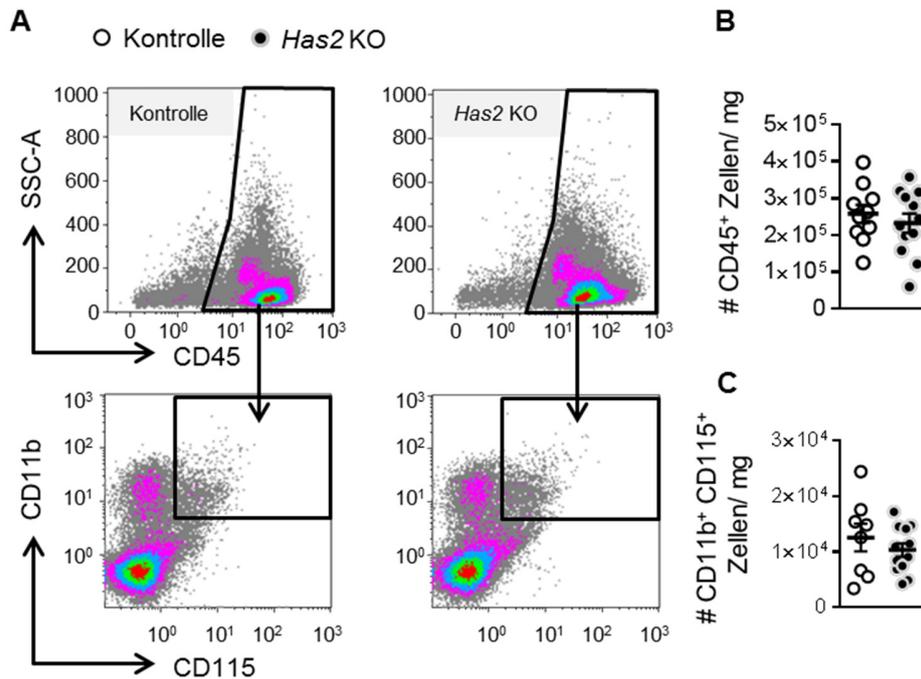


Abbildung 14: Leukozyten in der Milz 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* aller CD45⁺ Leukozyten sowie der Monozyten (CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺) in der Milz von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle und **B**, Quantifizierung der Leukozyten sowie **C**, Quantifizierung der Monozyten. In **B** + **D** ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Milzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 8-11.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Bildung, die Speicherung und das Überleben von Immunzellen in der Milz nach Infarkt in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst war.

3.1.3 Die Immunantwort im Knochenmark 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Das Knochenmark ist Produzent der hämatopoetischen Vorläufer von Immunzellen⁵⁸ und es bietet zusätzlich auch ausgereiften Immunzellen eine Nische¹⁴⁹. Um eine veränderte Immunantwort in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen nach Infarkt genauer zu untersuchen, wurde daher überprüft, ob *Has2*-Defizienz einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Knochenmarks als hämatopoetische Nische hat. Dafür wurden die Knochenmarkszellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die absolute Anzahl aller reifen Leukozyten als auch die Anzahl der Monozyten im Knochenmark der *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu

Kontrollmäusen unverändert war (Abb. 15). Aus diesem Grund wurde auf detaillierte Analysen der Vorläuferzellen in dieser Arbeit verzichtet.

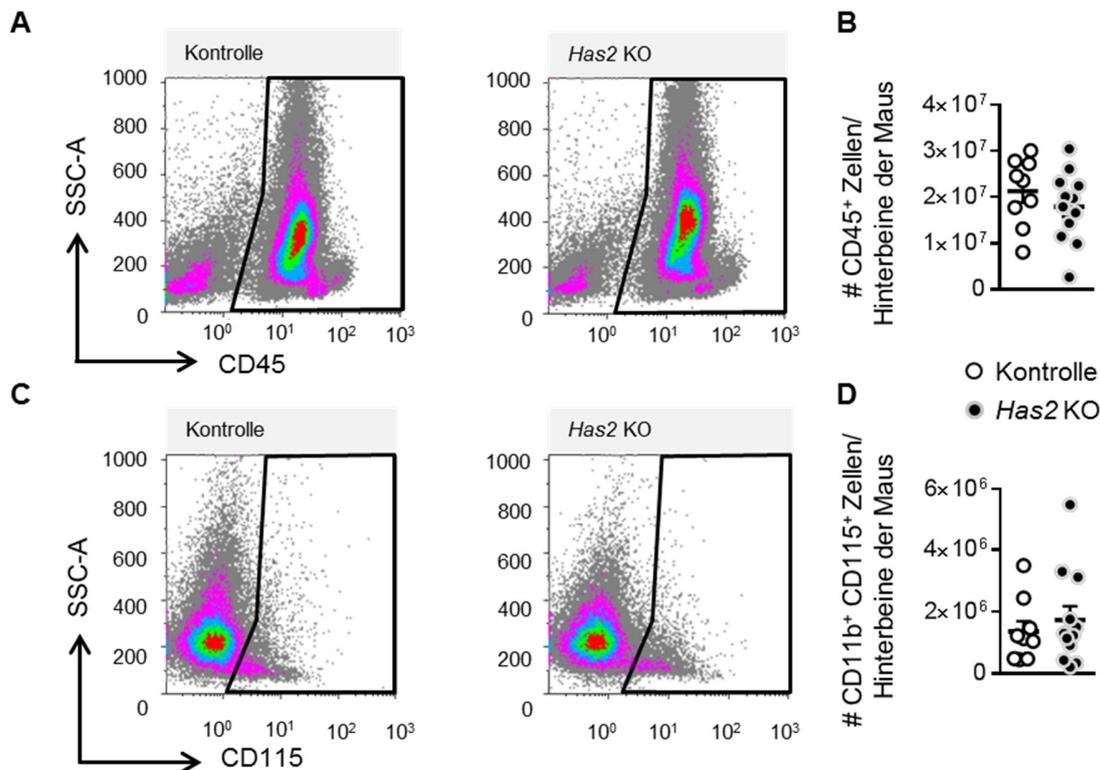


Abbildung 15: Leukozyten im Knochenmark 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* aller Leukozyten im Knochenmark von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und der dazugehörigen Kontrolle sowie **B**, Quantifizierung der Leukozyten (CD45⁺) im Knochenmark der beiden Hinterbeine der jeweiligen Maus. **C**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der Monozyten (CD11b⁺ CD115⁺) im Knochenmark sowie **D**, Quantifizierung der Monozyten im Knochenmark der jeweiligen Maus. In **B** + **D** ist die Anzahl der definierten Zellen in beiden Hinterbeinen angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Dies deutete darauf hin, dass die Blutbildung im Knochenmark und Freisetzung der Immunzellen nach Infarkt durch die Defizienz der *Has2* nicht beeinflusst war.

3.1.4 Die systemische Immunantwort 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Hinweise auf das Entzündungsgeschehen geben sowohl die verschiedenen Immunzellen in der Zirkulation als auch die aus dem geschädigten Gewebe in das Plasma freigesetzten pro- und anti-entzündliche Zyto- und Chemokine³⁵. Aus diesem Grund wurde das Blutplasma *Has2*-defizienter Mäuse sowie entsprechender Kontrollmäuse 72 h nach I/R gewonnen und

mithilfe eines *Multiplex*-Immunoassays auf die Anwesenheit diverser Zyto- und Chemokine untersucht.

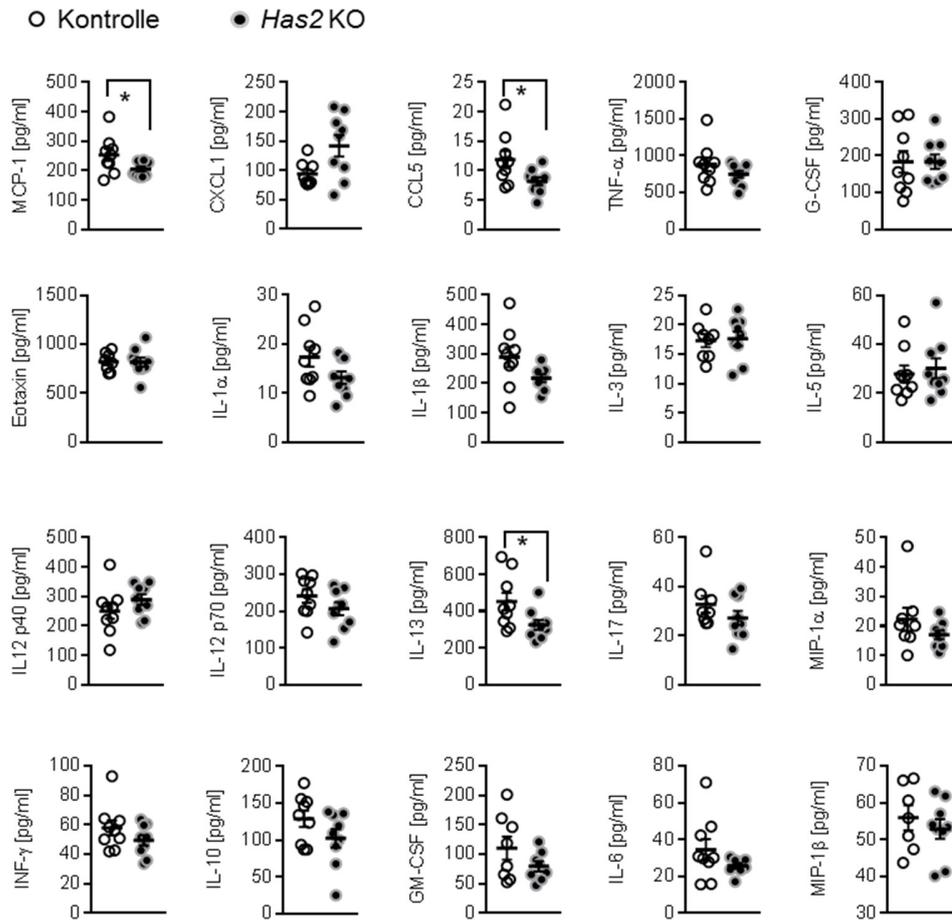


Abbildung 16: Zirkulierende Chemokine und Zytokine 72 Stunden nach Infarkt. Die zirkulierenden Chemokine und Zytokine wurden mittels eines Multiplex-Immunoassays im Plasma *Has2*-defizienter Mäuse (*Has2* KO) und der dazugehörigen Kontrolle gemessen. MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, CXCL1: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1/ KC*, CCL5: *C-chemokine ligand 5/ Rantes*, TNF- α : *Tumornekrosefaktor- α* , G-CSF: *Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor*, GM-CSF: *Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor*, INF- γ : *Interferon- γ* , Eotaxin, IL-1 α *Interleukin-1 α* , IL-1 β *Interleukin-1 β* , IL-3 *Interleukin-3*, IL-5 *Interleukin-5*, IL-6 *Interleukin-6*, IL-10 *Interleukin-10*, IL-12 (p40) *Interleukin-12 (p40)*, IL-12 (p70) *Interleukin-12 (p70)*, IL-13 *Interleukin-13*, IL-17 *Interleukin-17*, MIP-1 α *Makrophage Inflammatory Protein-1 α* , MIP-1 β *Makrophage Inflammatory Protein-1 β* . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 8. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* ermittelt, * $p < 0,05$. Die Erhebung der Daten erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr (beide Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland).

Es wurde im Plasma *Has2*-defizienter Mäuse 72 h nach I/R eine signifikante Reduktion der pro-entzündlichen Zytokine MCP-1 und CCL5, aber auch eine signifikante Reduktion des anti-entzündlichen Zytokins IL-13 im Vergleich zu den Kontrollmäusen detektiert. Die

weiteren untersuchten Zytokine und Chemokine wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf (Abb.16). Diese drei Regulationen in sowohl pro- als auch anti-entzündliche Richtung, wiesen auf recht milde entzündliche Veränderung in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollen in der Zirkulation 72 h nach Infarkt hin.

So wurden dennoch neben den Zyto- und Chemokinen im Plasma auch die zirkulierenden Leukozyten 72 h nach I/R untersucht. Da Leukozyten im Rahmen der Gewebeschädigungen in das Gewebe infiltrieren, können mögliche Unterschiede in der Zirkulation Hinweise auf die Ursache der Reduktion im Herzen in den *Has2*-defizienten Mäusen geben^{53, 150, 151}. Aus diesem Grund wurde das Blut *Has2*-defizienter Mäuse und Kontrollmäuse 72 h nach I/R entnommen und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. In der Zirkulation konnten allerdings keine Unterschiede in der Anzahl der Immunzellen zwischen beiden Genotypen festgestellt werden. Sowohl die absolute Anzahl aller Leukozyten als auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war unverändert (Abb. 17 A-D).

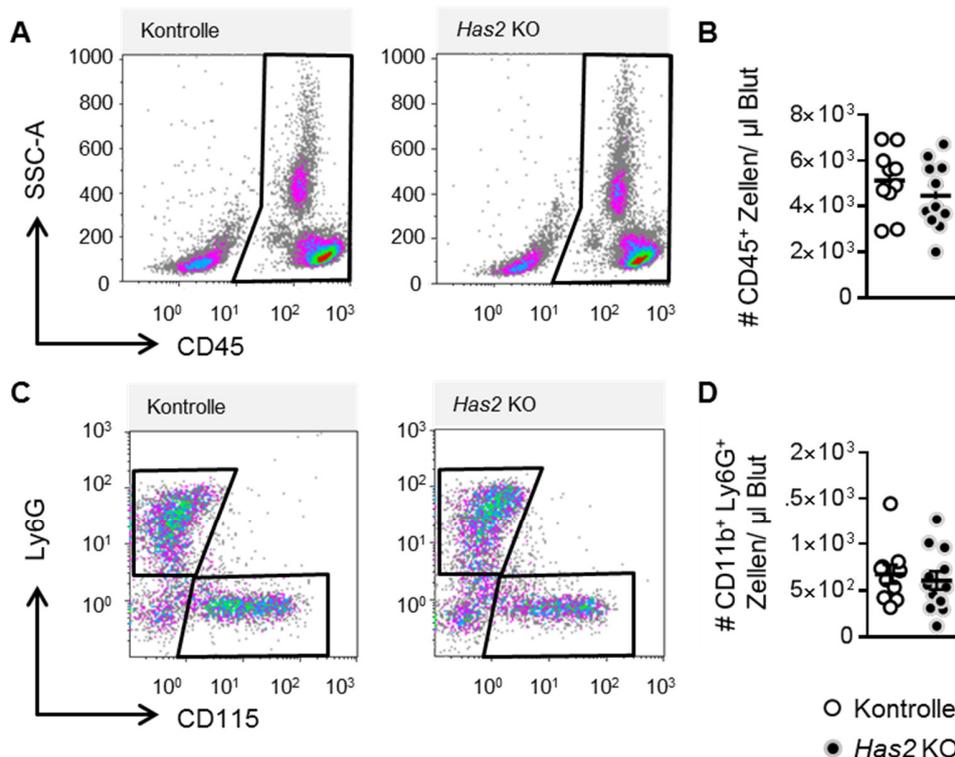


Abbildung 17: Leukozyten in der Zirkulation 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der Leukozyten in der Zirkulation von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und der dazugehörigen Kontrolle sowie **B**, die Quantifizierung der Leukozyten (CD45⁺) und **C**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der neutrophilen Granulozyten (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺) und Monozyten (CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺) sowie **D**, Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten. Es ist jeweils die Anzahl der definierten Zellen pro μ l Blut dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n= 10-12.

Um eventuelle Verschiebungen zwischen pro- (Ly6C^{high}) oder anti-entzündlichen (Ly6C^{low}) Monozyten in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollmäusen zu erhalten, wurde das Blut 72 h nach I/R entnommen und zirkulierende Monozyten im Hinblick auf die Ly6C-Expression untersucht. Allerdings konnten keine Unterschiede bei den zirkulierenden Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten festgestellt werden (Abb. 18 A-C).

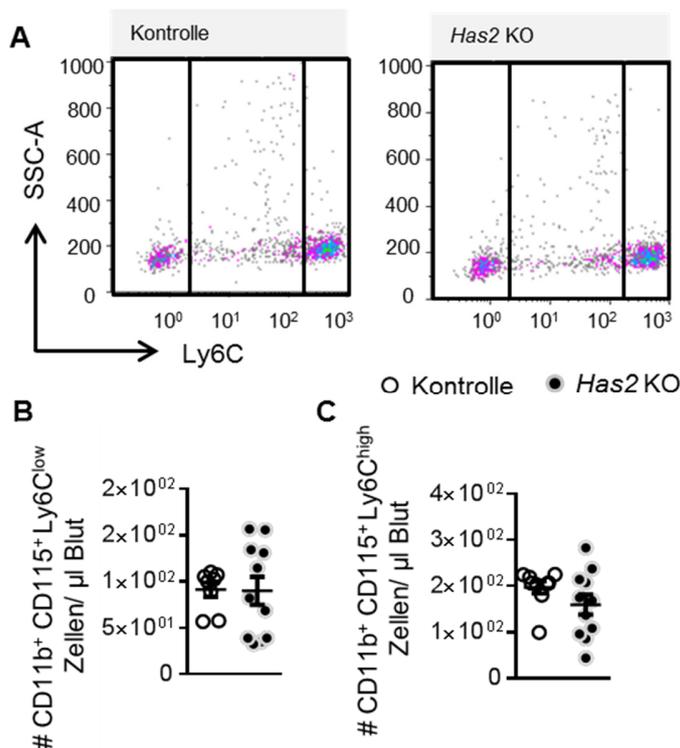


Abbildung 18: Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten in der Zirkulation 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten in der Zirkulation von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der Ly6C^{low} Monozyten und **C**, Quantifizierung der Ly6C^{high} Monozyten. Es ist jeweils Anzahl der definierten Zellen pro μ l Blut dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 10-12.

3.1.5 Die Immunantwort der Monozyten und Makrophagen 24 Stunden nach Myokardinfarkt

Es ist bekannt, dass es bereits 24 h nach Infarkt zu einer verstärkten Infiltration von Monozyten in das infarzierte Gewebe kommt^{47, 49, 64}. Da nach 72 h im Herzgewebe signifikante Unterschiede der kardialen Makrophagen beobachtet werden konnten, wurde die Anzahl von Monozyten/Makrophagen auch 24 h nach Infarkt im Detail analysiert. In den

Has2-defizienten Mäusen war 24 h nach Infarkt, wie bereits nach 72 h, kein Unterschied in der Anzahl der infiltrierten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu beobachten. Sowohl Ly6C^{high} als auch Ly6C^{low} Monozyten waren zwischen den beiden Genotypen unverändert. Die Anzahl der pro-entzündlichen Ly6C^{high} Monozyten war, wie für einen so akuten Zeitpunkt erwartungsgemäß⁴⁹, deutlich höher als die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten (Abb. 19 A+B).

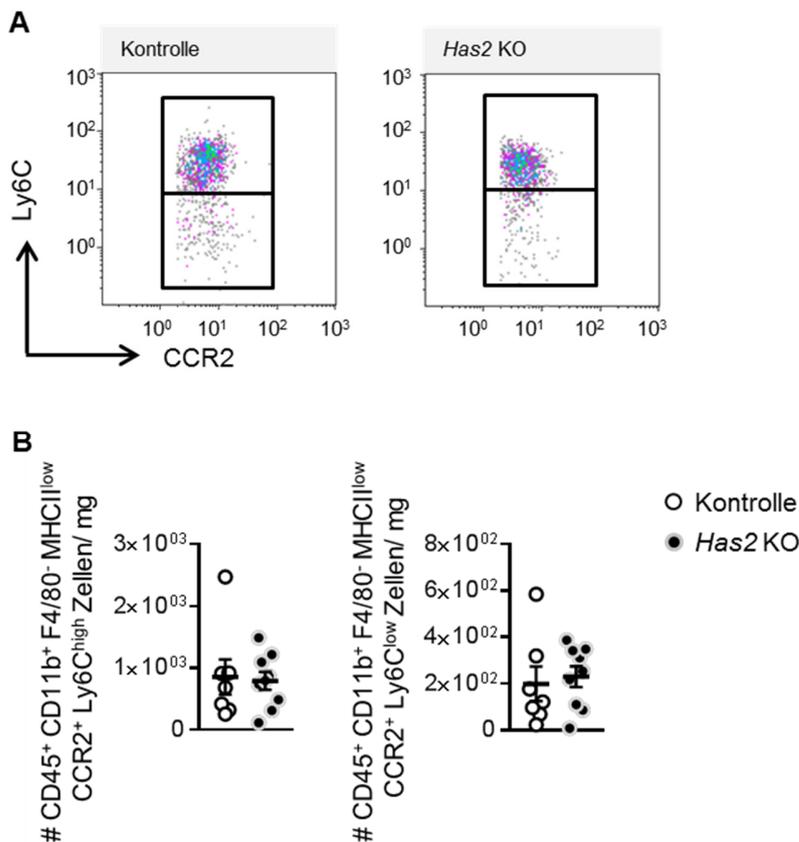


Abbildung 19: Monozyten 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der Monozyten in *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der in das Gewebe infiltrierten MHCII^{low} CCR2⁺ Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten. In B ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 7-9.

In den aus Monozyten-differenzierten Makrophagen (MHCII^{high} CCR2⁺) zeigte sich womöglich bereits 24 h nach I/R im Vergleich zu den Kontrollmäusen ein leichter Trend ($p = 0,15$) zur

Reduktion der Population in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 20 A+B).

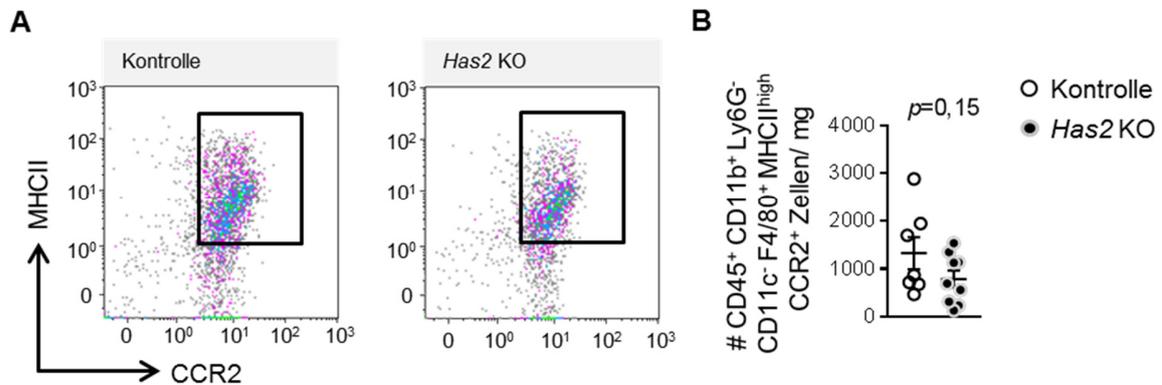


Abbildung 20: Makrophagen 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der Makrophagen in *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle und **B**, Quantifizierung der aus infiltrierten Monozyten-differenzierte MHCII^{high} CCR2⁺ Makrophagen. In B ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 7-9. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet.

3.1.6 Die frühe Immunantwort der neutrophilen Granulozyten 12 Stunden und 24 Stunden nach Myokardinfarkt

Da neutrophile Granulozyten die ersten in das Gewebe einwandernden Immunzellen sind und sie andere Immunzellen wie Makrophagen stark beeinflussen können^{44, 152}, könnten diese in *Has2*-defizienten Mäusen eine Ursache für die Veränderung der Makrophagen 72 h nach Infarkt darstellen. Um die zugrundeliegenden Mechanismen für die reduzierte Immunantwort zum Zeitpunkt 72 h identifizieren zu können, wurden daher die neutrophilen Granulozyten zu zwei sehr frühen Zeitpunkten nach Infarkt untersucht. Sowohl nach 12 h als auch 24 h befanden sich in der Zirkulation der *Has2*-defizienten Mäuse gleich viele neutrophile Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 21 A+B). Auch die Monozyten wiesen zu diesen Zeitpunkten keine Unterschiede in der Zirkulation auf (Abb. 21 A+C).

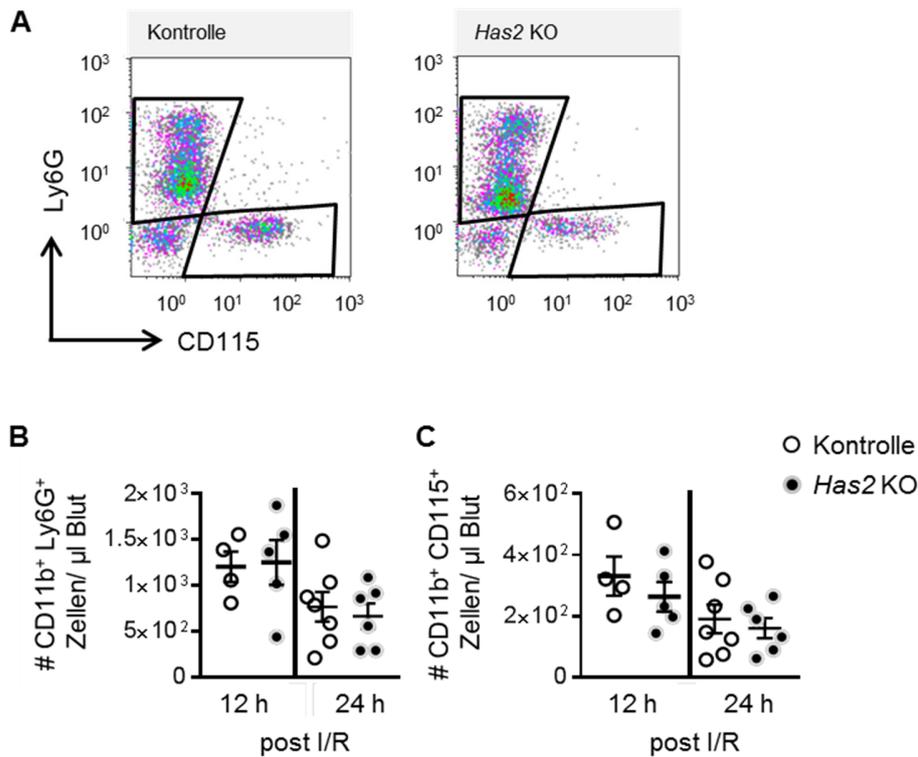


Abbildung 21: Neutrophile Granulozyten und Monozyten 12 und 24 Stunden nach Infarkt in der Zirkulation. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺ Ly6G⁺) und Monozyten (CD11b⁺ CD115⁺) der *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten, und **C**, der Monozyten. In B + C ist die Anzahl der definierten Zellen pro μ l Blut angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 4-7.

Auch 12 h und 24 h nach I/R wurden die kardialen neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die neutrophilen Granulozyten infiltrieren sowohl nach 12 h als auch nach 24 h zu gleichem Maße in die Herzen der *Has2*-defizienten Mäusen wie in die Herzen der Kontrollmäuse (Abb. 22).

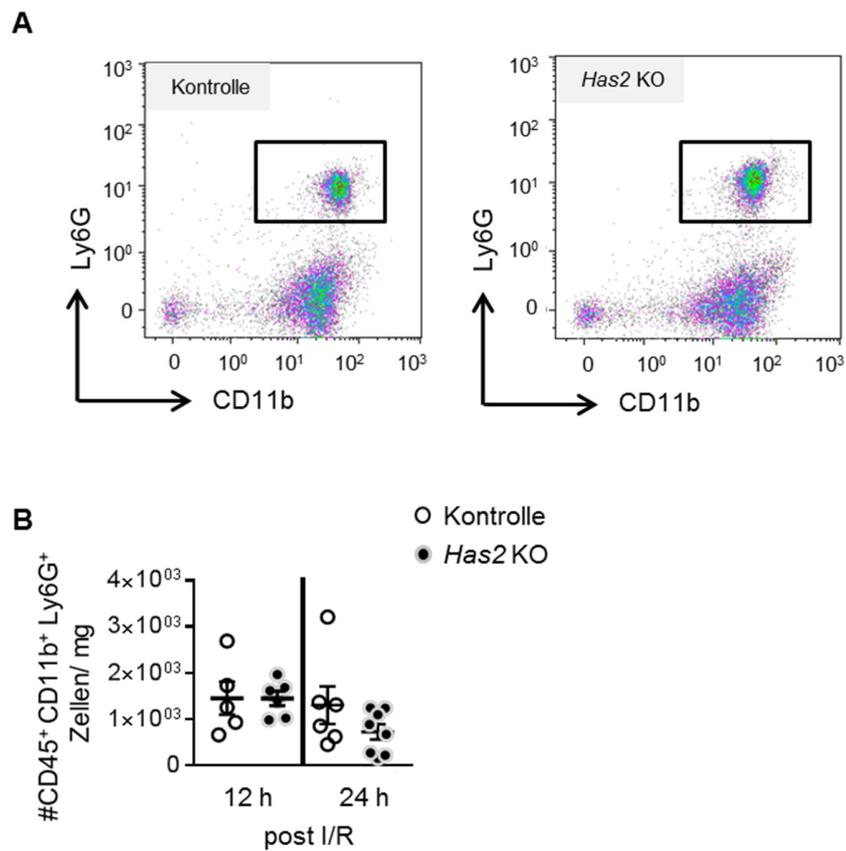


Abbildung 22: Detektion neutrophiler Granulozyten 12 und 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der neutrophilen Granulozyten (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺) in *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle und **B**, die jeweilige Quantifizierung der Zellen. In B ist die Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe angegeben Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 5-8.

3.2 Mechanistische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*

In Folge der detaillierten Charakterisierung der Immunzellen im Herzgewebe und der beteiligten Kompartimente in *Has2*-defizienten Mäusen und den Kontrollmäusen nach I/R, sollten nun die Monozyten/Makrophagen sowohl alleine als auch in Kombination mit den Fibroblasten *in vitro* funktionell untersucht werden, um weitere zelltypspezifischen Charakteristika in Abwesenheit der *Has2* zu identifizieren. Dabei wurden veränderte Proliferation und/oder Apoptose oder verminderte Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen als mögliche Ursache der Makrophagenreduktion in *Has2*-defizienten Mäusen überprüft.

3.2.1 HA-Produktion

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden kardiale Fibroblasten mittels retrograder Perfusion aus dem Herzen isoliert, sowie isolierte Knochenmarksmonozyten und differenzierte Knochenmarksmakrophagen verwendet. Zum besseren Verständnis der HA-Produktion und dem möglichen Einfluss der *Has2*-Defizienz auf die verschiedenen Zelltypen wurden die drei Zelltypen im Hinblick auf HA Sekretion und *Has* mRNA Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass kardiale Fibroblasten eine deutlich höhere Menge an HA in den Überstand sekretieren als die für das *in vitro* System gewählten Knochenmarksmonozyten und die daraus differenzierten Makrophagen. Die HA-Sekretion der Fibroblasten konnte durch Stimulation mit TGF- β 1 für 24 Stunden um beinahe das 1,5-fache signifikant gesteigert werden. Die Knochenmarksmonozyten hingegen produzierten beinahe sechs Mal weniger HA als die Fibroblasten. In den Monozyten war außerdem kein Anstieg der HA-Sekretion nach Stimulation mit TGF- β 1 zu erkennen. Aus den Monozyten wurden mittels M-CSF-Stimulation Knochenmarksmakrophagen differenziert. Diese sekretierten noch einmal fast 10-mal weniger HA in das Medium als ihre Vorläufer, die Monozyten. Auch hier zeigte sich kein Effekt durch eine TGF- β 1-Stimulation (Abb. 23A). Für die *Has* mRNA-Expression in diesen drei Zelltypen wurden die Zellen ebenfalls für 24 h mit oder ohne TGF- β 1 stimuliert und die Expression analysiert. Sowohl die Expression der *Has1* als auch die der *Has2* war nach TGF- β 1-Stimulation in den Fibroblasten signifikant hochreguliert. Die Expression der *Has3* wurde in den Fibroblasten durch TGF- β 1-Stimulation nicht reguliert. Ebenso konnte keine der *Has*-Isoenzyme durch TGF- β 1-Stimulation in den Monozyten und Makrophagen reguliert werden. Hier lag die Expression der *Has* mRNA in Monozyten und Makrophagen z.T. so niedrig, dass in einigen Proben keine *Has* mRNA detektiert werden konnte (Abb. 23 B-D).

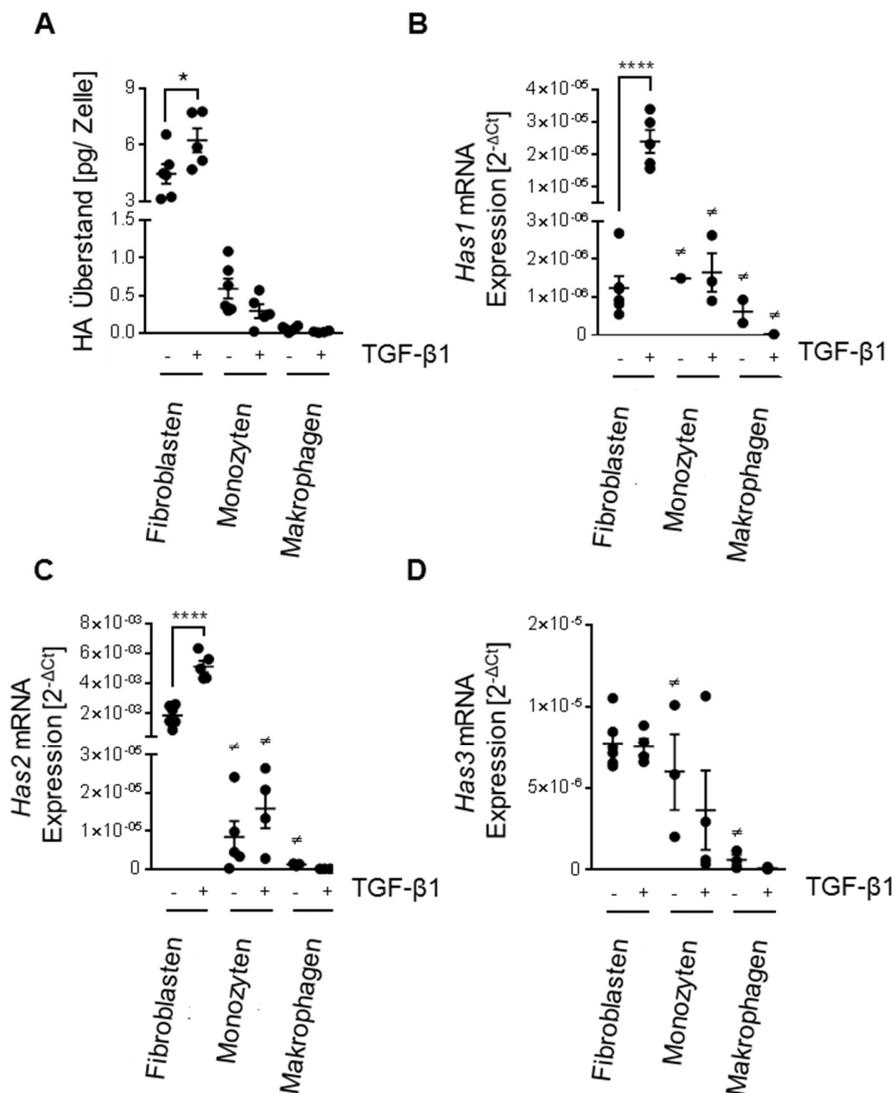


Abbildung 23: HA Produktion sowie Has mRNA Expression kardialer Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen. Kardiale Fibroblasten und Knochenmarksmonozyten wurden aus C57BL/6J Mäusen isoliert, die Makrophagen wurden aus Monozyten mittels M-CSF Behandlung generiert. **A**, HA Sekretion in den Mediumsüberstand und **B**, *Has1*, **C**, *Has2* und **D**, *Has3* mRNA Expression nach 24 h Kultivierung mit bzw. ohne TGF-β1 (10 ng/mL) Stimulation. Die Anzahl der undetektierbaren Proben ohne detektierbare *Has* mRNA Expression (\neq) ist wie folgt: *Has1*; Monozyten -TGF-β1 5/6, +TGF-β1 2/5, Makrophagen -TGF-β1 4/6, +TGF-β1 4/5. *Has2*; Monozyten -TGF-β1 1/6, +TGF-β1 1/5, Makrophagen -TGF-β1 3/6. *Has3*; Monozyten -TGF-β1 2/6, Makrophagen -TGF-β1 3/6. TGF-β1: *Transforming growth factor beta 1*, M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*. Mittelwert \pm SEM; n=5-6. Die Signifikanzen wurden mit der *One-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparison test* ermittelt, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben Fibroblasten auch Immunzellen zur Ausbildung eines HA-reichen Mikromilieus nach Infarkt beitragen könnten.

3.2.2 Untersuchung der mRNA Expression der Chemokinrezeptoren *Ccr2*, *Ccr4* und *Cx3cr1*

Die *in vivo* beobachtete Reduktion der Makrophagen bei gleicher Anzahl an infiltrierten Monozyten 72 h nach Infarkt (Abb. 10+11), sollte mithilfe weiterer Untersuchungen näher analysiert werden. Weitere Erkenntnisse bezüglich möglicher Rekrutierungsunterschiede der Monozyten in das kardiale Gewebe, konnten mittels mRNA Expression von Chemokinrezeptoren auf den Monozyten der *Has2*-defizienten Mäuse, im Vergleich zu Kontrollmäusen gewonnen werden. Dafür wurde die mRNA-Expression von *C-C chemokine receptor type 2 (Ccr2)*^{60, 153}, *C-C chemokine receptor type 5 (Ccr5)*^{154, 155} und *Cx3 chemokine receptor 1 (Cx3cr1)*^{148, 156} untersucht, da diese wichtige Chemokin-/Zytokinrezeptoren für die Monozytenrekrutierung im Infarktgeschehen darstellen. Für diesen Versuch wurden erneut Monozyten aus dem Knochenmark isoliert und nach 24- stündiger Kultivierung analysiert. Innerhalb der Kultivierung wurde die *Has2*-Defizienz erst *in vitro* mittels 4-Hydroxytamoxifen induziert. Die darauf folgende Analyse der Genexpression mittels *qPCR* zeigte keine Unterschiede zwischen der *Ccr2*-, *Ccr5*-, und *Cx3cr1*- Expression in den *Has2*-defizienten Monozyten und den entsprechenden Kontrollmonozyten (Abb. 24).

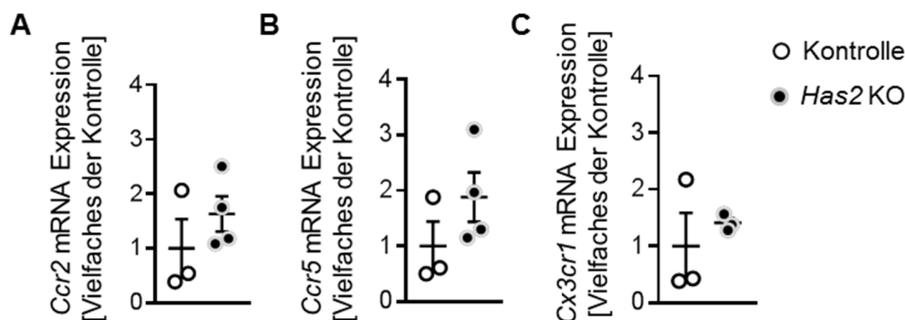


Abbildung 24: Expression der Chemokinrezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cx3cr1* auf M-CSF stimulierten Monozyten. Die Expression der mRNA der Chemokinrezeptoren wurde in *Has2*-defizienten Monozyten (*Has2* KO) sowie Kontrollmonozyten (Kontrolle) nach Induktion der Defizienz mit 4-Hydroxytamoxifen (500 ng/ml) und 24-stündiger Stimulation mit M-CSF (10 ng/ml) detektiert. **A**, Quantifizierung von *Ccr2* als Vielfaches der Kontrolle, **B**, Quantifizierung von *Ccr5* als Vielfaches der Kontrolle und **C**, Quantifizierung von *Cx3cr1* als Vielfaches der Kontrolle. *Ccr2*: C-C chemokine receptor type 2, *Ccr5*: C-C chemokine receptor type 5, *Cx3cr1*: Cx3c chemokine receptor 1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n= 3-4.

Als Limitation ist festzustellen, dass aufgrund des niedrigen basalen mRNA Expressionsniveaus der *Has2* in diesen Zellen die Effizienz des KO nicht überprüft wurde.

3.2.3 Untersuchung der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Ein Grund für die Reduktion der Makrophagen in den *Has2*-defizienten Mäusen nach Infarkt könnte eine verminderte Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen nach Eintritt in das Gewebe sein. M-CSF ist als wichtiges Zytokin in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beschrieben worden¹⁵⁷. M-CSF wurde im Plasma 72 h nach Infarkt in den *Has2*-defizienten Mäusen und ihren Kontrollen nachgewiesen. Zwischen den beiden Genotypen war jedoch kein Unterschied zu detektieren (Abb. 25A). Um weitere Rückschlüsse über das Differenzierungsverhalten von Monozyten zu Makrophagen ziehen zu können, wurde ein *in vitro* System entwickelt, in dem Knochenmarksmonozyten für 48 h mit M-CSF stimuliert wurden und im Anschluss die Expression charakteristischer Oberflächenmarker für Monozyten und Makrophagen mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Dieser *in vitro* Assay wurde mit *Has2*-defizienten Monozyten und Kontrollmonozyten durchgeführt. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nach 48-stündiger Stimulation mit M-CSF festgestellt werden (Abb. 25B).

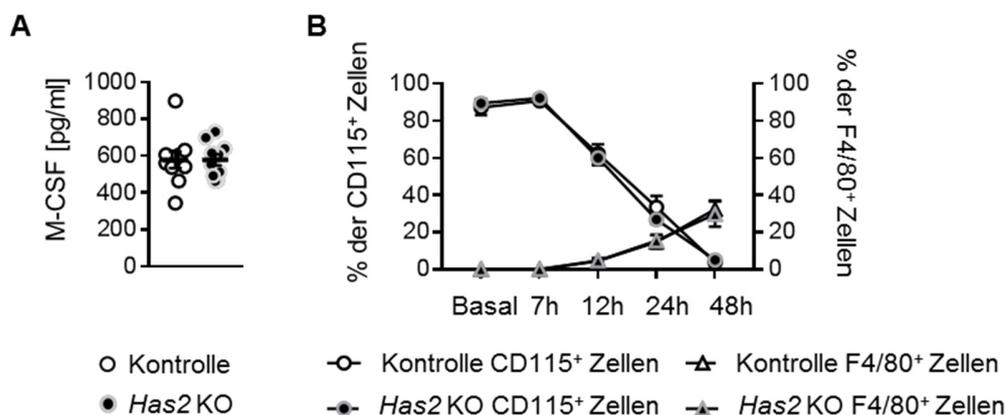


Abbildung 25: Zirkulierendes M-CSF 72 h nach Infarkt sowie Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen *in vitro*. **A**, Menge an zirkulierendem M-CSF, **B**, Knochenmarksmonozyten wurden aus *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und Kontrollmäusen (Kontrolle) isoliert und die Differenzierung in Makrophagen mittels M-CSF (10 ng/ml) Behandlung stimuliert. Die Beobachtung der Differenzierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie zu den Zeitpunkten: basal, 7 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Stimulation. Monozyten wurden definiert als CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺ Zellen und Makrophagen als CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen. M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; A: n = 10, B: n = 4-5.

Daraus konnte geschlossen werden, dass die Reaktion der Monozyten beider Genotypen auf M-CSF nicht unterschiedlich beeinflusst ist und wahrscheinlich ein anderer Grund für die reduzierte Anzahl der Makrophagen 72 h nach Infarkt im Herzen vorliegt.

3.2.4 Untersuchung der Apoptose während der Differenzierung der Monozyten

In dem etablierten *in vitro* Assay konnte ebenfalls die Apoptose mittels Detektion von Annexin V und einem Lebend/Tot-Farbstoff (*Live/Dead*TM) untersucht werden. Dort zeigte sich 24 h nach M-CSF-Stimulation ein signifikanter Anstieg in der späten Phase der Apoptose in *Has2*-defizienten Monozyten im Vergleich zu Kontrollmonozyten während der Differenzierung zu Makrophagen (Abb. 26A). Ebenfalls konnte aus C57BL/6J isolierten und mit 4-MU-behandelten Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen, ein signifikanter Anstieg der Apoptose detektiert werden (Abb. 26B). Es konnte außerdem ein Trend im Unterschied der Apoptose in aus C57BL/6J isolierten und Anti-CD44-Antikörper behandelten Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb. 26C) beobachtet werden.

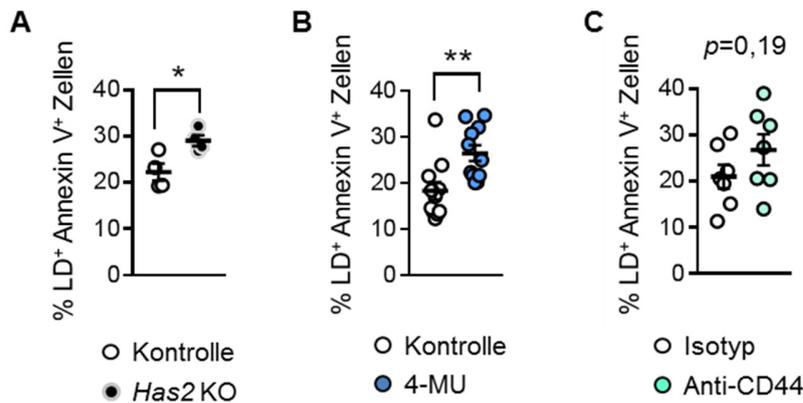


Abbildung 26: Apoptose von Monozyten/Makrophagen während 24-stündiger Stimulation mit M-CSF. **A**, aus dem Knochenmark von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und Kontrollmäusen isolierte Monozyten + 4-Hydroxytamoxifen (500 ng/ml) + M-CSF (10 ng/ml), **B**, aus dem Knochenmark von C57BL/6J isolierte Monozyten + M-CSF (10 ng/ml) ± 300µM 4-MU behandelt und **C**, aus dem Knochenmark von C57BL/6J isolierte Monozyten + M-CSF (10 ng/ml) + 1 µg/ml Anti-CD44 Antikörper (KM201), oder Isotypkontrolle (IgG1κ). Die Analyse erfolgte nach 24 h in Kultur mittels Durchflusszytometrie. *Live/Dead*TM (LD⁺) und Annexin V⁺ Zellen sind in A-C als % aller Zellen in der Kulturschale angegeben. 4-MU: 4-Methylumbelliferon. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 4-11. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* ermittelt, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Daraus konnte geschlossen werden, dass HA das Überleben der Makrophagen *in vitro* zu beeinflussen scheint und dieser Effekt womöglich auch über CD44 vermittelt werden könnte.

3.2.5 Ko-Kultivierung von Fibroblasten und Monozyten

Neben der entzündlichen Phase nach Infarkt beeinflussen auch die Fibroblasten das *Remodeling* nach Infarkt deutlich¹⁵⁸. Um also noch weitere Rückschlüsse auf die Mechanismen für die verschlechterte kardiale Funktion in den *Has2*-defizienten Mäusen ziehen zu können (Abb. 8), wurde ein Ko-Kultur-System aus kardialen Fibroblasten und Knochenmarksmonozyten etabliert. Dazu wurden kardiale Fibroblasten mittels retrograder Perfusion aus dem Herzen isoliert und 24 h vor dem Hinzufügen von Monozyten subkultiviert und in definierter Anzahl in einer Kulturschale ausgesät. Zunächst wurde untersucht, ob Monozyten die Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten beeinflussen können. In Abbildung 27A wurde mittels mRNA-Expression von *Acta2* gezeigt, dass die Ko-Kultur von Monozyten und Fibroblasten die Fibroblasten signifikant aktiviert. In den repräsentativen Bildern der immunzytochemischen Färbung von α -SMA und HA wurde erkennbar, dass die Stimulation der Fibroblasten mit Monozyten (rechts), ebenso wie die klassische Stimulation von Fibroblasten mit TGF- β 1 (Mitte), eine erhöhte Expression von α -SMA, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (links), aufwies (Abb. 27B).

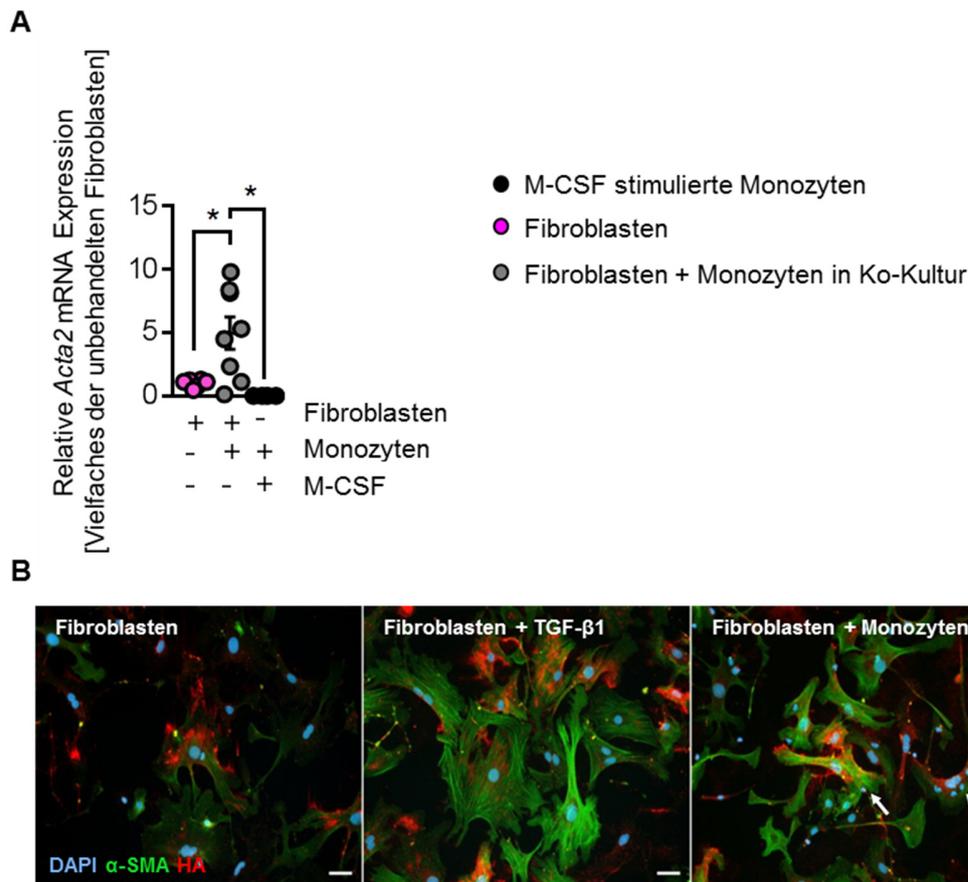


Abbildung 27: Ko-Kultur von Knochenmarksmonozyten mit kardialen Fibroblasten. **A**, Kardiale Fibroblasten aus C57BL/6J Mäusen wurden in einer Kulturschale ausgesät mit und ohne Knochenmarksmonozyten als Stimulanz kultiviert. Knochenmarksmonozyten wurden als weitere Kontrolle wiederum mit M-CSF (10 ng/mL) stimuliert kultiviert. Die relative Expression von *Acta2* wurde quantifiziert. **B**, Kardiale Fibroblasten aus C57BL/6J Mäusen wurden auf Glasplättchen in einer Kulturschale ausgesät und \pm TGF- β 1 (10 ng/mL) und \pm Ko-Kultivierung mit Monozyten für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden im Folgenden für α -SMA und HA mittels Immunozytochemie gefärbt. Die repräsentativen Bilder zeigen Stressfibrillenbildung und eine perizelluläre HA-Matrix. Die weißen Pfeile zeigen Zellkerne von Monozyten. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. TGF- β 1: *Transforming growth factor beta 1*, M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 3-4. Die Signifikanzen wurden mit der *One-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparison test* berechnet, * $p < 0,05$.

Einhergehend mit der beobachteten Fibroblastenaktivierung mittels mRNA Expression von *Acta2* in der Ko-Kultur, konnte im Folgenden mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in der etablierten Ko-Kultur stärker vorangetrieben wurde als die Differenzierung der Monozyten mit M-CSF in der Monokultur (Abb. 28).

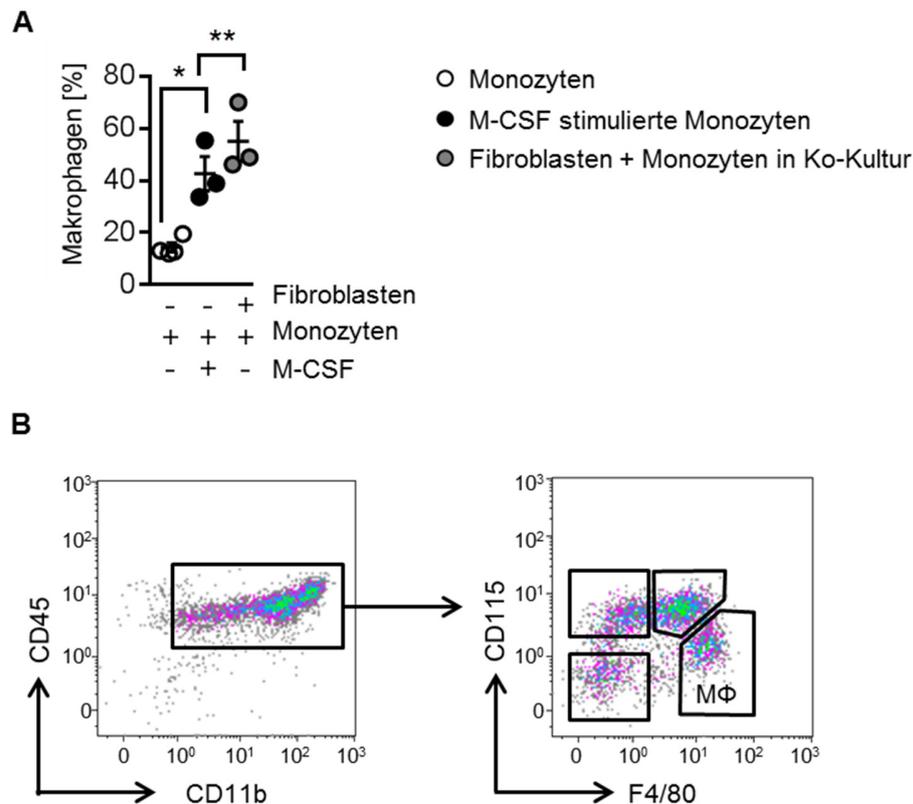


Abbildung 28: Monozytendifferenzierung durch kardialen Fibroblasten. **A**, Knochenmarksmonozyten aus C57BL/6J Mäusen wurden \pm M-CSF (10 ng/mL) oder auf kardialen Fibroblasten aus C57BL/6J ausgesät. Nach 24 h wurde die Monozyten/Makrophagen-Population mittels Durchflusszytometrie analysiert. Makrophagen wurden dabei definiert und als % der $CD45^+$ $CD11b^+$ $F4/80^+$ Zellen bezogen auf alle myeloiden Zellen dargestellt. **B**, repräsentatives *Gatingschema* für die Stadien der Transition von Monozyten zu Makrophagen. M Φ : Makrophagen, M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 3-4. Die Signifikanzen wurden mit der *One-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparison test* berechnet, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Aus den beiden Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Ko-Kultur zu einer wechselseitigen Aktivierung der Monozyten und Fibroblasten führt. Diese Erkenntnis verdeutlichte also *in vitro* eine relevante Interaktion der beiden Zelltypen.

Aufgrund der beobachteten Effekte auf die Apoptose der Monozyten/Makrophagen *in vitro* (Abb. 26), wurde im Folgenden untersucht, ob die Apoptose der Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen auf einer Zellschicht *Has2*-defizienter Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten unterschiedlich induziert wird. Dort konnten in der Ko-Kultur keine unterschiedliche Regulation der Apoptose, abhängig von den Fibroblasten der beiden Genotypen festgestellt werden (Abb. 29). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Apoptose der Monozyten/Makrophagen in der Ko-Kultur mit den Fibroblasten signifikant

geringer war als in der Monokultur und der Stimulation mit M-CSF. Dies bekräftigte erneut die Relevanz der Zell-Zell-Interaktion der Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten. Dieser Fibroblasten-vermittelte protektive Effekt war jedoch Genotypen-unabhängig.

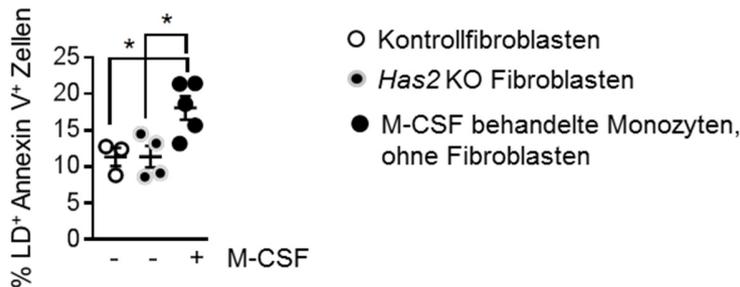


Abbildung 29: Apoptose von Monozyten/Makrophagen in Ko-Kultur mit kardialen Fibroblasten. Aus dem Knochenmark von C57BL/6J isolierte Monozyten wurden auf kardiale Fibroblasten aus *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und Kontrollmäusen ausgesät. Als Kontrolle innerhalb des Experiments wurden C57BL/6J Monozyten ebenfalls ohne Fibroblasten, aber mit M-CSF (10 ng/ml) stimuliert. Die Analyse erfolgte nach 24 h in Kultur mittels Durchflusszytometrie. *Live/Dead*TM (LD⁺) und Annexin V+ Zellen sind als % aller Zellen in der Kulturschale angegeben. M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, n=3-5. Die Signifikanzen wurden mit der *One-way ANOVA* und anschließendem *Tukey's multiple comparison test* berechnet, * $p < 0,05$.

3.2.6 Untersuchung der Proliferation 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Neben dem Effekt der Apoptose von Makrophagen *in vitro* könnte ebenso eine verminderte Proliferation eine mögliche Ursache für die reduzierte Zahl der Makrophagen 72 h nach Infarkt in den *Has2*-defizienten Mäusen sein. Um dies zu untersuchen wurde den Mäusen 24 h vor der Organentnahme 1 mg BrdU i.p. injiziert. In allen Zellen, die innerhalb der 24 h bis zur Organentnahme entstanden, wurde das BrdU anstelle von Thymidin während der S-Phase des Zellzykluses in die DNA der Zellen eingebaut^{46, 54}. In dieser Arbeit konnte kein Effekt einer *Has2*-Defizienz auf den prozentualen Anteil der BrdU-positiven infiltrierten Monozyten, bezogen auf alle infiltrierten Monozyten mittels Durchflusszytometrie, ermittelt werden (Abb. 30). Sowohl Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten wiesen zwischen den Genotypen keine Unterschiede auf. Der prozentuale Anteil der BrdU⁺ Ly6C^{high} Monozyten war aber erwartungsgemäß mehr als doppelt so hoch wie der Anteil innerhalb der BrdU⁺ Ly6C^{low} Monozyten.

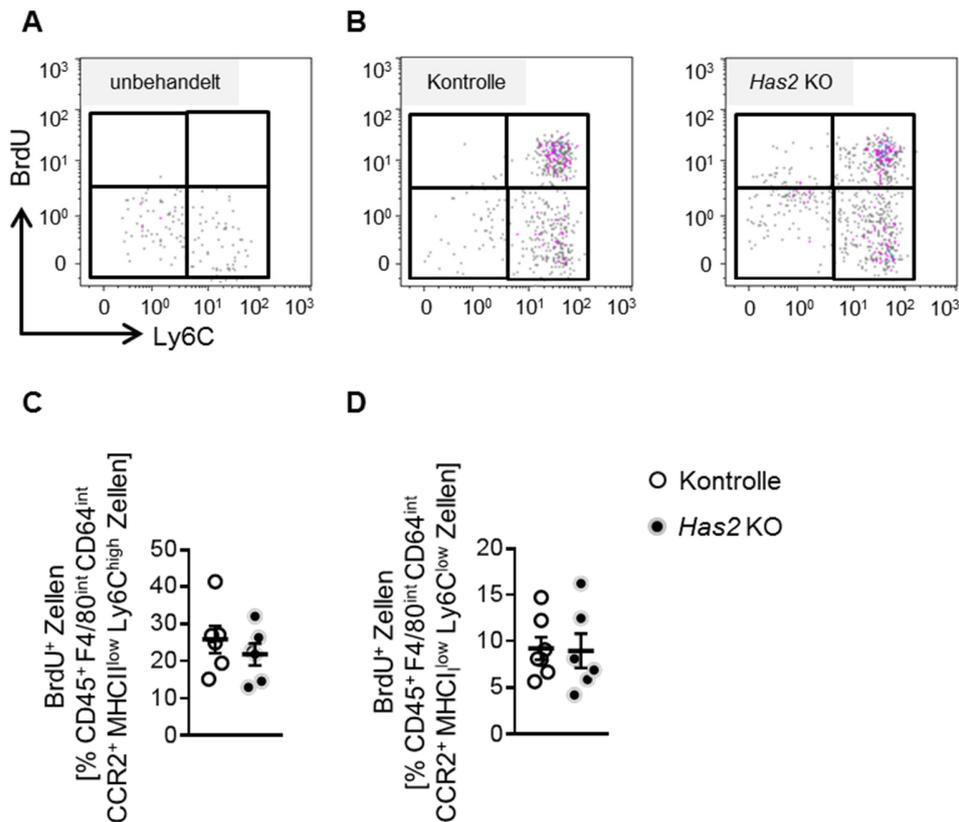


Abbildung 30: Proliferation von infiltrierten Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentativer durchflusszytometrischer *Plot* einer BrdU-ungespritzten Kontrollmaus, **B**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der infiltrierten Monozyten einer BrdU-gespritzten *Has2*-defizienten Maus (*Has2* KO) sowie ihrer BrdU-gespritzten Kontrolle. **C**, Quantifizierung der BrdU⁺ Ly6C^{high} Monozyten, **D**, Quantifizierung der BrdU⁺ Ly6C^{low} Monozyten im Herzgewebe von *Has2*-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen bezogen auf die Gesamtanzahl der Ly6C^{high} bzw. Ly6C^{low} Monozyten. BrdU: Bromdesoxyuridin. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 6.

Aufgrund der Reduktion der aus Monozyten-differenzierten Makrophagen 72 h nach Infarkt (Abb. 11) sollte auch in dieser Zell-Population der Effekt auf die Proliferation geprüft werden. Bezüglich der Proliferation der Makrophagen waren sowohl in der Gesamtmakrophagen-Population (F4/80⁺ CD64⁺; Abb. 31 A+B) als auch in den aus Monozyten-differenzierten Makrophagen (F4/80⁺ CD64⁺ CCR2⁺ MHCII^{high}; Abb. 31 C+D) keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu detektieren.

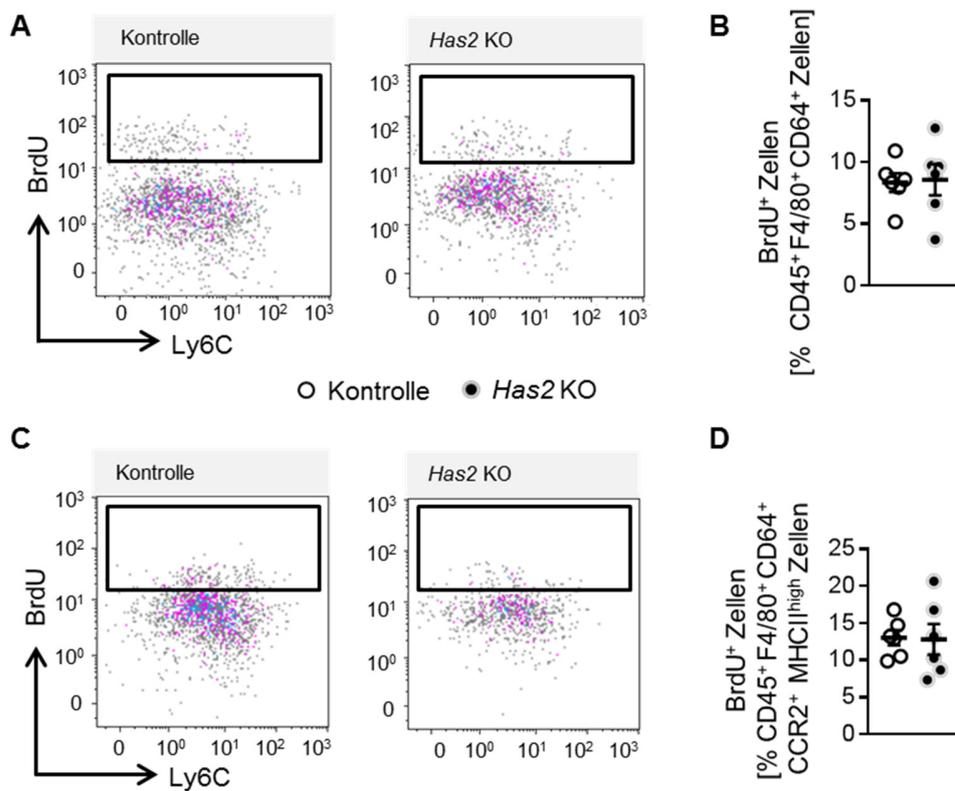


Abbildung 31: Proliferation von Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der F4/80⁺ CD64⁺ Makrophagen einer BrdU-gespritzten *Has2*-defizienten Maus sowie ihrer gespritzten Kontrolle, **B**, Quantifizierung der BrdU⁺ F4/80⁺ CD64⁺ Makrophagen im Herzgewebe von *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) und Kontrollmäusen bezogen auf die Gesamtanzahl der F4/80⁺ CD64⁺ Makrophagen **C**, repräsentative durchflusszytometrische *Plots* der aus Monozyten-differenzierte F4/80⁺ CD64⁺ CCR2⁺ MHCII^{high} Makrophagen einer BrdU-gespritzten *Has2*-defizienten Maus sowie ihrer gespritzten Kontrolle, **D**, Quantifizierung der BrdU⁺ F4/80⁺ CD64⁺ CCR2⁺ MHCII^{high} Makrophagen im Herzgewebe von *Has2*-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen bezogen auf die Gesamtanzahl der F4/80⁺ CD64⁺ CCR2⁺ MHCII^{high} Makrophagen. BrdU: Bromdesoxyuridin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 6.

Diese Ergebnisse schlossen Effekte auf die Proliferation der Monozyten und Makrophagen in dem *Has2*-defizienten Herzgewebe im Vergleich zur Kontrolle aus.

3.2.7 Untersuchung der Apoptose in den Makrophagen 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Aufgrund des Einflusses der *Has2* auf die Apoptose von Makrophagen *in vitro*, sollte abschließend untersucht werden, ob die Apoptose der Makrophagen im Herzgewebe in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen 72 h nach I/R ebenfalls beeinflusst war. Dazu wurde die Zellsuspension des Herzgewebes durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte in den *Has2*-defizienten Mäusen ermittelt werden, dass die Apoptose aller $F4/80^+CD64^+$ Makrophagen (Abb. 32A + B), aber auch spezifisch die Apoptose der aus Monozyten-differenzierten Makrophagen ($CCR2^+ MHCII^{high}$) im Herzgewebe im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht war (Abb. 32 C).

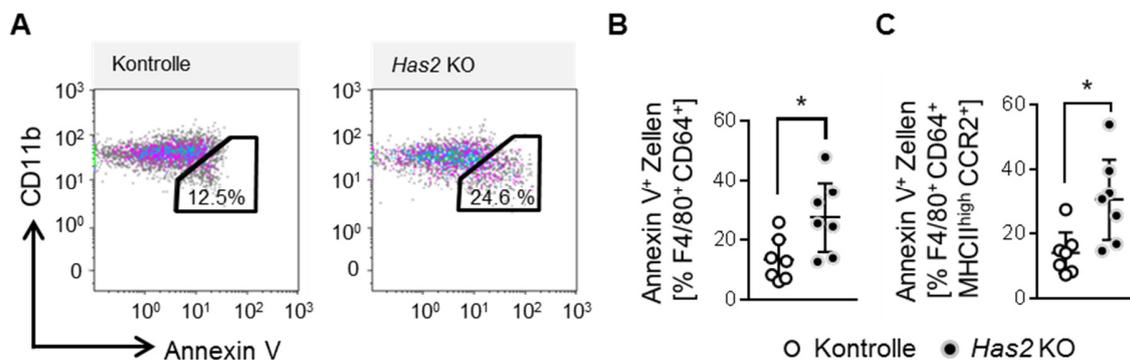


Abbildung 32: Apoptose von Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative, durchflusszytometrische Plots der Annexin V⁺ F4/80⁺CD64⁺ Makrophagen *Has2*-defizienter Mäuse (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der Annexin V⁺ F4/80⁺CD64⁺ Makrophagen bezogen auf die Gesamtanzahl der Makrophagen und **C**, Quantifizierung der aus Annexin V⁺ Monozyten-differenzierte MHCII^{high} CCR2⁺ Makrophagen bezogen auf die Gesamtanzahl der aus Monozyten-differenzierte Makrophagen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, n = 7. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, * p < 0,05.

Somit konnte zusammenfassend in *Has2*-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die reduzierte Makrophagenantwort 72 h nach Infarkt vermutlich auf einer erhöhten Apoptoserate der Makrophagen basiert. Die *in vitro*-Ergebnisse stützen diese Hypothese.

3.3 Einfluss der HAS2 auf die Fibroblasten nach Myokardinfarkt

Wie bereits in Abbildung 27 gezeigt, haben Monozyten einen wesentlichen Einfluss auf die Fibroblastenaktivierung. Da die *Has2*-Defizienz die Anzahl der aus Monozyten-differenzierten Makrophagen nach Infarkt beeinflusst, sollte nun weiter *in vivo* untersucht werden, ob nach Infarkt auch die kardialen Fibroblasten und die Aktivierung dieser von der *Has2*-Defizienz beeinflusst wird. Daher wurde eine Charakterisierung der Fibroblasten und Myofibroblasten mittels immunhistochemischer Färbungen von *Has2*-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen 72 h nach I/R durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Fläche der Vimentin-positiven Zellen zwischen beiden Genotypen gleich war. Vimentin markiert alle Zellen mesenchymalen Ursprungs, somit auch Fibroblasten (Abb.33 A+B). Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion der Fläche der α -SMA-positiven Zellen in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen nach I/R detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass weniger Myofibroblasten in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen vorhanden waren und es vielleicht ein Aktivierungsdefizit der Fibroblasten in Abwesenheit der HAS2 geben könnte (Abb. 33 A+C).

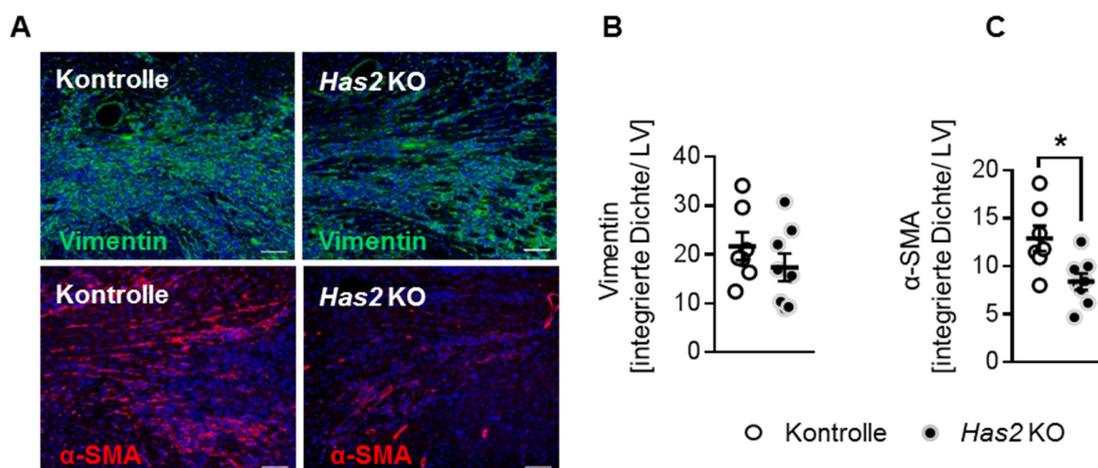


Abbildung 33: Immunhistochemische Untersuchung der Fibroblasten 72 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe. **A**, repräsentative Bilder der Vimentin und α -SMA angefärbten Herzschnitte aus *Has2*-defizienten Mäusen (*Has2* KO) sowie ihren Kontrollen, **B**, Quantifizierung von Vimentin im gesamten linken Ventrikel (LV) und **C**, Quantifizierung von α -SMA im gesamten LV mittels integrierter Dichtemessung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 7-8. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, * $p < 0,05$.

In der Durchflusszytometrie konnte ein weiterer Fibroblastenmarker verwendet werden, um die Fibroblastenantwort nach Infarkt zwischen den beiden Genotypen zu untersuchen. MEFSK4 wurde 2016 von Pinto und Kollegen als möglicher Fibroblasten-Marker charakterisiert. Zwar gibt es auch eine Subpopulation der myeloiden Zellen, die MEFSK4 exprimieren¹⁵⁹, diese wurden bei der Analyse aber zuvor schon über *Gating*strategie ausgeschlossen (siehe Appendix 2). 72 h nach I/R waren in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen gleich viele MEFSK4⁺ Fibroblasten im Herzgewebe zu finden (Abb. 34 A+B). Somit konnten sowohl mittels Immunhistochemie als auch Durchflusszytometrie kein Unterschied bezogen auf die Fibroblastenanreicherung 72 h nach Infarkt gezeigt werden. In der gleichen Untersuchung wurde auch überprüft, ob die MEFSK4⁺ Fibroblasten, ebenso wie die Makrophagen in den *Has2*-defizienten Mäusen, vermehrt apoptotisch sind, da HA wichtige antiapoptotische Eigenschaften auf diverse Zelltypen haben kann. Hier konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Genotypen mittels Annexin V Bindung festgestellt werden (Abb. 34C).

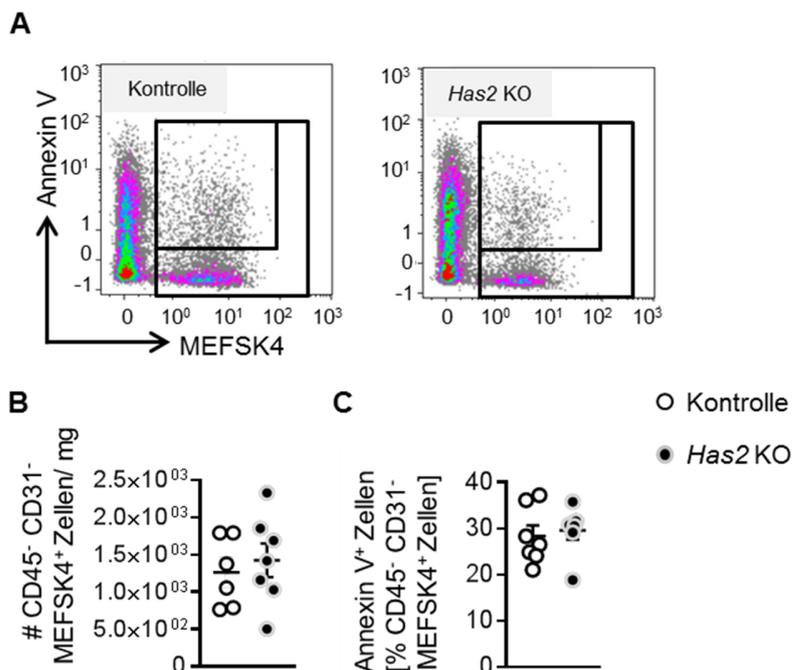


Abbildung 34: MEFSK4⁺ Fibroblasten und deren Apoptose im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt. **A**, repräsentative durchflusszytometrische Plots der MEFSK4⁺ Fibroblasten sowie der Annexin V⁺ MEFSK4⁺ Fibroblasten *Has2*-defizienter Mäuse (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der MEFSK4⁺ Fibroblasten (CD45⁻ CD31⁻ MEFSK4⁺), angegeben als Anzahl der definierten Zellen pro mg Herzgewebe. **C**, Quantifizierung der Annexin V⁺ MEFSK4⁺ Fibroblasten bezogen auf die Gesamtzahl der MEFSK4⁺ Fibroblasten pro mg Herzgewebe des jeweiligen Tiers. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 6-7.

Daraus konnte geschlossen werden, dass die HAS2-generierte HA das Überleben von Makrophagen zu fördern vermag, aber keinen Einfluss auf das Überleben der Fibroblasten nach I/R zu haben scheint. Die Beobachtung der gleichen Apoptoserate der MEFSK4⁺ Fibroblasten festigte auch die Hypothese, dass die verminderte Fläche an α -SMA in den *Has2*-defizienten Mäusen eher auf einer verminderten Aktivierung basierte. Mittels Ki67 Färbung der MEFSK4⁺ Fibroblasten wurde des Weiteren geprüft, ob die Proliferation in den MEFSK⁺ Fibroblasten verändert war. Dort konnte ein signifikanter Unterschied in der Ki67⁺ MEFSK4⁺ Fraktion, bezogen auf alle MEFSK4⁺ Fibroblasten, festgestellt werden (Abb. 35).

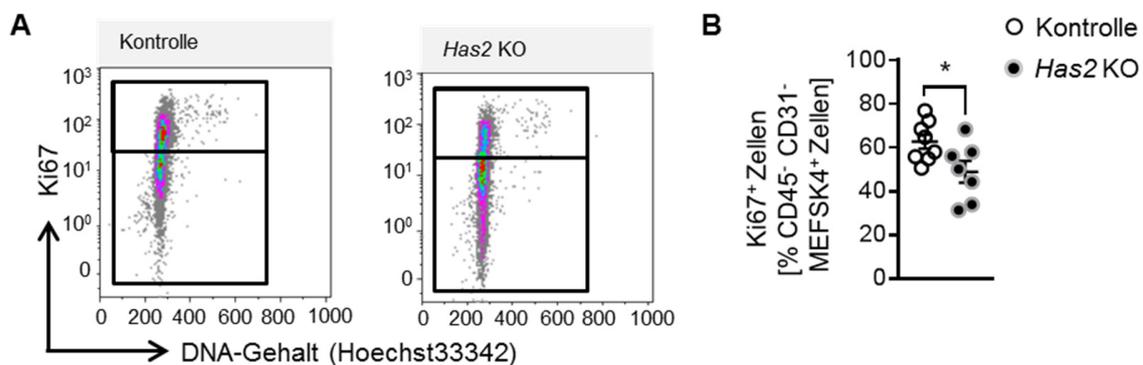


Abbildung 35: Proliferation der MEFSK4⁺ Fibroblasten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.

A, repräsentative durchflusszytometrische Plots der MEFSK4⁺ Fibroblasten sowie der Ki67⁺ MEFSK4⁺ Fibroblasten *Has2*-defizienter Mäuse (*Has2* KO) sowie der dazugehörigen Kontrolle. **B**, Quantifizierung der Ki67⁺ MEFSK4⁺ Fibroblasten bezogen auf die Gesamtzahl der MEFSK4⁺ Fibroblasten pro mg Herzgewebe des jeweiligen Tiers. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 7-8. Die Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet, * $p < 0,05$.

3.4 Untersuchung der Fibroblastenaktivierung *in vitro*

Aufgrund der *in vivo* beobachteten Reduktion der Expression von α -SMA-positiven Fibroblasten in den *Has2*-defizienten Mäusen, wurde im Folgenden *in vitro* untersucht, ob die *Acta2* mRNA Expression in kardialen Fibroblasten HA-abhängig reguliert ist. Dazu wurden mittels retrograder Perfusion isolierte kardiale Fibroblasten in Passage 1 mit TGF- β 1 stimuliert und mittels quantitativer *real-time* PCR die mRNA Expression von *Acta2* ermittelt. TGF- β 1 stimuliert die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten^{75, 160}. Es konnte gezeigt werden, dass in mit 4-MU behandelten Fibroblasten die TGF- β 1-induzierte Induktion von *Acta2* inhibiert war (Abb. 36A). Dies bestätigte den *in vivo* beobachteten Effekt, dass nach I/R in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen bei gleicher Menge an Vimentin-positiven Zellen weniger α -SMA-positive Fibroblasten nachgewiesen werden konnten (Abb. 33). Interessanterweise war ebenfalls die verminderte Reaktion der Fibroblasten auf TGF- β 1 in mit Anti-CD44 Antikörper (KM201) behandelten Fibroblasten im Vergleich zur Isotypkontrolle zu erkennen (Abb. 36B).

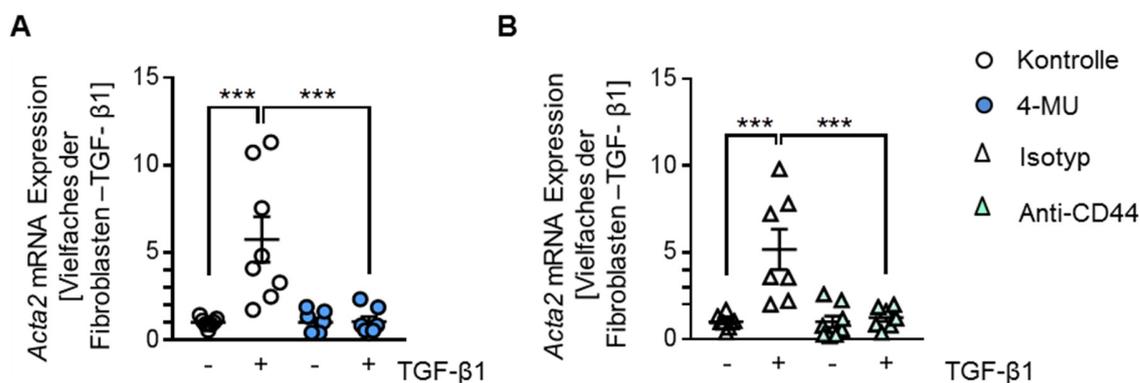


Abbildung 36: Kardiale Fibroblasten und ihre Antwort auf TGF- β 1. Kardiale Fibroblasten aus C57BL/6J Mäusen wurden mittels retrograder Perfusion isoliert und die mRNA Expression für *Acta2* nach 72-stündiger Stimulation mit und ohne TGF- β 1 (10 ng/ml) in der Anwesenheit von **A**, 4-MU (100 μ M), und **B**, Anti-CD44 Antikörper (KM201, 10 μ g/ml) oder Isotypkontrolle (IgG1 κ , 10 μ g/ml) analysiert. TGF- β 1: *Transforming growth factor beta 1*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n = 7-9. Die Signifikanzen wurden mit der *One-way ANOVA* und anschließendem *Tukey's multiple comparison test* ermittelt, *** $p < 0,001$.

Abschließend konnte also geschlussfolgert werden, dass neben der Makrophagenantwort auch die Fibroblastenaktivierung in der Abwesenheit von HAS2-generierter HA reduziert ist.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Has2*-defiziente Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen eine deutlich verschlechterte kardiale Funktion nach I/R aufweisen. Die kardiale Dysfunktion könnten durch eine reduzierte Anzahl der Makrophagen 72 h nach Infarkt zustande gekommen sein. Die signifikante Reduktion der Makrophagen (Abb. 9, 11 + 12) ist begründet durch eine erhöhte Apoptose. Dies konnte sowohl *in vitro* (Abb. 26) als auch *in vivo* (Abb. 32) ermittelt werden. Weitere Immunzellen waren zwischen den Genotypen weitestgehend nicht verändert und weitere Organe - außer dem Herz - wie Milz (Abb. 14), Knochenmark (Abb. 15) und die Immunzellen der Zirkulation (Abb. 17+18) waren von einer veränderten Immunantwort nach I/R nicht betroffen. Neben den Makrophagen zeigte sich in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen auch eine signifikant reduzierte Aktivierung von Fibroblasten (Abb. 33), welche zusätzlich *in vitro* mittels *Acta2* mRNA Expression der kardialen Fibroblasten nach TGF- β 1 Behandlung bestätigt werden konnte und womöglich über die HA-CD44 Achse vermittelt wird (Abb. 37). Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die HAS2-generierte HA-Matrix relevant für sowohl das Makrophagenüberleben als auch die Fibroblastenaktivierung im Heilungsprozess nach MI ist.

4. Diskussion

Wie in der Einleitung erwähnt, zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Trotz intensiver Bemühungen sind die therapeutischen Optionen noch nicht zufriedenstellend. Das Risiko für das Auftreten von weiteren kardiovaskulären Ereignissen, wie auch einem weiteren MI, ist insbesondere im ersten Jahr nach einem MI sehr hoch. Es wurde, insbesondere bei Patienten mit zusätzlichen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, ein deutlich höheres Risiko beobachtet¹⁶¹. Neben Langzeit-therapeutischen Konzepten wird den Patienten nach MI empfohlen den Lebensstil zu optimieren: Raucher sollten aufhören zu rauchen, die Ernährung sollte angepasst werden, eine trainingsbasierte-kardiologische Rehabilitation sollte stattfinden¹⁶². Langzeit-therapeutisch wird Aspirin zeitlich unbegrenzt eingesetzt¹⁶³ und bis zu 12 Monate wird eine duale Anti-Plättchen Therapie mit einem P2Y12-Inhibitor angewendet¹⁶². Ein weiterer vielversprechender Kandidat in der Therapie ist Rivaroxaban (ein Faktor Xa-Hemmer der direkten oralen Antikoagulanzen)¹⁶⁴. Bezüglich weiterer therapeutischer Konzepte wären prinzipiell entzündungshemmende Substanzen interessant. Dort wurden bisher allerdings Schwierigkeiten deutlich. Eine unspezifische entzündungshemmende Therapie mit Glukokortikoiden und höher dosierten Cyclooxygenasehemmern ist bereits fehlgeschlagen, da diese die Narbenbildung beeinträchtigten und nachteiliges *Remodeling* verstärkt hatten¹⁶⁵. Im Rahmen der Atherosklerose und somit der Prävention des MIs hingegen wurde in Bezug der entzündungshemmende Therapie mit Canakinumap – ein gegen IL-1 β gerichtete monoklonale Antikörper – 2017 eine erfolgreiche Substanz eingeführt. In der *Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study* (CANTOS) Studie reduzierte Canakinumab das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen bei Probanden mit kardiovaskulärem Risiko um 15 Prozent¹⁶⁶. Ein Grund für die Schwierigkeit der Entwicklung von entzündungshemmenden therapeutischen Konzepte nach MI könnten die komplexen Phasen der Inflammation darstellen und des Weiteren daran liegen, dass verschiedene Immunmediatoren (wie z.B. IL-6³⁴) teilweise verschiedene oder sogar gegensätzlich Effekte aufweisen können¹⁶⁷. Inwiefern die Anreicherung von HA ein interessantes therapeutisches Ziel nach MI sein kann, werden weitere Studien belegen müssen. Diese Arbeit gibt erste Hinweise, dass die Akkumulation von HA wichtig für die genaue Abstimmung von Makrophagen und Fibroblasten im Prozess des *Remodelings* nach MI sein könnte.

4.1 HAS2 und kardiale Funktion nach Myokardinfarkt

Es wurde einleitend gezeigt, dass in C57BL/6J Mäusen nach I/R die *Has1* und *Has2* mRNA Expression hochreguliert ist (Abb. 5). In Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit Professor Dr. Ulrich Flögel wurde dies im Folgenden ergänzend analysiert. Dort konnte mittels *chemical exchange saturation transfer* (CEST) Messung gezeigt werden, dass es bereits 24 h nach I/R in den Kontrollmäusen der Studie zu einer starken HA-Akkumulation im Herzen nach I/R kommt. Die HA-Akkumulation war in den *Has2*-defizienten Mäusen signifikant reduziert und ebenfalls reduziert in C57BL/6J Mäusen unter 4-MU Behandlung (Daten nicht gezeigt). Wenn die HA-Akkumulation durch die genetische Defizienz der *Has2* reduziert war, wurde die hämodynamische Dysfunktion nach I/R in den *Has2*-defizienten Tieren im Vergleich zu den Kontrollmäusen deutlich verschlechtert (Abb. 6). Ebenso war die EF in C57BL/6J Mäusen unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wird durch Literatur aus dem Schweinemodell unterstützt. Dort verbesserte das Implantieren von HA-haltigen Hydrogelen nach Infarkt die kardiale Funktion in Schweinen¹³⁷. Neben den mittels Echokardiographie ermittelten hämodynamischen Daten zur kardialen Funktion, wurde in weiterer Kooperation mit Professor Dr. Ulrich Flögel eine MRT Messung vorgenommen. Dort konnte die kardiale Dysfunktion der *Has2*-defizienten Mäuse entsprechend der echokardiographischen Daten verifiziert werden. Des Weiteren wurde mit Hilfe von *late gadolinium enhancement* (LGE) 24 h nach Infarkt das ischämische Areal bestimmt^{168, 169}. Das ischämische Areal war in den Mäusen der beiden Genotypen zu diesem Zeitpunkt noch unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Maladaptation der *Has2*-defizienten Mäuse sich erst im Prozess des *Remodelings* entwickelt hat. Unterstützt wurde die Observation des dilatierten Phänotyps der *Has2*-defizienten Mäuse im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit. Dort konnte gezeigt werden, dass die Narbe drei Wochen nach I/R dilatierter war (Daten nicht gezeigt). Dies geht mit einer Arbeit von 2007 einher: Dort wurde gezeigt, dass *Cd44*-defiziente Mäuse nach I/R ebenfalls deutlich dilatiertere Herzen aufwiesen¹²¹. Die dilatierten Herzen der *Has2*-defizienten Mäuse wurden in Kooperation mit Professor Dr. Martina Krüger und Dr. Sebastian Kötter auf die *tension to rupture* untersucht¹⁷⁰. In diesem Versuch wurde ein Trend zur leichteren Ruptur bei weniger angelegter Spannung in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle gemessen, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Dies geht mit unseren Beobachtungen einher. Es konnten keine Rupturen innerhalb der Heilungsphase nach I/R beobachtet werden. Dabei sollte an dieser Stelle auf das verwendete Modell der I/R hingewiesen werden, denn Rupturen sind vermehrt

im Modell der permanenten Ligatur bei Mäusen zu beobachten¹⁷¹. Im Zusammenhang mit einer anderen EZM-Komponente, dem *small leucine-rich repeat* Proteoglykan Biglykan (BGN), konnte unsere Arbeitsgruppe in einer Studie mit *Bgn*-defizienten Mäusen nach permanenter Ligatur zeigen, dass BGN für die stabile Kollagenmatrixbildung der Narbe und zur Erhaltung der kardialen hämodynamischen Funktion benötigt wird¹⁷². Dies verdeutlicht, dass das sinnvolle Sezernieren der Fibroblasten/Myofibroblasten von verschiedenen EZM-Komponenten im Zusammenspiel zu einer guten Narbenbildung beiträgt. Mit Hilfe des *in vitro* Versuchs der HA Produktion der verschiedenen Zelltypen (Abb. 23), konnte außerdem gezeigt werden, dass neben Fibroblasten womöglich auch Monozyten zu einem HA-reichen Mikromileu beitragen.

Des Weiteren wurde in Kooperation mit Professor Dr. Axel Gödecke und Dr. Dr. André Heinen gezeigt, dass keine funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in Langendorff-isolierten-Herzen, innerhalb der Reperfusionphase von einer Stunde, vorhanden waren. Die daraufhin durchgeführte Triphenyltetrazoliumchlorid Färbung wies ebenfalls keine Unterschiede in der Infarktgröße auf (Daten nicht gezeigt). Daraus konnte geschlossen werden, dass die *Has2*-Defizienz *ex vivo* keine starken akuten Effekte auf z.B. den Kardiomyozytenuntergang auslöst. Dieses Ergebnis lässt daher vermuten, dass die HAS2 erst in der Interaktion von Immunzellen und Fibroblasten wichtige Effekte vermittelt. Aufgrund der sowohl funktionellen als auch strukturellen Beobachtungen in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihrer Kontrolle, wurden die dahinterstehenden Prozesse untersucht. Das HA-reiche Mikromileu beeinflusst vermutlich insbesondere die Interaktion von Immunzellen⁴⁷ und den kardialen Fibroblasten¹⁷³ und könnte damit wichtiger Teil des komplexen endogenen Reparaturmechanismus nach I/R sein. In anderen entzündlichen Erkrankungen einschließlich Fibrose wurde gezeigt, dass Fibroblasten in der Lage sind, die Aktivierung verschiedener Immunzellen zu modulieren, die an fibrotischen Erkrankungen beteiligt sind. Darüber hinaus waren interstitielle Fibroblasten in der Lage ihr Verhalten innerhalb der interstitiellen Umgebung über die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zu regulieren¹⁷⁴.

4.2 HAS2 und Inflammation nach Myokardinfarkt

Im Folgenden wurde die Immunantwort untersucht und es wurde gezeigt, dass HAS2 die Makrophagenantwort essentiell zu regulieren vermag. Die in *Has2*-defizienten Mäusen beeinträchtigte Makrophagenantwort trägt somit womöglich zu dem verschlechterten Phänotyp nach I/R bei. Die Observation einer verminderten Makrophagenantwort bei Reduktion von HA, deckt sich mit der Literatur, in welcher der Zusammenhang von HA und der Immunantwort bereits untersucht wurde. Einige Untersuchungen sind in unserer Arbeitsgruppe oder in Kooperationen entstanden und von Grandoch *et al.* 2018 zusammengefasst worden¹⁷⁵. Die *Has3*-Defizienz hemmte in einem Mausmodell der Atherosklerose die Makrophageninfiltration¹¹⁷. Jiang *et al.* zeigten 2005, dass die Interaktion von HA mit TLR2 und TLR4 im Rahmen einer akuten Lungenverletzung die Initiation der Inflammation begünstigt¹¹¹. Liang *et al.* konnten 2016 zusätzlich nachweisen, dass Interaktion HA und TLR4 auf bestimmten Lungenepithelzellen auch von essentieller Bedeutung für die Reparatur von Lungenverletzungen und der Begrenzung des Ausmaßes der Fibrose sind¹⁷⁶.

4.2.1 Die detaillierte Charakterisierung der Immunantwort

Die beobachtete veränderte Makrophagenantwort in *Has2*-defizienten Mäusen nach I/R war sehr spezifisch für die kardialen Immunzellen, da in allen anderen Kompartimenten, wie dem Knochenmark (Abb. 15), der Milz (Abb. 14) und dem Blut (Abb. 17 + 18) keine Veränderung in Anzahl und Verteilung von Immunzell-Populationen beobachtet werden konnten. CC-Liganden und CC-Rezeptoren sind nach Infarkt maßgeblich an der Rekrutierung der zirkulierenden Immunzellen beteiligt. Aus diesem Grund wurden die zirkulierenden CC-Liganden gemeinsam mit weiteren Zyto-/Chemokinen im Plasma der *Has2*-defizienten Tiere 72 h nach I/R mittels eines *Multiplex*-Assay untersucht.

Im Plasma, welches sowohl lokale als auch systemische Reaktionen widerspiegeln kann, wurden Unterschiede zwischen *Has2*-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen detektiert. Dort waren 72 h nach I/R CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und IL-13 reduziert (Abb. 16). Die Abwesenheit von IL-13 verschlechterte in einer Studie die Herzfunktion nach Infarkt, in dem es die anti-inflammatorische Makrophagenantwort verminderte¹⁷⁷ und auch die Inhibition von MCP-1 war trotz der initialen Reduktion der Immunantwort als nachteilhaft für den späteren Inflammationsverlauf beschrieben worden. MCP-1-defiziente Mäuse wiesen in dieser Studie im Herzen eine verminderte mRNA-Expression der Zytokine *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Tgf- β 2 + 3* und *Il-10* auf und zeigten eine defekte Makrophagen-Differenzierung⁶⁰.

Anti-CCL5-Behandlung in einem murinen Modell der permanenten Ligatur der LAD reduzierte nachweislich die inflammatorische Antwort. Es wurden sowohl weniger neutrophile Granulozyten als auch Makrophagen rekrutiert. Dies ging einher mit einem reduziertem Serumlevel an CXCR1, CXCR2 und CCL2 und reduzierte die Infarktgröße nachweislich¹⁷⁸. Viele Publikationen, die die Immunzellrekrutierung /-infiltration der Atherosklerose betreffen, berichten ebenfalls von einer Reduktion der Immunzellen im atherosklerotischen Plaque nach Inhibitor oder genetischer Deletion von CCL5/CCR5¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Hingegen reduzierte CCL5/CCR5 in einer anderen Infarktstudie zwar die initiale Inflammationsreaktion und inhibierte nachteiliges *Remodeling* des Herzens, allerdings indem die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen (*Tregs*) dadurch gefördert wurde¹⁵⁵. Trotz der signifikanten Unterschiede von CCL5 im Plasma konnten in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen allerdings keine Unterschiede 72 h nach Infarkt in Bezug auf die Lymphozyten detektiert werden, sodass diese Studie nicht mit den Daten dieser Arbeit korrelierte (Abb. 13).

Der in den *Has2*-defizienten Herzen beobachtete Effekt, war zusätzlich auch sehr spezifisch für Herzmakrophagen, da infiltrierte Lymphozyten (s.o.), neutrophile Granulozyten (Abb. 22) und Monozyten (Abb. 10) unverändert waren. In dem in dieser Studie verwendeten I/R-Modell war der Großteil der Immunzellen im Herzen 72 h nach I/R bereits F4/80⁺ CD64⁺ (Makrophagen). Es befanden sich mehr als zehnmals so viele Makrophagen wie Monozyten im Gewebe. Dies entspricht z.T. nicht der Literatur, denn im Modell der permanenten Ligatur von Nahrendorf und Kollegen wurde die Kinetik der Immunzellen so beschrieben, dass 72 h nach MI ein Großteil der Immunzellen im Gewebe noch Monozyten sind. Die Erklärung für die Unterschiede zu diesem Zeitpunkt ist sehr wahrscheinlich Modell-spezifisch bedingt, denn ein Hauptunterschied zwischen den verschiedenen Modellen des MIs liegt in der zeitlichen und räumlichen Kinetik der Immunzellinfiltration¹⁷¹. Eine Publikation von 2013 unterstützt unsere Analysen: in einem I/R-Modell war dort die Anzahl der Makrophagen 72 h nach MI am höchsten, höher als die Anzahl der Monozyten zu dem Zeitpunkt¹⁸². Zusammen mit der Literatur bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Immunzell-Kinetik im murinen Modell zwischen I/R und permanenter Ligatur deutlich unterschiedlich ist.

12 h und 24 h nach I/R konnten noch keine Effekte der Immunzellen im Herzen der *Has2*-defizienten Mäuse detektiert werden. 24 h nach I/R war eventuell lediglich ein leichter Trend hin zu einer reduzierten Makrophagenantwort detektierbar, welcher womöglich auf den Effekt 72 h nach I/R bereits hindeutete. Die signifikant reduzierte Anzahl kardialer Makrophagen 72 h nach I/R war insbesondere durch eine verringerte Anzahl der aus Monozyten-differenzierten Makrophagen (MHCII^{high}CCR2⁺) charakterisiert, welche quantitativ den

Großteil der Makrophagen-Population 72 h nach I/R repräsentierten. Aber auch residente Makrophagen-Populationen waren reduziert. MHCII-exprimierende Makrophagen, entweder CCR2⁺ oder CCR2⁻, sind entscheidend für die Antigenpräsentation und Mediatoren der weiteren Inflammationsreaktion⁵¹. Aus diesem Grund wäre es in Zukunft sehr interessant zu sehen, wie sich die Immunantwort in den *Has2*-defizienten Mäusen zu späteren Zeitpunkten weiter fortsetzt. Es ist bereits bekannt, dass die adaptive Immunantwort zeitlich nach der angeborenen Immunantwort für den Heilungsprozess nach Infarkt relevant wird^{36, 183}. Die Interaktion der T-Zellen mit den gewebsständigen Makrophagen könnte daher womöglich auch beeinflusst sein. Insgesamt ist die Literatur bezüglich der Monozyten/Makrophagenantwort und der daraus resultierenden kardialen Funktion divers. In einem Review von 2010 von Nahrendorf *et al.*¹⁸⁴ wurde zusammengefasst, wie schwierig sich eine Intervention in das entzündliche Geschehen nach Infarkt gestaltet, da die ideale Heilung eine ausgeglichene Inflammationsreaktion erfordert. Einerseits werden Monozyten und Makrophagen benötigt, um nekrotisches Gewebe zu entfernen, Angiogenese auszulösen und Kollagensynthese zur Wundheilung durch Myofibroblasten zu initiieren, andererseits können Monozyten/Makrophagen MMPs, ROS und Zyto-/ Chemokine sezernieren und damit das Gewebe weiter schädigen und die Wundheilung aufhalten¹⁸⁴. Es sind über die letzten Jahrzehnte viele Studien publiziert, die zeigen, dass sowohl zu viel Inflammation, aber auch zu wenig Inflammation von Nachteil sein kann. Dabei werden die jeweiligen Aufgaben der Makrophagen-Populationen aktuell noch differenziert charakterisiert. Herzmakrophagen embryonalen Ursprungs sterben im ischämischen Areal kurz nach MI ab und sind dann nur noch vermehrt in Bereichen des gesunden Myokards zu finden^{57, 185}. Einhergehend damit wurde den residenten Makrophagen insbesondere eine reparative Funktion zugeschrieben. Neonatale murine Herzen rekrutieren nach Infarkt keine aus Monozyten-differenzierten Makrophagen, sondern Heilen durch Proliferation der residenten Makrophagen⁶¹. Wenn Makrophagen aber in neonateln Herzen depletiert werden, verschlechtert sich die regenerative Fähigkeit des neonateln Herzens stark⁶². Mechanistisch scheinen residente Makrophagen sich selbst durch Proliferation unabhängig vom Monozytenpool zu erneuern¹⁸⁶. Allerdings haben Li *et al.* auch kürzlich vorgeschlagen, dass es eine CCR2⁺ residente Makrophagen-Population gibt, welche an der initialen neutrophilen granulozytären Extravasation im Falle einer kardialen Ischämie beteiligt ist¹⁸⁷. Der Anteil der rekrutierten aus Monozyten-differenzierten Makrophagen ist akut nach Infarkt maßgeblich, gefolgt von steigender Proliferation in der chronischen Phase der Verletzung des Gewebes⁴⁷. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Ly6C^{high} CCR2⁺ Monozyten maßgeblich an der pro-

entzündlichen Antwort beteiligt sind, die aus Monozyten-entstandenen Makrophagen pro-entzündliches Potential haben und initial ein deutlich ähnlicheres Expressionsmuster zu den Monozyten aufweisen als die CCR2⁻ Makrophagen^{49, 61, 185, 188}, welche zusammen mit den Ly6C^{low} – aus Monozyten-differenzierten Makrophagen im weiteren Verlauf die Inflammation auflösen. Insbesondere die residenten Makrophagen sekretieren dann Wachstumsfaktoren wie VEGF sowie Matrixmoleküle und beeinflussen damit das kardiale Heilen deutlich^{51, 185, 189}. In dem Fall der *Has2*-defizienten Mäuse ist durch eine von Monozyten ausgelöste pro-entzündliche Phase zuerst nicht stark verändert und erst die aus Monozyten-differenzierten Makrophagen und residenten Makrophagen reduziert. So können womöglich vor allem sowohl Phagozytose als auch Einleitung des kardialen Heilens über u.a. TGF- β 1 nicht abgestimmt funktionieren.

4.2.2 Die möglichen Ursachen für die beobachtete Makrophagenreduktion im Herzen

Nach Beobachtung der reduzierten Anzahl von Makrophagen in den *Has2*-defizienten Mäusen, wurden die zugrundeliegenden Ursachen versucht zu identifizieren. Eine mögliche Hypothese war, dass die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen im Gewebe in Abwesenheit der HA gestört verläuft. Es ist bekannt, dass Veränderungen des Mikromilieus im Gewebe Einfluss auf die Differenzierung von Zellen haben können. So ist z.B. die HA-reiche Matrix in der Pathogenese von Gefäßserkrankungen ein kritischer Mediator, um die Stammzellendifferenzierung in Richtung einer vaskulären Linie zu lenken¹⁹⁰.

Ein wichtiger Mediator für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist M-CSF. Frangogiannis und Kollegen zeigten bereits 2003, dass die Hochregulation von M-CSF im infarzierten Herz eine wichtige Rolle im Heilungsprozess spielt. Neben Effekten auf die Makrophagendifferenzierung wurde hier auch eine Regulation der Chemokin-Expression der Endothelzellen unter M-CSF beobachtet¹⁵⁷. Es sind außerdem weitere Hinweise in der Literatur beschrieben, dass HA die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch den von TSG-6 vermittelten kovalenten Transfer von schweren I α I-Ketten auf HA beeinflussen könnte. TSG-6 beeinflusst so, ähnlich eines Matrix-Organisators, die Eigenschaften der Umgebung¹²². Mittels eines für diese Studie neu entwickelten *in vitro* Assays, in welchem die Differenzierung von Knochenmarksmonozyten mit M-CSF über eine Zeit von 48 h mittels Durchflusszytometrie analysiert werden konnte, wurde allerdings kein Unterschied in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in den *Has2*-defizienten

Zellen identifiziert (Abb. 25). Aus diesem Grund wurde die Hypothese der eingeschränkten Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen verworfen.

Weiterhin könnte eine reduzierte Zellproliferation ursächlich für die reduzierte Anzahl gewebständiger Makrophagen sein. Im Folgenden wurde daher die Monozyten- und Makrophagenproliferation mittels BrdU Injektion 24 h vor der Organentnahme der Mäuse untersucht. Das BrdU wurde dabei, während der 24 h bis zum Tod der Tiere für die Organentnahme, anstelle von Thymidin, während der S-Phase des Zellzykluses, in die DNA der Zellen eingebaut^{46, 54}. Es konnte mit Hilfe dieser Methode weder in den Monozyten noch in den Makrophagen ein Unterschied bezüglich der Proliferation detektiert werden. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass mittels Applikation 24 h vor der Organentnahme sowohl aus dem Blut rekrutierte als auch gewebständige proliferierende Zellen markiert werden. Dies wurde in verschiedenen Studien bereits untersucht. So konnte ohne Einfluss einer Verletzung in einer Studie gezeigt werden, dass in Mäusen, welche dreimal 2 mg BrdU (in 3 h Intervallen) appliziert bekamen und anschließend über einen Zeitraum von 5 Tagen auf das Vorhandensein von BrdU in der DNA der Monozyten untersucht wurden, bereits einen Tag nach der ersten BrdU-Injektion alle zirkulierenden Ly6C^{high}-Monozyten BrdU-positiv waren. Zu diesem Zeitpunkt hingegen waren annähernd keine Ly6C^{low}-Monozyten BrdU-positiv. Dies bedeutete, dass die Ly6C^{low}-Monozyten nicht kürzlich aus sich teilenden Vorläuferzellen entstanden waren. An Tag 5 jedoch waren alle Ly6C^{high}-Monozyten BrdU-negativ. Mittels einer Verlaufskurve der BrdU Expression in den Monozyten wurde so berechnet, dass Ly6C^{high}-Monozyten im basalen Zustand eine Halbwertszeit von etwa 20 h haben¹⁹¹. In einer weiteren Studie nach permanenter Ligatur in Mäusen wurde gezeigt, dass bei BrdU Applikation 12 h und 24 h vor der Organentnahme sowohl die Proliferation als auch die Rekrutierung der Monozyten detektiert wird. Da sich aber im Herzen sehr wenige Monozyten in der S oder G2 Phase befanden, wurde in dieser Arbeit von 2012 geschlossen, dass Proliferation von Monozyten nach permanenter Ligatur zu sehr geringem Maße stattfindet. Makrophagen wurden jedoch in dieser Studie nicht spezifisch untersucht⁵⁴. Jedoch wurde in anderen Studien beschrieben, dass Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten lokal stark proliferieren^{192, 193}. Aufgrund der ermittelten Halbwertszeit der Monozyten wäre die BrdU Inkorporation bei einer Injektion von 2 bis 4 h vor der Organentnahme eindeutiger der lokalen Proliferation zuzuordnen¹⁸⁸. Dadurch, dass in den Daten der *Has2*-defizienten Mäusen und den dazugehörigen Kontrollmäusen aber wiederum eine Normalisierung auf die entsprechend untersuchte Population stattgefunden hat, ist die Aussage über die Proliferation dennoch möglich.

Als ein weiterer möglicher Mechanismus, der für die Reduktion kardialer Makrophagen nach I/R in Betracht kommen könnte, wurde die Apoptose der Monozyten/Makrophagen untersucht. Dafür wurde die Fähigkeit von Annexin V Phosphatidylserin zu binden ausgenutzt. Phosphatidylserin befindet sich normalerweise im Inneren der Zellmembran und wird in apoptotischen Zellen externalisiert. Auf diese Weise konnte also mittels Annexin V Bindung gezeigt werden, dass die Apoptose kardialer Makrophagen nach I/R in *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollmäusen erhöht war (Abb. 32). Dieser Effekt war auch *in vitro* verifizierbar: sowohl in *Has2*-defizienten Knochenmarksmakrophagen als auch in aus C57BL/6J-generierten Knochenmarksmakrophagen, bei pharmakologischer Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU, war die Apoptose in aus Knochenmarksmonozyten-generierten Makrophagen deutlich gesteigert (Abb. 26 A+B). Diese Beobachtungen legen folglich anti-apoptotische Effekte einer HA-reichen Matrix nach Infarkt auf die Makrophagen nahe. Dies deckt sich mit in der Literatur beschriebenen *in vitro* Untersuchungen. Dort wurde gezeigt wurde, dass dermale Fibroblasten in Abwesenheit der *Has2* vermehrte Apoptose aufweisen¹⁹⁴. Auch die Blockierung des HA-Rezeptors CD44 zeigte ebenfalls einen Trend zum Anstieg der Apoptose in aus Knochenmarksmonozyten-generierten Makrophagen (Abb. 26C). Eine anti-apoptotische Wirkung von CD44 wurde ebenfalls bereits in anderen Studien in sowohl Fibroblasten als auch Krebszelllinien berichtet^{195, 196}.

Wie bereits diskutiert, war CCL5 im Plasma 72 h nach Infarkt reduziert. In der Literatur ist ein weiterer interessanter Zusammenhang zwischen CCL5 und der Makrophagenapoptose beschrieben: in einer viralen Atemwegsentszündung wurden Makrophagen in Abwesenheit von CCL5 apoptotisch und so konnte die virale Infektion der Atemwege nicht effizient bekämpft werden. Die reduzierten CCL5-Plasmawerte in den *Has2*-defizienten Mäusen deuten auf einen möglichen Zusammenhang zu dieser Studie hin¹⁹⁷. Der mögliche Zusammenhang von HA, CCL5 und der Makrophagenapoptose wurde in dieser Arbeit jedoch nicht als weiter untersucht.

In einer neuen Studie von 2018 wurde außerdem berichtet, dass alveolare Makrophagen CD44 stark exprimieren und HA permanent binden. In einem murinen Modell der Lungenentzündung wurden Monozyten in die Lunge rekrutiert und diese unterstützen bzw. ersetzen dort die residenten Lungenmakrophagen. Es wurde daraufhin gezeigt, dass rekrutierte, wildtypische zu Alveolarmakrophagen-differenzieren Makrophagen sowohl in der Homöostase als auch nach Inflammation im Vergleich zu *Cd44*-defizienten Alveolarmakrophagen einen Überlebensvorteil hatten. Dieser Effekt war sehr spezifisch für

die Makrophagen. Es wurden in dieser Studie keine Unterschiede bezogen auf die Apoptose in anderen Immunzellen wie den Monozyten unter *Cd44*-Defizienz detektiert¹⁹⁸. Dieser Artikel unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bei Betrachtung aller Ergebnisse konnte folglich auch eine Rolle für HA in der Begünstigung des Überlebens von kardialen Makrophagen gezeigt werden.

Eine frühere Studie zeigt allerdings, dass *Cd44*-defiziente Mäuse nach I/R, bei ähnlicher kardialer Dysfunktion wie *Has2*-defiziente Mäuse, eine verlängerte und verstärkte Inflamationsreaktion im Herzen aufweisen. Dies ist kontrovers zu der vorliegenden Arbeit. Diese Unterschiede könnten jedoch eventuell damit zusammenhängen, dass CD44 zwar ein wichtiger Rezeptor von HA nach Infarkt ist, jedoch zusätzlich weitere CD44-unabhängige Mechanismen beeinflusst sind, wie z.B. eine verminderte Aktivierung von RHAMM. Dies stellt eine wichtige Untersuchung für die Zukunft dar.

Die Interaktion von HA und den TLRs nach Infarkt ist grundsätzlich auch interessant. Jedoch würde die diese Interaktion von HA bei der mechanistischen Untersuchung der HAS2-vermittelten Effekte vermutlich eher irreführen, da sowohl *TLR2*- als auch *TLR4*-defiziente Mäuse nach Infarkt einen protektiven Phänotyp aufweisen^{26, 27}.

4.3 HAS2 und Fibroblasten nach Myokardinfarkt

Zusätzlich zu der verminderten Inflamationsreaktion weisen die Herzen der *Has2*-defizienten Mäuse deutlich reduzierte Menge an α -SMA-positiven Fibroblasten (Myofibroblasten) nach I/R auf (Abb. 33). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Lokalisation der α -SMA-positiven Fibroblasten weiter untersucht und es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der α -SMA-positiven Fibroblasten im Infarkt und in der *borderzone* vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Dadurch, dass die Vimentin-positiven Zellen unverändert waren (Abb. 33), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung der Fibroblasten unter *Has2*-Defizienz vermindert sein könnte. In weiteren *in vitro*-Studien bestätigte sich die verminderte Aktivierung der Fibroblasten bei Reduktion von HA mittels 4-MU auf TGF- β 1 (Abb. 36).

Es wurde neben der reduzierten Fibroblastenaktivierung in *Has2*-defizienten Mäusen so auch gezeigt, dass dieser Effekt womöglich auch funktionell zu einer relevanten Beeinträchtigung führt. *Has2*-defiziente Fibroblasten hatten nämlich nach TGF- β 1 Stimulation eine geringere Fähigkeit als Kontrollfibroblasten ein Kollagengel kontrahieren zu lassen (Daten nicht gezeigt). Die HA-abhängige Reaktion der Fibroblasten auf TGF- β 1 wurde unter anderem in dermalen Fibroblasten untersucht und bestätigt, nicht aber für orale Fibroblasten²⁰¹. Humane

Lungenfibroblasten wiesen bei Reduzierung der *Has2* mittels siRNA ebenfalls eine verminderte Reaktion auf TGF- β 1 auf¹²⁹. Somit stimmen diese Ergebnisse mit der Literatur überein.

Des Weiteren wurde die Proliferation der Fibroblasten durch FCS Stimulation der retrograden isolierten kardialen Fibroblasten *in vitro* ermittelt. *Has2*-defiziente Fibroblasten proliferierten mit steigender FCS-Konzentration nicht stärker, wohingegen Kontrollfibroblasten auf erhöhte FCS-Konzentration mit Proliferation reagierten (Daten nicht gezeigt). Der Effekt der verminderten Proliferation der *Has2*-defizienten Fibroblasten konnte mittels Durchflusszytometrie von Ki67 in MEFSK⁺ Fibroblasten unterstützt werden¹⁵⁹. Allerdings waren 72 h nach I/R die absoluten Zellzahlen der MEFSK⁺ Fibroblasten trotz deutlicher Reduktion der Proliferation der MEFSK⁺ Fibroblasten noch unverändert zwischen den beiden Genotypen (Abb. 35). Dies könnte damit erklärt werden, dass sich die Fibroblasten gerade erst am Anfang der Proliferationsphase befinden und sich Unterschiede in der absoluten Zellzahl erst nach einer bestimmten Zeit der Proliferation manifestieren werden. Diese Hypothese wurde noch nicht weiter untersucht: Zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. 5-7 Tage nach I/R) sollte die Anzahl der MEFSK⁺ Zellen erneut überprüft werden, um die Hypothese zu bestätigen. Der prozentuale Wert der proliferierenden Fibroblasten in dieser Arbeit deckt sich mit der Literatur. Fu *et al.* zeigten, dass etwa 60 % der Fibroblasten 72 h nach MI proliferativ sind⁷³. Ebenso wurde eine immunhistochemische Ki67 Färbung der α -SMA-positiven Fibroblasten durchgeführt. Dort konnte ein Trend zur Reduktion der Proliferation der α -SMA-positiven Fibroblasten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss von HA auf die Proliferation von Fibroblasten ist in der Literatur beschrieben worden^{130, 202}.

Die Ergebnisse legen also nahe, dass der Effekt der reduzierten α -SMA-positiven Fibroblasten in den *Has2*-defizienten Mäusen nicht auf eine erhöhte Apoptose der Fibroblasten zurückzuführen ist (Abb. 34), sondern auf eine verminderte Aktivierung und/oder Proliferation der Fibroblasten zurückzuführen ist.

Außerdem wurde durch Blockieren mittels Antikörpern gegen CD44 gezeigt, dass der HA-CD44-Signalweg für die defekte Myofibroblastenaktivierung verantwortlich zu sein scheint (Abb. 36). Diese Ergebnisse und Schlussfolgerungen stimmen mit Daten aus der Publikation der *Cd44*-defizienten Mäusen nach I/R vollständig überein: Dort konnte eine verminderte Fibroblastenaktivierung und eine verminderte Fibroblastenproliferation gezeigt werden¹²¹. In weiterer Übereinstimmung mit den Beobachtungen dieser Arbeit steht auch die Publikation aus unserer Arbeitsgruppe von 2014: Dort konnte gezeigt werden, dass IL-6 die HA-Synthese

in kardialen Fibroblasten induziert und dies wiederum aktivierte CD44 und führte zur Stimulation der weiteren Zytokinfreisetzung durch Fibroblasten¹³⁹.

4.4 Interaktion Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten

Zusätzlich legen die vorliegenden Ergebnisse auch einen einfachen, aber möglicherweise wichtigen Mechanismus nahe, der auf sich gegenseitig bedingenden Interaktionen zwischen Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen beruht. Es wurde gezeigt, dass Monozyten/Makrophagen die Differenzierung zu Myofibroblasten und *vice versa* stimulieren kardiale Fibroblasten den Übergang von Monozyten zu Makrophagen unterstützen (Abb. 27 + 28). Eine Studie von 2016 unterstützt die wichtige Interaktion von Monozyten und Fibroblasten: Dort wurden aus humanen Herz-Biopsien Fibroblasten isoliert. Diese wurden in einem Kollagengel gemeinsam mit humanen Monozyten kultiviert. Hier zeigte sich eine erhöhte Kapazität der Myofibroblasten das Kollagengel zusammenzuziehen, wenn diese gemeinsam mit Monozyten in dem Kollagengel inkubiert wurden. Zusätzlich konnte dort gezeigt werden, dass direkte Zell-Zellkontakte benötigt werden, um parakrine Faktoren wie TGF- β 1 zu sezernieren²⁰³. Durch die Ko-Kultur von Monozyten und adventitialen Fibroblasten aus der Aorta sekretierten die Zellen insbesondere MCP-1 und IL-6. Konditioniertes Medium dieser Ko-Kultur förderte im Folgenden die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und induzierte weitere MCP-1 Produktion. Daraus wurde geschlossen, dass die Interaktion der Fibroblasten mit Leukozyten die Inflammation weiter fördert²⁰⁴.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass kardiale Fibroblasten Makrophagen vor Apoptose schützen (Abb. 29). Dadurch können sich die beiden Haupteffekte in den *Has2*-defizienten Mäusen nach I/R, und zwar: die Reduktion der Makrophagenanzahl und die Reduktion der α -SMA-positiven Fibroblasten, sich gegenseitig verstärken und so die verminderte kardiale Funktion der *Has2*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bedingen.

4.5 Hyaluronsäure-Akkumulation

Aufgrund der Daten, dass *Has1*-defiziente Mäuse keinen kardialen Phänotyp nach I/R aufweisen (Daten nicht gezeigt), wäre es möglich, dass diese Mäuse eine so geringe Reduktion der HA auslösen, dass es funktionell irrelevant ist. Dies konnte in Kooperation mit Professor Dr. Ulrich Flögel mittels der CEST-Messung bestätigt werden. Dort wurde kein signifikanter Unterschied in der Menge an HA im Herzen in den *Has1*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen nachgewiesen. *Has2*-defiziente Mäuse wiesen hingegen, wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, mittels CEST-Messung eine deutlich signifikante Reduktion der HA auf (Daten nicht gezeigt). Immunhistochemisch konnte die Reduktion der Akkumulation der HA in *Has2*-defizienten Herzen mittels HABP-Färbung ebenfalls bestätigt werden (Abb. 7). Es kann angenommen werden, dass die HAS2 für den Großteil der kardialen HA-Synthese verantwortlich ist und Fibroblasten die größte Menge HA produzieren. Trotzdem können insbesondere Monozyten aber auch Makrophagen zu einem HA-reichen Mikromilieu nach Infarkt beitragen. *In vitro* sezernierten sie ebenfalls HA (Abb. 23).

Besonders interessant wäre die Identifizierung einer möglichen Verbesserung der kardialen Funktion nach I/R. Versuche mit *Hyal*-defizienten Mäusen haben bereits begonnen und des Weiteren soll in Zukunft eine Überexpressions-Maus der *Has2* untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und den weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an diesem Projekt könnte in Zukunft versucht werden, das HA-vermittelte *Remodeling* entweder durch Erhöhen der kardialen HAS oder durch Adressieren des HA-Rezeptor-Signalwegs therapeutisch zu verbessern. Insbesondere die nicht-invasive Visualisierung von HA mittels CEST-Messung könnte prognostisches Potential haben.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die zell-vermittelte HA-Synthese durch die HAS2 eine akute Reaktion auf die kardiale Ischämie ist, die für eine korrekte Makrophagen- und Fibroblastenantwort unerlässlich ist und daher für die Infarktheilung entscheidend ist (Abb. 39).

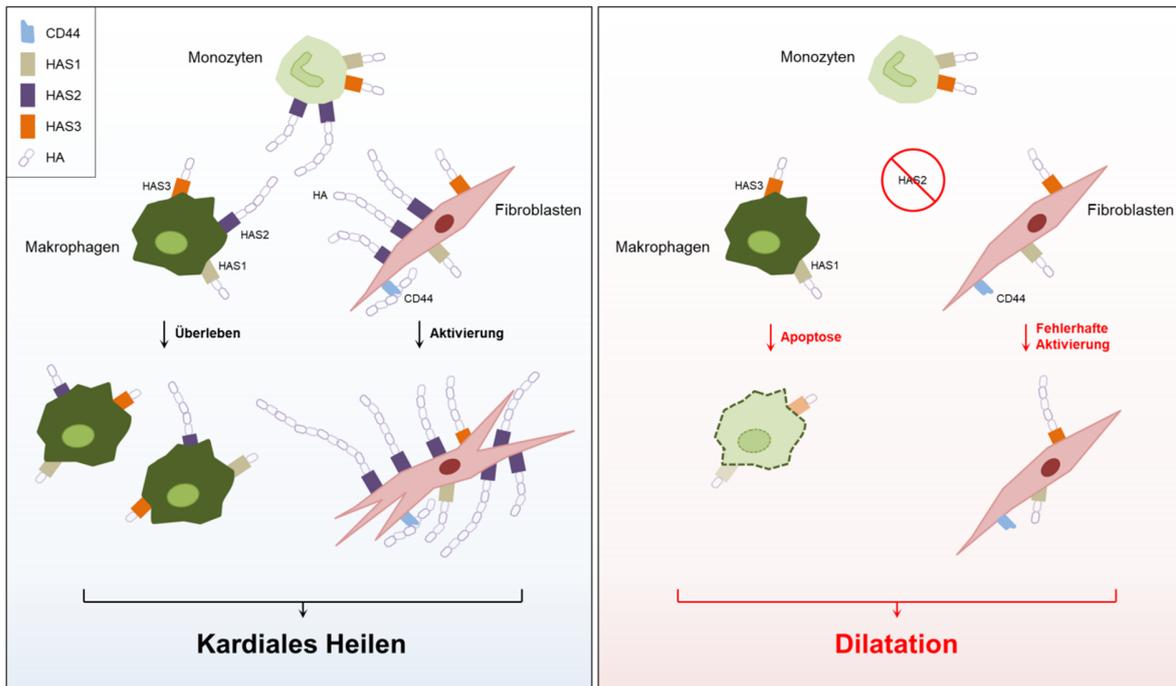


Abbildung 37: Übersicht der mechanistischen Hypothese der *Has2*-Defizienz nach Infarkt. Monozyten und Makrophagen interagieren mit Fibroblasten. Diese Interaktion fördert die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und führt zur Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (links). Wenn HAS2 fehlt, reduziert sich die Anzahl der Makrophagen durch erhöhte Apoptose. Der apoptotische Effekt ist einerseits selbstvermittelt, andererseits auch Fibroblasten-abhängig. Grund dafür ist die geringere Aktivierung der Myofibroblasten. Dies basiert vermutlich auf zwei Mechanismen: zum einen sind weniger Makrophagen anwesend, die die Fibroblasten aktivieren können, zum anderen reagieren die Fibroblasten ohne HAS2 auch vermindert über CD44- vermittelt auf den Stimulus TGF- β 1 (rechts).

4.6 Limitierung und Ausblick

Ein möglicher weiterer Mechanismus für die verminderte Makrophagenantwort in den *Has2*-defizienten Mäusen nach Infarkt könnte auch das Rekrutieren der Immunzellen zum Ort der Verletzung sein. Dies wurde in dieser Arbeit nicht intensiv untersucht. Es wurde lediglich die Expression von an der Rekrutierung beteiligten Chemokinrezeptoren (*Ccr2*, *Ccr5*, *Cx3cr1*) auf mRNA-Expressionsebene in basalen Monozyten untersucht (Abb. 24). Es ist durchaus möglich, dass die Zellen zwar unter basalen Bedingungen keine Effekte zeigen, diese während eines pathologischen Prozesses unterschiedlich moduliert werden. Es wäre daher auch interessant gewesen die untersuchten Chemokinrezeptoren auch unter Stimulation von LPS/ INF- γ zu untersuchen. Mögliche weitergehende Ansätze, um die Adhäsion der Leukozyten am Endothel näher zu untersuchen, wären z.B. ein *flow adhesion assay*. Dort werden Endothelzellen kultiviert und stimuliert und unter *shear stress* Leukozyten in einer speziellen Apparatur an den Endothelzellen vorbeigeführt. Die adhärenenten Leukozyten an den Endothelzellen können quantifiziert werden²⁰⁵. Eine noch komplexere Methode existiert auch *in vivo*: bei der sogenannten intravitalen Mikroskopie kann in Mäusen das Leukozyten-Rollen, die Rollgeschwindigkeit, die Adhäsion und die Migration visualisiert werden²⁰⁶. Allerdings wäre zu erwarten, dass die Monozyten in dem Fall der verminderten Adhäsion oder Rekrutierung ebenfalls reduziert wären. Dies konnte in den Herzen der *Has2*-defizienten Mäuse weder 24 h (Abb. 19) noch 72 h (Abb. 10) nach I/R beobachtet werden. Die gleiche Anzahl an Monozyten geht mit dem in dieser Studie beobachtetem Mechanismus der erhöhten Apoptose der Makrophagen einher, da die Monozyten nicht signifikant von der Apoptose betroffen waren (Daten nicht gezeigt).

Im Zusammenhang mit der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurde M-CSF im Plasma der Mäuse nachgewiesen (Abb. 25 A). Es wäre interessant gewesen, die M-CSF Konzentration im Gewebe zwischen den beiden Genotypen ebenfalls zu vergleichen. Dies konnte in dieser Arbeit bisher noch nicht durchgeführt werden. Des Weiteren könnten weitere lokale Unterschiede auf Genexpressionsebene das Inflammationsprofil ergänzen sowie in dem gleichen Experiment auch *myeloid epithelial reproductive tyrosine kinase* (MerTK) nachgewiesen werden könnte, welche ein relevanter Makrophagenenzym darstellt. In einer Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass MerTK das Überleben von Makrophagen fördert. In dieser Studie wurden Makrophagen oxidativem Stress ausgesetzt²⁰⁷. Interessanterweise zeigten *MerTK*-defiziente Mäuse größere Infarkte und eine verschlechterte kardiale Funktion nach I/R²⁰⁸.

Um jedoch zu untersuchen, ob Fibroblasten oder Makrophagen einen größeren Einfluss auf die kardiale HA-Produktion und die Apoptose der Makrophagen in den *Has2*-defizienten Mäusen nach I/R haben, sollte zum einen ein zelltyp-spezifisches Mausmodell verwendet werden. Genauer: die gefloxtete *Has2*-Maus sollte mit der Postn-Cre Maus⁸¹ gekreuzt und nach I/R untersucht werden. Zum anderen könnte ein Knochenmarktransfer Informationen darüber geben, ob die Makrophagen selbst für ihre Apoptose, unabhängig von den Fibroblasten, verantwortlich sind. Zusätzlich könnte in diesen Experimenten auch festgestellt werden, welcher Zelltyp den kardialen Phänotyp in den *Has2*-defizienten Mäusen nach I/R vermehrt vermittelt.

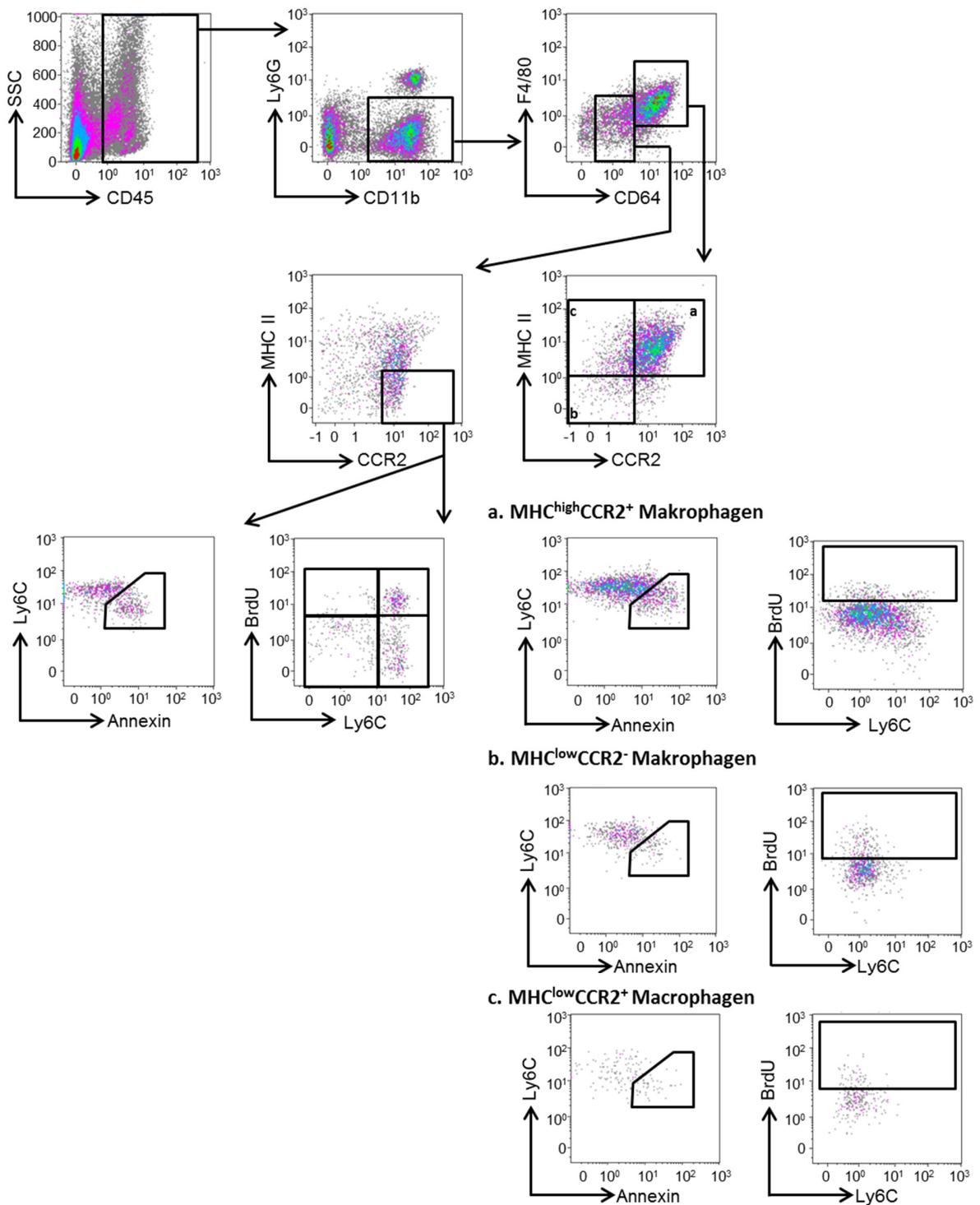
5. Zusammenfassung

De Novo-Synthese einer transienten Extrazellulären Matrix (EZM) nach akutem Myokardinfarkt (MI) kann den Heilungsprozess und das *Remodeling* stark beeinflussen. Insbesondere die Hyaluronsäure (HA) akkumuliert früh - deutlich früher als beispielsweise Kollagen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der frühen HA-reichen EZM nach MI zu untersuchen. Im Modell der genetischen Deletion der *Hyaluronsäuresynthase (Has) 2* wurde eine kardiale Ischämie und Reperfusion (I/R) bei geschlossenem Thorax an den Mäusen durchgeführt. *Has2*-defiziente Mäuse wiesen eine deutlich verschlechterte kardiale Funktion auf, was auf eine protektive Rolle für die endogene HA-Synthese nach MI hindeutete. Mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass in *Has2*-defizienten Mäusen die Anzahl kardialer Makrophagen nach I/R reduziert war. Im Gegensatz hierzu waren kardiale Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten nach I/R in den *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen unverändert. Immunzellen in weiteren Immunzellkompartimenten wie Milz, Knochenmark und Blut waren nicht beeinflusst von der *Has2*-Defizienz nach I/R. Mechanistisch führte die Hemmung der HA-Synthese durch *Has2*-Deletion zu einer erhöhten Makrophagen-Apoptose *in vivo* und *in vitro*. Die Proliferation der Makrophagen sowie die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen waren unverändert. Darüber hinaus waren α -SMA-positive Zellen in den Herzen der *Has2*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen reduziert. *In vitro* war die Fibroblastenaktivierung, ermittelt durch *Acta2*-mRNA-Expression, durch pharmakologische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU und Blockierung des CD44-Signalweges, reduziert. Außerdem waren die Fibroblasten von *Has2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Fibroblasten der Kontrollmäuse weniger proliferativ. Zuletzt wurde gezeigt, dass sich Monozyten/Makrophagen und kardiale Fibroblasten gegenseitig aktivieren und die Fibroblasten wiederum die Makrophagen vor apoptotischen Effekten schützen. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die HA-Synthese nach MI zur Heilung beiträgt, indem sie das Überleben von Makrophagen unterstützt und die Fibroblastenaktivierung fördert. Die Interaktion der beiden Zelltypen potenziert womöglich die beiden Effekte, so dass eine Reduktion der HA-Matrix durch *Has2*-Deletion zu einer schlechteren kardialen Funktion und einem dilatierten Phänotyp führte.

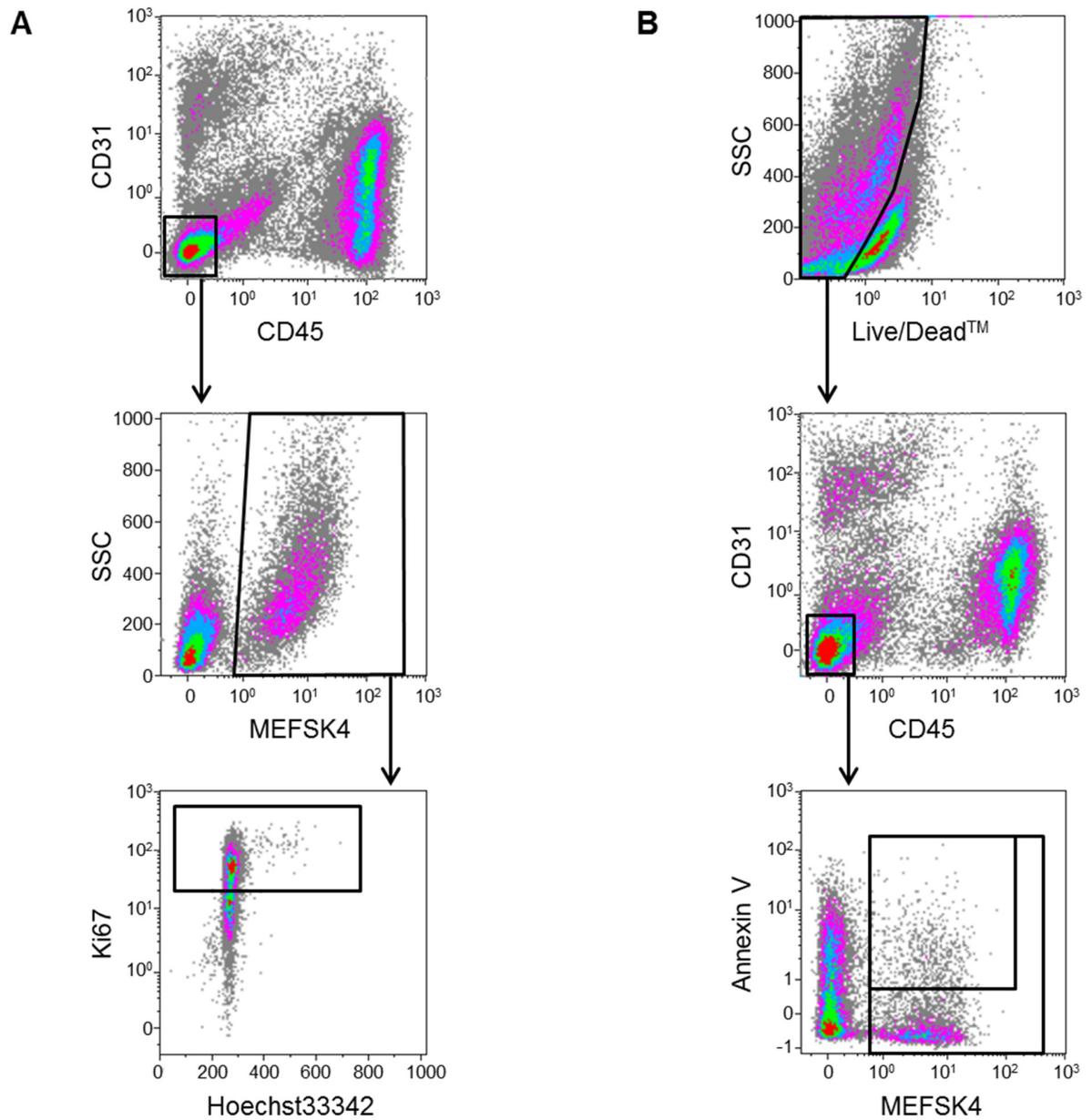
6. Summary

De *novo*-synthesis of a provisional ECM can greatly affect the healing process and remodeling after acute myocardial infarction. HA accumulates early post MI, earlier as e.g. collagen. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of early HA-rich ECM after myocardial infarction. For this purpose a murine model of the genetic deletion of *Has2* was used. The myocardial infarction was performed by operative intervention, more precisely a closed-chest I/R model. *Has2*-deficient mice showed impaired cardiac function, indicating a protective role for endogenous HA synthesis. Immunohistochemistry and flow cytometry showed that cardiac macrophages were reduced after I/R in *Has2*-deficient mice compared to control mice. In contrast to cardiac macrophages, cardiac Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes after I/R were unchanged in the *Has2*-deficient mice compared to control mice. Inflammatory cells in the other compartments like spleen, bone marrow and blood were not affected by *Has2* deficiency after I/R. Mechanistically, inhibition of HA synthesis by *Has2* led to increased macrophage apoptosis *in vivo* and *in vitro*. Macrophage proliferation and monocyte to macrophage differentiation were unchanged. In addition, α -SMA-positive cells were reduced in the hearts of the *Has2*-deficient mice compared to the control mice. *In vitro* fibroblast activation, as measured by *Acta2*-mRNA expression, was reduced by pharmacological inhibition of HA synthesis by 4-MU and blocking of the CD44-signaling. In addition, fibroblasts from *Has2*-deficient mice were less proliferative compared to the control murine fibroblasts. Finally, it has been shown that monocytes/macrophages and cardiac fibroblasts activate each other and the fibroblasts in turn protect the macrophages from apoptotic effects. In summary, HA-synthesis contributes to healing after MI by supporting the survival of macrophages and promoting fibroblast activation. The interaction of the two cell types might potentiate the two main effects and loss of HAS2-mediated HA leads to poor cardiac function and a dilative phenotype.

7. Appendix



Appendix 1: *Gatingschema* kardialer Immunzellen.



Appendix 2: Gatingschema kardialer Fibroblasten. A, Proliferation mittels Ki67 und **B,** Apoptose mittels Annexin V.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland (2016).....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Monozyten und Makrophagen im Herzen nach Infarkt.....	9
Abbildung 3: Modell der Stadien der kardialen Fibroblasten nach Infarkt.....	11
Abbildung 4: Chemische Struktur von Hyaluronsäure.....	13
Abbildung 5: Induktion des HA-Systems nach Infarkt.	19
Abbildung 6: Die kardiale Funktion der <i>Has2</i> -defizienten Mäuse und ihrer Kontrollen nach Infarkt.....	20
Abbildung 7: Untersuchung von HA mittels HABP im Herzgewebe nach Infarkt sowie der Konzentration von HA im Plasma.	38
Abbildung 8: Immunhistochemische Untersuchung der HA-Akkumulation und Lokalisation von Myofibroblasten und Makrophagen in der HA-Matrix 72 h nach Infarkt.	39
Abbildung 9: Immunhistochemische Untersuchung von Makrophagen und neutrophiler Granulozyten 72 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe.....	40
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der in das Herzgewebe infiltrierten Monozyten 72 Stunden nach Infarkt.....	41
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	42
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der residenten Makrophagen im 72 Stunden nach Infarkt.....	43
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	44
Abbildung 14: Leukozyten in der Milz 72 Stunden nach Infarkt.	45
Abbildung 15: Leukozyten im Knochenmark 72 Stunden nach Infarkt.	46
Abbildung 16: Zirkulierende Chemokine und Zytokine 72 Stunden nach Infarkt.....	47
Abbildung 17: Leukozyten in der Zirkulation 72 Stunden nach Infarkt.....	48
Abbildung 18: Ly6C ^{high} und Ly6C ^{low} Monozyten in der Zirkulation 72 Stunden nach Infarkt. ...	49
Abbildung 19: Monozyten 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe.	50
Abbildung 20: Makrophagen 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe.....	51
Abbildung 21: Neutrophile Granulozyten und Monozyten 12 und 24 Stunden nach Infarkt in der Zirkulation.....	52

Abbildung 22: Detektion neutrophiler Granulozyten 12 und 24 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe.	53
Abbildung 23: HA Produktion sowie Has mRNA Expression kardialer Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen.	55
Abbildung 24: Expression der Chemokinrezeptoren <i>Ccr2</i> , <i>Ccr5</i> und <i>Cx3cr1</i> auf M-CSF stimulierten Monozyten.	56
Abbildung 25: Zirkulierendes M-CSF 72 h nach Infarkt sowie Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen <i>in vitro</i>	57
Abbildung 26: Apoptose von Monozyten/Makrophagen während 24-stündiger Stimulation mit M-CSF.	58
Abbildung 27: Ko-Kultur von Knochenmarksmonozyten mit kardialen Fibroblasten.	60
Abbildung 28: Monozytendifferenzierung durch kardialen Fibroblasten.	61
Abbildung 29: Apoptose von Monozyten/Makrophagen in Ko-Kultur mit kardialen Fibroblasten.	62
Abbildung 30: Proliferation von infiltrierten Ly6C ^{high} und Ly6C ^{low} Monozyten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	63
Abbildung 31: Proliferation von Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	64
Abbildung 32: Apoptose von Makrophagen im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	65
Abbildung 33: Immunhistochemische Untersuchung der Fibroblasten 72 Stunden nach Infarkt im Herzgewebe.	66
Abbildung 34: MEFSK4+ Fibroblasten und deren Apoptose im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	67
Abbildung 35: Proliferation der MEFSK4+ Fibroblasten im Herzgewebe 72 Stunden nach Infarkt.	68
Abbildung 36: Kardiale Fibroblasten und ihre Antwort auf TGF- β 1.	69
Abbildung 37: Übersicht der mechanistischen Hypothese der <i>Has2</i> -Defizienz nach Infarkt.	84
Appendix 1: <i>Gatingschema</i> kardialer Immunzellen.	89
Appendix 2: <i>Gatingschema</i> kardialer Fibroblasten.	90

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen.....	26
Tabelle 2: Nicht kommerzielle Puffer für durchflusszytometrische Untersuchungen.....	27
Tabelle 3: Quantitative <i>realtime</i> -PCR Primersequenzen.....	29
Tabelle 4: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für immunhistochemische Färbungen.	32
Tabelle 5: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für immunzytochemische Färbungen.	34

10. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Stand: 09.2018).
2. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PW, Wolf PA, Levy D. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation*. 2006;113:791-798
3. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM. Lifetime risks of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2012;366:321-329
4. Statistisches Bundesamt. Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2016 (Stand: 02.2019).
5. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410-1422
6. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, Murray CJ, Naghavi M. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: The global burden of disease 2010 study. *Circulation*. 2014;129:1493-1501
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-1136
8. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H579-588
9. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, Price V, Tsagakis K, Neuhauser M, Peters J, Jakob H, Heusch G. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013;382:597-604
10. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R, Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of C. Postconditioning and protection from reperfusion injury: Where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the heart of the european society of cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010;87:406-423
11. Kloner RA. Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2013;113:451-463
12. Bonaca MP, Braunwald E, Sabatine MS. Long-term use of ticagrelor in patients with prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2015;373:1274-1275
13. Alpert JS. The fourth edition of the universal definition of myocardial infarction. *Am J Med*. 2018
14. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, Group ESCSD. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2018
15. Adams JE, 3rd, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS. Cardiac troponin i. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*. 1993;88:101-106
16. Hamm CW, Katus HA. New biochemical markers for myocardial cell injury. *Curr Opin Cardiol*. 1995;10:355-360
17. Tanaka H, Abe S, Yamashita T, Arima S, Saigo M, Nakao S, Toda H, Nomoto K, Tahara M. Serum levels of cardiac troponin i and troponin t in estimating myocardial infarct size soon after reperfusion. *Coron Artery Dis*. 1997;8:433-439

18. Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin i and t alterations in dog hearts with myocardial infarction: Correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol.* 1998;110:241-247
19. Mohammad MA, Koul S, Smith JG, Noc M, Lang I, Holzer M, Clemmensen P, Jensen U, Engstrom T, Arheden H, James S, Lindahl B, Metzler B, Erlinge D. Predictive value of high-sensitivity troponin t for systolic dysfunction and infarct size (six months) after st-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2018
20. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Writing Group on the Joint ESCAAHAWHFTFFtUDoMI, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasche P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Niemenen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S, Guidelines ESCCfP. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33:2551-2567
21. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 1990;82:112-12
22. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2001;104:253-256
23. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:206039
24. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: A novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81:28-37
25. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis. *Circ Res.* 2016;119:91-112
26. Sakata Y, Dong JW, Vallejo JG, Huang CH, Baker JS, Tracey KJ, Tacheuchi O, Akira S, Mann DL. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H503-509
27. Zhao P, Wang J, He L, Ma H, Zhang X, Zhu X, Dolence EK, Ren J, Li J. Deficiency in tlr4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1513-1525
28. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced cxc chemokine. *Circulation.* 2001;103:2296-2302
29. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed tnf-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998;98:699-710
30. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest.* 2017;127:1600-1612
31. Koyama T, Shimada M, Baba A, Kosugi R, Akaishi M. Effects of early reperfusion on creatine kinase release in patients with acute myocardial infarction: Implications for reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2012;155:335-337

32. Sharma V, Bell RM, Yellon DM. Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction: A review of reperfusion injury pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13:1153-1175
33. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1229-1235
34. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of il-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015;74:62-68
35. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94:1543-1553
36. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:117-129
37. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial icam-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood.* 1994;83:2669-2677
38. Shingu M, Nonaka S, Nishimukai H, Nobunaga M, Kitamura H, Tomo-Oka K. Activation of complement in normal serum by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-related oxygen radicals produced by activated neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1992;90:72-78
39. Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:339-362
40. McEver RP. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res.* 2015;107:331-339
41. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1993-2000
42. Monteiro Junior JGM, Torres DOC, da Silva M, Martins CMH, da Silva IK, do Nascimento MEM, Dos Santos ACO, Montarroyos UR, Filho DCS. Prognostic value of hematological parameters in patients with acute myocardial infarction: Intrahospital outcomes. *PLoS One.* 2018;13:e0194897
43. Ali M, Pulli B, Courties G, Tricot B, Sebas M, Iwamoto Y, Hilgendorf I, Schob S, Dong A, Zheng W, Skoura A, Kalgukar A, Cortes C, Ruggeri R, Swirski FK, Nahrendorf M, Buckbinder L, Chen JW. Myeloperoxidase inhibition improves ventricular function and remodeling after experimental myocardial infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1:633-643
44. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, Weber C, Soehnlein O, Steffens S. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J.* 2017;38:187-197
45. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:1066-1070
46. Sager HB, Heidt T, Hulsmans M, Dutta P, Courties G, Sebas M, Wojtkiewicz GR, Tricot B, Iwamoto Y, Sun Y, Weissleder R, Libby P, Swirski FK, Nahrendorf M. Targeting interleukin-1beta reduces leukocyte production after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2015;132:1880-1890
47. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, Sun Y, Iwamoto Y, Tricot B, Khan OF, Dahlman JE, Borodovsky A, Fitzgerald K, Anderson DG, Weissleder R, Libby P, Swirski FK, Nahrendorf M. Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure. *Circ Res.* 2016;119:853-864

48. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82
49. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037-3047
50. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74:2527-2534
51. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014;41:21-35
52. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor nr4a1 (nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of ly6c- monocytes. *Nat Immunol*. 2011;12:778-785
53. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Ly-6chigh monocytes depend on nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*. 2014;114:1611-1622
54. Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbатов R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, Sena B, Chudnovskiy A, Panizzi P, Keliher E, Higgins JM, Libby P, Moskowitz MA, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytogenesis. *J Exp Med*. 2012;209:123-137
55. Honold L, Nahrendorf M. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2018;122:113-127
56. Leuschner F, Panizzi P, Chico-Calero I, Lee WW, Ueno T, Cortez-Retamozo V, Waterman P, Gorbатов R, Marinelli B, Iwamoto Y, Chudnovskiy A, Figueiredo JL, Sosnovik DE, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;107:1364-1373
57. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325:612-616
58. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, Silberstein L, Heidt T, Sebas M, Sun Y, Wojtkiewicz G, Feruglio PF, King K, Baker JN, van der Laan AM, Borodovsky A, Fitzgerald K, Hulsmans M, Hoyer F, Iwamoto Y, Vinegoni C, Brown D, Di Carli M, Libby P, Hiebert SW, Scadden DT, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Myocardial infarction activates ccr2(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16:477-487
59. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor ccr2. *Nat Immunol*. 2006;7:311-317
60. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. Ccl2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005;96:881-889
61. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, Ornitz DM, Randolph GJ, Mann DL. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:16029-16034

62. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest*. 2014;124:1382-1392
63. Swirski FK, Robbins CS, Nahrendorf M. Development and function of arterial and cardiac macrophages. *Trends Immunol*. 2016;37:32-40
64. Hulsmans M, Sam F, Nahrendorf M. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;93:149-155
65. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*. 2007;170:818-829
66. Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res*. 2018;191:15-28
67. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. Vegf, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. 1996;270:H1803-1811
68. Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*. 2015;116:354-367
69. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guerin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, Dumeau E, Kotti S, Bruneval P, Charo IF, Binder CJ, Danchin N, Tedgui A, Tedder TF, Silvestre JS, Mallat Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013;19:1273-1280
70. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. Rag-1-deficient mice have no mature b and t lymphocytes. *Cell*. 1992;68:869-877
71. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine a2a receptor activation is due to its action on cd4+ t lymphocytes. *Circulation*. 2006;114:2056-2064
72. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of cd4+ t lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012;125:1652-1663
73. Fu X, Khalil H, Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD, Sargent MA, Prasad V, Valiente-Alandi I, Blaxall BC, Molkentin JD. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest*. 2018;128:2127-2143
74. Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, Uno Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res*. 1998;82:1130-1138
75. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (tgf-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30:293-298
76. Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, Frangogiannis NG. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;107:418-428
77. Woodall MC, Woodall BP, Gao E, Yuan A, Koch WJ. Cardiac fibroblast grk2 deletion enhances contractility and remodeling following ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2016;119:1116-1127
78. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:549-574
79. Ma Y, Iyer RP, Jung M, Czubryt MP, Lindsey ML. Cardiac fibroblast activation post-myocardial infarction: Current knowledge gaps. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38:448-458

80. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, Brody MJ, SC JL, Aronow BJ, Tallquist MD, Molckentin JD. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun.* 2016;7:12260
81. Kaur H, Takefuji M, Ngai CY, Carvalho J, Bayer J, Wietelmann A, Poetsch A, Hoelper S, Conway SJ, Mollmann H, Looso M, Troidl C, Offermanns S, Wettschureck N. Targeted ablation of periostin-expressing activated fibroblasts prevents adverse cardiac remodeling in mice. *Circ Res.* 2016;118:1906-1917
82. Hascall VC, Wang A, Tammi M, Oikari S, Tammi R, Passi A, Vigetti D, Hanson RW, Hart GW. The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of udp-glcna. *Matrix Biol.* 2014;35:14-17
83. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 1997;272:13997-14000
84. Hascall V, Esko JD. Hyaluronan. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, eds. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY); 2015:197-206.
85. Hunger J, Bernecker A, Bakker HJ, Bonn M, Richter RP. Hydration dynamics of hyaluronan and dextran. *Biophys J.* 2012;103:L10-12
86. Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology.* 2016;26:553-559
87. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242:27-33
88. Weigel PH, DeAngelis PL. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 2007;282:36777-36781
89. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999;274:25085-25092
90. Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, Tammi MI. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J.* 2011;278:1419-1428
91. Karousou E, Kamiryo M, Skandalis SS, Ruusala A, Asteriou T, Passi A, Yamashita H, Hellman U, Heldin CH, Heldin P. The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J Biol Chem.* 2010;285:23647-23654
92. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000;106:349-360
93. Kuipers HF, Nagy N, Ruppert SM, Sunkari VG, Marshall PL, Gebe JA, Ishak HD, Keswani SG, Bollyky J, Frymoyer AR, Wight TN, Steinman L, Bollyky PL. The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2016;185:372-381
94. Foster LC, Arkonac BM, Sibinga NE, Shi C, Perrella MA, Haber E. Regulation of cd44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:20341-20346
95. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. Cd44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990;61:1303-1313
96. McDonald B, Kubes P. Interactions between cd44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. *Front Immunol.* 2015;6:68
97. Zhang G, Zhang H, Liu Y, He Y, Wang W, Du Y, Yang C, Gao F. Cd44 clustering is involved in monocyte differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014;46:540-547

98. Khan AI, Kerfoot SM, Heit B, Liu L, Andonegui G, Ruffell B, Johnson P, Kubes P. Role of cd44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *J Immunol.* 2004;173:7594-7601
99. McDonald B, McAvoy EF, Lam F, Gill V, de la Motte C, Savani RC, Kubes P. Interaction of cd44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med.* 2008;205:915-927
100. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. Ha receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem.* 1996;61:569-577
101. Acharya S, Foletta VC, Lee JW, Rayborn ME, Rodriguez IR, Young WS, 3rd, Hollyfield JG. Spacrcan, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:6945-6955
102. Ishikawa M, Sawada Y, Yoshitomi T. Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. *Exp Eye Res.* 2015;133:3-18
103. Secundino I, Lizcano A, Roupe KM, Wang X, Cole JN, Olson J, Ali SR, Dahesh S, Amayreh LK, Henningham A, Varki A, Nizet V. Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation. *J Mol Med (Berl).* 2016;94:219-233
104. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (cd44, rhamm) regulate the activities of inflammation and cancer. *Front Immunol.* 2015;6:201
105. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015;42:11-55
106. Milner CM, Tongsoongnoen W, Rugg MS, Day AJ. The molecular basis of inter-alpha-inhibitor heavy chain transfer on to hyaluronan. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:672-676
107. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001;20:499-508
108. Bourguignon V, Flamion B. Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover. *FASEB J.* 2016;30:2108-2114
109. Hofinger ES, Hoehstetter J, Oetl M, Bernhardt G, Buschauer A. Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases. *Glycoconj J.* 2008;25:101-109
110. Chowdhury B, Hemming R, Hombach-Klonisch S, Flamion B, Triggs-Raine B. Murine hyaluronidase 2 deficiency results in extracellular hyaluronan accumulation and severe cardiopulmonary dysfunction. *J Biol Chem.* 2013;288:520-528
111. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005;11:1173-1179
112. Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.* 1985;44:817-822
113. Hallgren R, Samuelsson T, Laurent TC, Modig J. Accumulation of hyaluronan (hyaluronic acid) in the lung in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139:682-687
114. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1991;88:1622-1628
115. de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:Polycytidylic acid: Inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol.* 2003;163:121-133

116. Kessler S, Rho H, West G, Fiocchi C, Drazba J, de la Motte C. Hyaluronan (ha) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci.* 2008;1:57-61
117. Homann S, Grandoch M, Kiene LS, Podsvyadek Y, Feldmann K, Rabausch B, Nagy N, Lehr S, Kretschmer I, Oberhuber A, Bollyky P, Fischer JW. Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession. *Matrix Biol.* 2018;66:67-80
118. Kuipers HF, Rieck M, Gurevich I, Nagy N, Butte MJ, Negrin RS, Wight TN, Steinman L, Bollyky PL. Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive t-cell trafficking, activation, and th1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:1339-1344
119. Nagy N, Kaber G, Johnson PY, Gebe JA, Preisinger A, Falk BA, Sunkari VG, Gooden MD, Vernon RB, Bogdani M, Kuipers HF, Day AJ, Campbell DJ, Wight TN, Bollyky PL. Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis. *J Clin Invest.* 2015;125:3928-3940
120. Bollyky PL, Evanko SP, Wu RP, Potter-Perigo S, Long SA, Kinsella B, Reijonen H, Guebtner K, Teng B, Chan CK, Braun KR, Gebe JA, Nepom GT, Wight TN. Th1 cytokines promote t-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol.* 2010;7:211-220
121. Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, Haudek S, Thakker G, Frangogiannis NG. Cd44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol.* 2008;180:2625-2633
122. Chang MY, Chan CK, Braun KR, Green PS, O'Brien KD, Chait A, Day AJ, Wight TN. Monocyte-to-macrophage differentiation: Synthesis and secretion of a complex extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2012;287:14122-14135
123. Selbi W, de la Motte CA, Hascall VC, Day AJ, Bowen T, Phillips AO. Characterization of hyaluronan cable structure and function in renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2006;70:1287-1295
124. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:101
125. Xi W, Zhou Y, Lv S, Gao Q, Bu G, Wang Y, Cheng G, Xu G. Plasma hyaluronan and collateral development in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2010;21:228-232
126. Park D, Kim Y, Kim H, Kim K, Lee YS, Choe J, Hahn JH, Lee H, Jeon J, Choi C, Kim YM, Jeoung D. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing rhamm-tgfbeta receptor interaction via cd44-pkcdelta. *Mol Cells.* 2012;33:563-574
127. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: A potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:507-511
128. Nagy N, Freudenberg T, Melchior-Becker A, Rock K, Ter Braak M, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber AA, Sorgel F, Levkau B, Ergun S, Fischer JW. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: Novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation.* 2010;122:2313-2322
129. Webber J, Meran S, Steadman R, Phillips A. Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-beta1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2009;284:9083-9092
130. Meran S, Luo DD, Simpson R, Martin J, Wells A, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-dependent proliferation via cd44 and epidermal growth factor receptor interaction. *J Biol Chem.* 2011;286:17618-17630
131. Martin J, Midgley A, Meran S, Woods E, Bowen T, Phillips AO, Steadman R. Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (tsg-6)-mediated interactions with the inter-alpha-

- inhibitor heavy chain 5 facilitate tumor growth factor beta1 (tgfbeta1)-dependent fibroblast to myofibroblast differentiation. *J Biol Chem.* 2016;291:13789-13801
132. Ghatak S, Markwald RR, Hascall VC, Dowling W, Lottes RG, Baatz JE, Beeson G, Beeson CC, Perrella MA, Thannickal VJ, Misra S. Transforming growth factor beta1 (tgfbeta1) regulates cd44v6 expression and activity through extracellular signal-regulated kinase (erk)-induced egr1 in pulmonary fibrogenic fibroblasts. *J Biol Chem.* 2017;292:10465-10489
 133. Travis JA, Hughes MG, Wong JM, Wagner WD, Geary RL. Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: Role of cd44 and implications for constrictive remodeling. *Circ Res.* 2001;88:77-83
 134. Saxena A, Chen W, Su Y, Rai V, Uche OU, Li N, Frangogiannis NG. Il-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. *J Immunol.* 2013;191:4838-4848
 135. Meran S, Martin J, Luo DD, Steadman R, Phillips A. Interleukin-1beta induces hyaluronan and cd44-dependent cell protrusions that facilitate fibroblast-monocyte binding. *Am J Pathol.* 2013;182:2223-2240
 136. Missinato MA, Tobita K, Romano N, Carroll JA, Tsang M. Extracellular component hyaluronic acid and its receptor hmmer are required for epicardial emt during heart regeneration. *Cardiovasc Res.* 2015;107:487-498
 137. Dorsey SM, McGarvey JR, Wang H, Nikou A, Arama L, Koomalsingh KJ, Kondo N, Gorman JH, 3rd, Pilla JJ, Gorman RC, Wenk JF, Burdick JA. Mri evaluation of injectable hyaluronic acid-based hydrogel therapy to limit ventricular remodeling after myocardial infarction. *Biomaterials.* 2015;69:65-75
 138. Abdalla S, Makhoul G, Duong M, Chiu RC, Cecere R. Hyaluronic acid-based hydrogel induces neovascularization and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;17:767-772
 139. Muller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J, Fischer JW. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:440
 140. Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kuhn R, Schwenk F. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e12
 141. Matsumoto K, Li Y, Jakuba C, Sugiyama Y, Sayo T, Okuno M, Dealy CN, Toole BP, Takeda J, Yamaguchi Y, Kosher RA. Conditional inactivation of has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development.* 2009;136:2825-2835
 142. Chan DD, Xiao WF, Li J, de la Motte CA, Sandy JD, Plaas A. Deficiency of hyaluronan synthase 1 (has1) results in chronic joint inflammation and widespread intra-articular fibrosis in a murine model of knee joint cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23:1879-1889
 143. Gorressen S, Stern M, van de Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Rassaf T, Godecke A, Fischer JW, Heusch G, Merx MW, Kelm M. Circulating nos3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction. *PLoS One.* 2015;10:e0120961
 144. Merx MW, Gorressen S, van de Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Stern M, Rassaf T, Godecke A, Gladwin MT, Kelm M. Depletion of circulating blood nos3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:398
 145. Grandoch M, Feldmann K, Gothert JR, Dick LS, Homann S, Klatt C, Bayer JK, Waldheim JN, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Kohrer K, Lehr S,

- Homey B, Pfeffer K, Fischer JW. Deficiency in lymphotoxin beta receptor protects from atherosclerosis in apoe-deficient mice. *Circ Res.* 2015;116:e57-68
146. Vernon RB, Gooden MD. An improved method for the collagen gel contraction assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002;38:97-101
147. Kirk JA, Frangogiannis NG. Galectin-3 in the pathogenesis of heart failure: A causative mediator or simply a biomarker? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;314:H1256-H1258
148. Boag SE, Das R, Shmeleva EV, Bagnall A, Egred M, Howard N, Bennaceur K, Zaman A, Keavney B, Spyridopoulos I. T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia/reperfusion injury in patients. *J Clin Invest.* 2015;125:3063-3076
149. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for ccr2 and mcp-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117:902-909
150. Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, Landsman L, Cochain C, Silvestre JS, Mizrahi H, Faroja M, Strauss-Ayali D, Mack M, Jung S, Keshet E. On-site education of vegf-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *J Exp Med.* 2013;210:2611-2625
151. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204:1057-1069
152. Hoyer FF, Nahrendorf M. Neutrophil contributions to ischaemic heart disease. *Eur Heart J.* 2017;38:465-472
153. Schloss MJ, Hilby M, Nitz K, Guillamat Prats R, Ferraro B, Leoni G, Soehnlein O, Kessler T, He W, Luckow B, Horckmans M, Weber C, Duchene J, Steffens S. Ly6c(high) monocytes oscillate in the heart during homeostasis and after myocardial infarction-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:1640-1645
154. Zamilpa R, Kanakia R, Cigarroa Jt, Dai Q, Escobar GP, Martinez H, Jimenez F, Ahuja SS, Lindsey ML. Cc chemokine receptor 5 deletion impairs macrophage activation and induces adverse remodeling following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1418-1426
155. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Ccr5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory t cells. *Am J Pathol.* 2010;176:2177-2187
156. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor cx3cr1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530
157. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Ren G, Akrivakis S, Jackson PL, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Mcsf expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H483-492
158. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:504-511
159. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res.* 2016;118:400-409
160. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122:103-111

161. Jernberg T, Hasvold P, Henriksson M, Hjelm H, Thuresson M, Janzon M. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: Nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur Heart J*. 2015;36:1163-1170
162. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimsky P, Group ESCSD. 2017 esc guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with st-segment elevation: The task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with st-segment elevation of the european society of cardiology (esc). *Eur Heart J*. 2018;39:119-177
163. Antithrombotic Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncagliani MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: Collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373:1849-1860
164. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM, Investigators AAT. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366:9-19
165. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: A route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:133-144
166. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, Group CT. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119-1131
167. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: Learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res*. 2016;167:152-166
168. Fogel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2008;118:140-148
169. Haberkorn SM, Jacoby C, Ding Z, Keul P, Bonner F, Polzin A, Levkau B, Schrader J, Kelm M, Fogel U. Cardiovascular magnetic resonance relaxometry predicts regional functional outcome after experimental myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10
170. Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du XJ. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: Time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovasc Res*. 2005;65:469-477
171. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Jr., Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Schwartz Longacre L, Ripplinger CM, Van Eyk JE, Heusch G. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314:H812-H838
172. Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L, Lullmann-Rauch R, Lettau O, Jacoby C, Schrader J, Brand-Herrmann SM, Young MF, Schultheiss HP, Levkau B, Baba HA, Unger T, Zacharowski K, Tschope C, Fischer

- JW. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117:1269-1276
173. Dostal D, Glaser S, Baudino TA. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*. 2015;5:887-909
174. Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int*. 1998;54:2152-2159
175. Grandoch M, Bollyky PL, Fischer JW. Hyaluronan: A master switch between vascular homeostasis and inflammation. *Circ Res*. 2018;122:1341-1343
176. Liang J, Zhang Y, Xie T, Liu N, Chen H, Geng Y, Kurkciyan A, Mena JM, Stripp BR, Jiang D, Noble PW. Hyaluronan and tlr4 promote surfactant-protein-c-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice. *Nat Med*. 2016;22:1285-1293
177. Hofmann U, Knorr S, Vogel B, Weirather J, Frey A, Ertl G, Frantz S. Interleukin-13 deficiency aggravates healing and remodeling in male mice after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2014;7:822-830
178. Montecucco F, Braunersreuther V, Lenglet S, Delattre BM, Pelli G, Buatois V, Guilhot F, Galan K, Vuilleumier N, Ferlin W, Fischer N, Vallee JP, Kosco-Vilbois M, Mach F. Cc chemokine ccl5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice. *Eur Heart J*. 2012;33:1964-1974
179. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ ccr2, ccr5, and cx3cr1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-194
180. Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:373-379
181. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F. Antagonism of rantes receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. 2004;94:253-261
182. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;62:24-35
183. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory t cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:232
184. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:2437-2445
185. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, Epelman S, Kreisel D, Liu Y, Itoh A, Shankar TS, Selzman CH, Drakos SG, Lavine KJ. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med*. 2018;24:1234-1245
186. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, Garcia-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38:792-804
187. Li W, Hsiao HM, Higashikubo R, Saunders BT, Bharat A, Goldstein DR, Krupnick AS, Gelman AE, Lavine KJ, Kreisel D. Heart-resident ccr2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through tlr9/myd88/cxcl5 signaling. *JCI Insight*. 2016;1

188. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama WM, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 2014;40:91-104
189. Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, Epelman S, Jacobsen SE, Lavine KJ. Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation. *Circ Res*. 2016;118:1498-1511
190. Simpson RM, Hong X, Wong MM, Karamariti E, Bhaloo SI, Warren D, Kong W, Hu Y, Xu Q. Hyaluronan is crucial for stem cell differentiation into smooth muscle lineage. *Stem Cells*. 2016;34:1225-1238
191. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Williams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38:79-91
192. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F, Fraser DJ, Allen JE, Jones SA, Taylor PR. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun*. 2013;4:1886
193. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of th2 inflammation. *Science*. 2011;332:1284-1288
194. Wang Y, Lauer ME, Anand S, Mack JA, Maytin EV. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress. *J Biol Chem*. 2014;289:32253-32265
195. Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. Cd44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett*. 2002;528:101-108
196. Henke C, Bitterman P, Roongta U, Ingbar D, Polunovsky V. Induction of fibroblast apoptosis by anti-cd44 antibody: Implications for the treatment of fibroproliferative lung disease. *Am J Pathol*. 1996;149:1639-1650
197. Tyner JW, Uchida O, Kajiwarra N, Kim EY, Patel AC, O'Sullivan MP, Walter MJ, Schwendener RA, Cook DN, Danoff TM, Holtzman MJ. Ccl5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat Med*. 2005;11:1180-1187
198. Dong Y, Poon GFT, Arif AA, Lee-Sayer SSM, Dosanjh M, Johnson P. The survival of fetal and bone marrow monocyte-derived alveolar macrophages is promoted by cd44 and its interaction with hyaluronan. *Mucosal Immunol*. 2018;11:601-614
199. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27:549-550
200. Lijnen P, Petrov V, Rumilla K, Fagard R. Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by cardiac fibroblasts through their differentiation into myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003;25:79-86
201. Meran S, Thomas D, Stephens P, Martin J, Bowen T, Phillips A, Steadman R. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. *J Biol Chem*. 2007;282:25687-25697
202. Meran S, Thomas DW, Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem*. 2008;283:6530-6545

203. Mewhort HE, Lipon BD, Svystonyuk DA, Teng G, Guzzardi DG, Silva C, Yong VW, Fedak PW. Monocytes increase human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling through tgf-beta1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310:H716-724
204. Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd, Ju X, Spratt H, Guo DC, Milewicz D, Tilton RG, Brasier AR. An adventitial il-6/mcp1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:3637-3651
205. Shetty S, Weston CJ, Adams DH, Lalor PF. A flow adhesion assay to study leucocyte recruitment to human hepatic sinusoidal endothelium under conditions of shear stress. *J Vis Exp*. 2014
206. Pinho V, Coelho FM, Menezes GB, Cara DC. Intravital microscopy to study leukocyte recruitment in vivo. *Methods Mol Biol*. 2011;689:81-90
207. Anwar A, Keating AK, Joung D, Sather S, Kim GK, Sawczyn KK, Brandao L, Henson PM, Graham DK. Mer tyrosine kinase (merck) promotes macrophage survival following exposure to oxidative stress. *J Leukoc Biol*. 2009;86:73-79
208. DeBerge M, Yeap XY, Dehn S, Zhang S, Grigoryeva L, Misener S, Procissi D, Zhou X, Lee DC, Muller WA, Luo X, Rothlin C, Tabas I, Thorp EB. Merck cleavage on resident cardiac macrophages compromises repair after myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res*. 2017;121:930-940

11. Originalarbeiten

A.Petz, M. Grandoch, DJ. Gorski, M. Abrams, M. Piroth, R. Schneckmann, S. Homann, J. Müller, S. Hartwig, S. Lehr, Y. Yamaguchi, T. Wight, S. Gorressen, Z. Ding, S. Kötter, M. Krüger, A. Heinen, M. Kelm, A. Gödecke, U. Flögel, JW. Fischer. *Cardiac hyaluronan synthesis is critically involved in the cardiac macrophage response and promotes healing after ischemia reperfusion injury.*

Circulation Research. 2019 May 10; 124(10): 1433-1447.

Impact factor 2017: 15.211

Daten oder Teile der Daten der Abbildungen 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 und 36 der Dissertation sind Bestandteil in der oben genannten Originalarbeit oder dem dazugehörigen *Supplement* integriert.

Mein Eigenanteil in der oben genannten Originalarbeit:

- Planung und Durchführung eines Großteils der Versuche
- Analyse eines Großteils der Daten
- Beteiligung an der Interpretation der Daten
- Prüfung des gesamten Manuskripts sowie Schreiben der Methoden
- Planung und Durchführung eines Großteils der Revisionsversuche
- Analyse eines Großteils der Revisionsdaten

DJ. Gorski, A. Petz, C. Reichert, S. Twarock, M. Grandoch, JW. Fischer. *Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin-resistance.*

Scientific reports 9, Article number: 1827, 2019.

Impact factor 2017: 4.122

A Heinen, R. Nederlof, P. Panjwani, A. Spsychala, T. Tschaidse, H. Reffelt, J. Boy, A. Raupach, S. Gödecke, P. Petzsch, K. Köhrer, M. Grandoch, A. Petz, JW. Fischer, C. Alter, J. Vasilevska, P. Lang, A. Gödecke. IGF1 treatment improves cardiac remodelling after infarction by targeting myeloid cells.

Molecular Therapy Volume 27, 11, P46-58, Jan, 2019.

Impact factor 2017: 7.008

12. Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2017, 83. Heidelberg (Vortrag)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2017, 83. Mannheim (Poster)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2018, 84. Göttingen (Poster)

13. Lebenslauf

Persönliches

Name	Anne Petz
Geburtsdatum	04. Juli 1989
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

03/2015 - 03/2019	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Doktorvater. Professor Dr. Jens W Fischer Thema: „Bedeutung der Hyaluronsäure nach kardialer Ischämie und Reperfusion“
-------------------	--

Studium

10/2012 - 09/2014	Universität Düsseldorf, Biologie Abschluss: Master of Science, Biologie
10/2009 - 09/2012	Universität Düsseldorf, Biologie Abschluss: Bachelor of Science, Biologie

Schule

09/ 2000- 06/2009	Erzbischöfliches Mädchengymnasium Marienberg, Neuss
09/1996 -07/2000	St. Peter Grundschule Rosellen, Neuss

Düsseldorf, den 20.03.2019

14. Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jens W. Fischer für die Überlassung dieses sehr spannenden Projektes und die Betreuung bedanken. Die kleinen Gespräche und größeren Meetings haben stets zu vielen neuen Ideen und zum Fortschritt der Arbeit beigetragen. Innerhalb des Sonderforschungsbereich 1116 habe ich viele bereichernde Erfahrungen sammeln können, erstklassige Wissenschaftler berichten hören können und mich stets wohl gefühlt. All diese Erfahrungen, wie auch die Sprecherin der CaVaD 2018 gewesen zu sein, sind wertvoll für mich gewesen. Ein mindestens ebenso großer Dank gilt Frau Professor Dr. Maria Grandoch. Vielen lieben Dank für die intensive und herzliche Betreuung und Zusammenarbeit und das stets offene Ohr für jegliche fachliche Fragestellung sowie die weiteren kleinen „Wehwehchen“ des Alltags. Herrn Professor Dr. Ulrich Rüter danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferates. Martina Hübel, Peggy Marra-Mann, Petra Rompel, Irmhild Rüter, Dominik Semmler und Beate Weyrauther und ganz besonders Kerstin Freidel und Annika Zimmermann waren mir alle im Labor immer eine große Hilfe. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken. Ich danke natürlich auch allen aktuellen sowie ehemaligen Kolleginnen und Kollegen für das freundliche Miteinander, die große Hilfsbereitschaft und den ein oder anderen gemeinsamen Abend beim Kochen oder in den Düsseldorfer Kneipen. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Dr. Rebekka Schneckmann für die schöne Büroatmosphäre und das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit. Zusätzlich möchte ich noch explizit allen helfenden Händen in der Revisionszeit des Manuskripts danken, besonders: Dr. Susanne Homann und Marco Piroth. Dr. Simone Gorressen danke ich herzlich für die Durchführung der Infarkte. Diese haben die Basis für diese Arbeit gelegt und ohne Sie wären keine weiteren Analysen möglich gewesen. Sie war für mich immer zu jeder Tag- und Nachtzeit per *WhatsApp* erreichbar. Aber auch bei vielen weiteren Kooperationspartnern möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Sie alle haben das Projekt sehr weit vorangebracht, insbesondere die hervorragende Kooperation mit Professor Dr. Ulrich Flögel. Dr. Sandra Berger, Erika Lohmann, Sabine Lohmann, Karin Montag und Ramona Quednau danke ich sehr für die organisatorische Unterstützung. Der größte Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder und Dr. Daniel Gorski, die immer hinter mir stehen. Ich danke euch von Herzen für euren bedingungslosen Beistand. Die wichtigen fachlichen Diskussionen mit Dan und die große Hilfe im Projekt während meiner Promotion ist ebenfalls riesig gewesen und sehr dankenswert.

15. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Düsseldorf, den 20.03.2019

Anne Petz